



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

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

(11)



1-0050111

(51)^{2019.01} C07K 16/28

(13) B

-
- (21) 1-2020-00906 (22) 26/07/2018
(86) PCT/US2018/043936 26/07/2018 (87) WO 2019/023482 31/01/2019
(30) 62/537,753 27/07/2017 US; 62/588,853 20/11/2017 US; 62/645,284 20/03/2018 US;
62/685,599 15/06/2018 US
(45) 25/08/2025 449 (43) 25/08/2020 389A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72) HERMANN, Aynur (US); IOFFE, Ella (US); BUROVA, Elena (US); THURSTON,
Gavin (US); OLSON, William (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)
-

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CTLA-4, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG
PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-00906

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể gắn kết với protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4 (CTLA-4), và phương pháp sử dụng kháng thể này. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, kháng thể là kháng thể của người có chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với CTLA-4. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế hữu ích để ức chế hoặc làm trung hòa hoạt tính của CTLA-4, do đó tạo ra cách hoạt hóa tế bào T và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus.

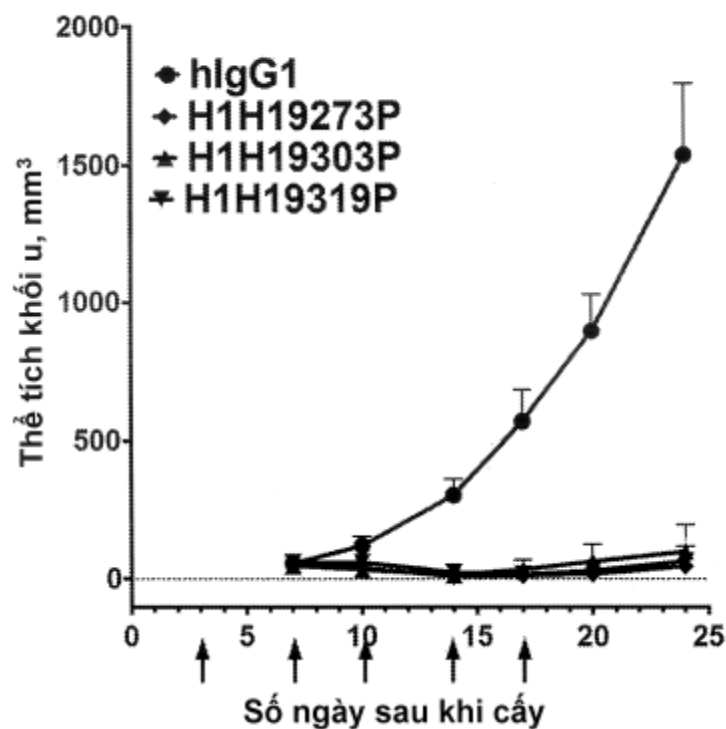


Fig.1

Tham chiếu đến danh mục trình tự

Sáng chế kết hợp để tham khảo Danh mục trình tự được nộp ở dạng đọc được trên máy vi tính dưới dạng tệp 10360WO01-Sequence.txt, được tạo ra vào ngày 29 tháng 6 năm 2018 và chứa 178.018 byte.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể gắn kết đặc hiệu với protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4: CTLA-4) của thụ thể điều biến miễn dịch, và phương pháp điều trị và chẩn đoán bằng cách sử dụng các kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4 (CTLA-4; còn được gọi là CD152) là thụ thể kiểm soát sự ức chế tế bào T xuyên màng typ I được biểu hiện trên tế bào T bình thường và tế bào T điều hòa. CTLA-4 điều hòa âm tính sự hoạt hóa tế bào T bằng cách cạnh tranh vượt trội thụ thể kích thích CD28 từ sự gắn kết với các phối tử tự nhiên của nó, B7-1 (CD80) và B7-2 (CD86). Sự hoạt hóa tế bào T ban đầu đạt được bằng cách kích thích các thụ thể tế bào T (T-cell receptor: TCR) nhận biết các peptit đặc hiệu được trình diện bởi các protein của phức hợp tương thích mô chính nhóm I hoặc II (MHCI hoặc MHCII) trên các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cell: APC) (Goldrath *et al.* 1999, Nature 402: 255-262). Thụ thể TCR được hoạt hóa lại khơi mào thác sự kiện truyền tín hiệu, mà có thể được theo dõi theo sự biểu hiện của các gen thông báo đã chuyển nhiễm, được định hướng bởi các gen khởi đầu điều hòa sự biểu hiện của các yếu tố phiên mã khác nhau như chất hoạt hóa-protein 1 (activator-protein 1: AP-1), yếu tố nhân của các tế bào T được hoạt hóa (Nuclear Factor of Activated T-cell: NFAT) hoặc chất tăng cường chuỗi nhẹ kapa của yếu tố nhân của các tế bào T được hoạt hóa (NF κ B). Sau đó, sự đáp ứng của tế bào T được cải thiện thêm nhờ sự tham gia của các thụ thể đồng kích thích hoặc đồng ức chế được biểu hiện cơ định hoặc cảm ứng trên các tế bào T như CD28, CTLA-4 (protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4), PD-1 (protein 1 gây chết tế bào theo

chương trình), LAG-3 (gen hoạt hóa tế bào lymphô 3) hoặc các phân tử khác (Sharpe *et al.* 2002, Nat. Rev. Immunol. 2: 116-126).

Các đồng thụ thể CD28 và CTLA-4 cạnh tranh với các phối tử giống nhau, CD80 và CD86, được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC). CTLA-4 gắn kết CD80 và CD86 với ái lực cao hơn so với CD28, có chức năng làm môi và ức chế sự hoạt hóa của CD28 bằng cách cô lập các phối tử dẫn đến làm giảm sự hoạt hóa tế bào T (Alegre *et al.* 2001, Nat. Rev. Immunol. 1: 220-228, Walker *et al.* 2011, Nat. Rev. Immunol. 11: 852-863, và Buchbinder *et al.*, 2016, American Journal of Clinical Oncology, 39:98-106).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với CTLA-4. Các kháng thể theo sáng chế hữu ích, ngoài các ưu điểm khác, để hướng đích các tế bào miễn dịch biểu hiện CTLA-4, và để điều biến hoạt tính CTLA-4. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế hữu ích để ức chế hoặc làm trung hòa hoạt tính của CTLA-4 và/hoặc để kích thích sự hoạt hóa của tế bào T, ví dụ, trong các trường hợp trong đó sự tiêu diệt qua trung gian tế bào T là có lợi hoặc mong muốn. Theo một số phương án, các kháng thể này hữu ích để ức chế chức năng của tế bào T điều hòa và/hoặc để tái hoạt hóa các tế bào T đã cạn kiệt. Các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế, hoặc các phần gắn kết kháng nguyên của nó, có thể được đưa vào làm một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu, ví dụ, để điều biến đáp ứng miễn dịch và/hoặc hướng đích các kháng thể đến loại tế bào đặc hiệu, như tế bào khối u, hoặc tế bào nhiễm bệnh. Các kháng thể này hữu ích trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư và bệnh nhiễm virus.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ chứa phần gắn kết kháng nguyên (ví dụ, Fab, F(ab')₂ hoặc mảnh scFv), và có thể được cải biến để tác động đến chức năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng hiệu ứng còn dư (Reddy *et al.*, 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). Theo một số phương án, kháng thể có thể là kháng thể đặc hiệu kép.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp được phân lập hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với CTLA-4.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể của người có chiều dài đầy đủ.

Kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ theo sáng chế được liệt kê trong các Bảng 1 và 2 của bản mô tả này. Bảng 1 thể hiện các bộ nhận dạng trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region: HCVR), các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region: LCVR), các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), và các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ. Bảng 2 thể hiện các bộ nhận dạng trình tự axit amin của các vùng HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ.

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

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

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCVR được liệt kê trong Bảng 1 được ghép đôi với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338,

346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, và 490/498. Theo một số phương án, cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ một trong số các trình tự SEQ ID NO: 194/202 (ví dụ, H1H19303P), hoặc 290/298 (ví dụ, H1H19319P2). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng HCVR và LCVR, vùng HCVR nêu trên chứa trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có tối đa mười sự thay thế axit amin, và vùng LCVR nêu trên chứa trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có tối đa mười sự thay thế axit amin. Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng HCVR và LCVR, vùng HCVR nêu trên chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194 có tối đa mười sự thay thế axit amin, và vùng LCVR nêu trên chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202 có tối đa mười sự thay thế axit amin. Theo phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng HCVR và LCVR, vùng HCVR nêu trên chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194 có ít nhất một sự thay thế axit amin, và vùng LCVR nêu trên chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202 có ít nhất một sự thay thế axit amin.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCDR1 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

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

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất

95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

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

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

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

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 được ghép cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCDR3/LCDR3 được chứa trong kháng thể bất kỳ của các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, cặp trình tự axit amin của vùng HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 200/208 (ví dụ, H1H19303P), và 296/304 (ví dụ, H1H19319P2).

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng HCVR và LCVR, vùng HCVR nêu trên chứa vùng HCDR1 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 về 1 axit amin, vùng HCDR2 chứa trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 về 1 axit amin, và vùng HCDR3 chứa trình tự axit amin khác với trình tự axit amin

được liệt kê trong Bảng 1 về 1 axit amin. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng HCVR và LCVR, vùng LCVR nêu trên chứa vùng LCDR1 có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 về 1 axit amin, vùng LCDR2 chứa trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 về 1 axit amin, và vùng LCDR3 chứa trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 về 1 axit amin. Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CTLA-4, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng HCVR và LCVR, vùng HCVR nêu trên chứa vùng HCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 196 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự SEQ ID NO: 196 về 1 axit amin, vùng HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 198 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự SEQ ID NO: 198 về 1 axit amin, và vùng HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 200 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự SEQ ID NO: 200 về 1 axit amin. Theo phương án làm ví dụ khác, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng HCVR và LCVR, vùng LCVR nêu trên chứa vùng LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 204 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự SEQ ID NO: 204 về 1 axit amin, vùng LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 206 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự SEQ ID NO: 206 về 1 axit amin, và vùng LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 208 hoặc trình tự axit amin khác với trình tự SEQ ID NO: 208 về 1 axit amin.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa tập hợp gồm sáu vùng CDR (nghĩa là HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, tập hợp trình tự axit amin của các vùng HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208 (ví dụ, H1H19303P), và 292-294-296-300-302-304 (ví dụ, H1H19319P2).

Theo phương án liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa tập hợp gồm sáu vùng CDR (nghĩa là HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) được chứa trong cặp axit amin của vùng HCVR/LCVR như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số của các kháng thể

kháng CTLA-4 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa tập hợp trình tự axit amin của vùng HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chứa trong cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 194/202 (ví dụ, H1H19303P), và 290/298 (ví dụ, H1H19319P2). Các phương pháp và kỹ thuật để xác định vùng CDR trong các trình tự axit amin của vùng HCVR và LCVR là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để xác định vùng CDR trong các trình tự axit amin của vùng HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được bộc lộ ở đây. Các quy ước làm ví dụ có thể được sử dụng để xác định ranh giới của các vùng CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Theo các thuật ngữ chung, định nghĩa Kabat dựa trên tính khả biến của trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của các vùng dạng vòng của cấu trúc, và định nghĩa AbM dung hòa giữa định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia. Ví dụ, xem tài liệu: 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). Các cơ sở dữ liệu đã công bố cũng có thể được sử dụng để xác định các trình tự của vùng CDR trong kháng thể.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 có kiểu glycosyl hoá được cải biến. Theo một số phương án, sự cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hoá không mong muốn có thể hữu dụng, hoặc kháng thể không có mặt gốc fucoza trên chuỗi oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC) (xem tài liệu: Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Trong các ứng dụng khác, có thể tạo ra sự cải biến mức độ galactosyl hoá để cải biến độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity: CDC).

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 chứa miền Fc, trong đó miền Fc chứa isotyp IgG1 hoặc IgG4 như được mô tả trong phần khác của bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các vùng CDR của HCVR và các vùng CDR của LCVR, trong đó

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

Sáng chế còn đề xuất kháng thể được phân lập và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với các phối tử tự nhiên của nó (B7-1/CD80 và B7-2/CD86). Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của CTLA-4 có thể gắn kết với cùng epitop trên CTLA-4 dưới dạng B7-1/CD80 và/hoặc B7-2/CD86 hoặc có thể gắn kết với epitop khác với B7-1/CD80 và/hoặc B7-2/CD86 trên CTLA-4.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 từ người hoặc các loài khác. Theo một số phương án, các kháng thể có thể gắn kết với CTLA-4 của người và/hoặc với CTLA-4 của khỉ.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cạnh tranh chéo để gắn kết với CTLA-4 với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các vùng CDR của HCVR và các vùng CDR của LCVR, trong đó mỗi vùng HCVR và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự của vùng HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với cùng epitop dưới dạng kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các vùng CDR của HCVR và các vùng CDR của LCVR, trong đó mỗi vùng HCVR và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự của vùng HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với cùng epitop dưới dạng kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các vùng CDR của HCVR và các vùng CDR của LCVR, trong đó cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR có các trình tự SEQ ID NO: 194/202.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 tương tác với một hoặc nhiều axit amin được chứa trong miền ngoại bào của CTLA-4 của người.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng của người tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 của người và/hoặc CTLA-4 của khỉ cynomolgus; (b) phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với CD80 và/hoặc CD86; (c) phong bế sự điều hòa giảm tế

bào T do CTLA-4 gây ra và khôi phục sự truyền tín hiệu của tế bào T; và (d) ức chế sự phát triển của khối u và làm tăng tỷ lệ sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 theo cách chủ vận, nghĩa là nó có thể làm gia tăng hoặc kích thích sự gắn kết và/hoặc hoạt tính của CTLA-4; theo các phương án khác, kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 theo cách đối kháng, nghĩa là nó có thể phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với (các) phối tử của nó.

Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có tính đặc hiệu kép bao gồm tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với CTLA-4 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với epitop đích thứ hai. Epitop đích thứ hai này có thể là epitop khác trên CTLA-4 hoặc trên protein khác. Theo một số phương án, epitop đích thứ hai này có thể là epitop trên tế bào khác bao gồm tế bào T khác, tế bào B, tế bào khối u hoặc tế bào đã nhiễm virus.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá các kháng thể kháng CTLA-4 hoặc phần của chúng. Ví dụ, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng HCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng LCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCDR1 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng HCDR1 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự

gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCDR2 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng HCDR2 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng HCDR3 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCDR1 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng LCDR1 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCDR2 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng LCDR2 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng LCDR3 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít

nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá vùng HCVR, trong đó vùng HCVR này chứa tập hợp ba vùng CDR (nghĩa là HCDR1-HCDR2-HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin của vùng HCDR1-HCDR2-HCDR3 là như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá vùng LCVR, trong đó vùng LCVR này chứa tập hợp ba vùng CDR (nghĩa là LCDR1-LCDR2-LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin của vùng LCDR1-LCDR2-LCDR3 là như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá cả vùng HCVR và LCVR, trong đó vùng HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCVR được liệt kê trong Bảng 1, và trong đó vùng LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng HCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này, và trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic của vùng LCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với các trình tự này. Theo một số phương án theo khía cạnh này của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa vùng HCVR và LCVR, trong đó cả vùng HCVR và LCVR đều có nguồn gốc từ cùng kháng thể kháng CTLA-4 được liệt kê trong Bảng 1.

Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CTLA-4. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic đã đề cập trên đây, nghĩa là các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR

như được thể hiện trong Bảng 1. Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit chứa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CTLA-4. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic đã đề cập trên đây, nghĩa là các phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong Bảng 1. Cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế là tế bào chủ mà vector này đã được đưa vào, cũng như phương pháp tạo ra các kháng thể hoặc phần của chúng bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong điều kiện cho phép tạo ra các kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và thu hồi các kháng thể và các mảnh kháng thể được tạo ra này.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể của người tái tổ hợp hoặc mảnh của nó gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 và chất mang được dụng. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất chế phẩm là hỗn hợp của kháng thể kháng CTLA-4 và chất điều trị thứ hai. Theo một phương án, chất điều trị thứ hai là chất bất kỳ được kết hợp theo cách có lợi với kháng thể kháng CTLA-4. Các chất làm ví dụ có thể được kết hợp theo cách có lợi với kháng thể kháng CTLA-4 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất khác gắn kết và/hoặc điều biến sự truyền tín hiệu của CTLA-4 (bao gồm cả các kháng thể khác hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, v.v.) và/hoặc các chất, không gắn kết trực tiếp với CTLA-4 nhưng dù sao cũng điều biến sự hoạt hóa của tế bào miễn dịch. Các liệu pháp kết hợp bổ sung và dạng đồng bào chế liên quan đến các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế được bộc lộ ở phần khác của bản mô tả này.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế mô tả phương pháp điều biến đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế để gắn kết với CTLA-4. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp kích thích hoặc làm gia tăng sự hoạt hóa tế bào T ở đối tượng. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp khôi phục hoạt tính của tế bào T bao gồm bước cho tế bào T tiếp

xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế sao cho hoạt tính của tế bào T được khôi phục. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp ức chế tế bào T điều hòa (Treg) ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo một số phương án, đối tượng cần điều trị có thể bị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp khôi phục sự ức chế hoạt tính của tế bào T qua trung gian CTLA-4 bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế mô tả phương pháp điều trị để điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 hoặc phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp điều trị này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ được cải thiện, giảm bớt, ức chế hoặc phòng ngừa bằng cách kích thích hoặc ức chế hoạt tính hoặc sự truyền tín hiệu của CTLA-4. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất điều trị thứ hai cho đối tượng cần điều trị. Chất điều trị thứ hai có thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể với chất đồng ức chế tế bào T khác, kháng thể với kháng nguyên tế bào khối u, kháng thể với thụ thể tế bào T, kháng thể với epitop trên tế bào đã nhiễm virus, chất gây độc tế bào, dược chất kháng bệnh ung thư, dược chất kháng virus, dược chất kháng viêm (ví dụ, corticosteroid), chất hóa trị liệu, liệu pháp xạ trị, phẫu thuật, chất ức chế miễn dịch và dược chất hoặc liệu pháp khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, chất điều trị thứ hai có thể là chất giúp chống lại hoặc làm giảm (các) tác dụng phụ có thể có bất kỳ liên quan đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, nếu (các) tác dụng phụ này xuất hiện.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của khối u. Ví dụ, sáng chế mô tả phương pháp ức chế sự phát triển của khối u do khối u nguyên phát hoặc khối u di căn ở đối tượng. Theo một số phương án, sáng chế mô tả

phương pháp làm gia tăng thời gian sống (ví dụ, thời gian sống không có sự tiến triển của bệnh hoặc tổng thời gian sống) của đối tượng mắc bệnh ung thư. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư nguyên phát và/hoặc bệnh ung thư tái phát, bao gồm bệnh ung thư máu (ví dụ, bệnh ác tính huyết học như u lymphô, u tủy hoặc bệnh bạch cầu), bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào xốp đa dạng), bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (non-small cell lung cancer: NSCLC), bao gồm cả bệnh NSCLC tiến triển hoặc di căn), caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, caxinom tế bào gan, caxinom tế bào thận, u melanin, u trung biểu mô, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và bệnh ung thư ruột kết. Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp ức chế hoặc ngăn chặn sự phát triển của các khối u đã tạo thành. Phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng được phẩm chứa lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng kết hợp với chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế sự chết theo chương trình-1 (programmed death-1: PD-1) (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như nivolumab, pembrolizumab hoặc REGN2810), chất ức chế phối tử chết theo chương trình-1 (programmed death-ligand 1: PD-L1) (ví dụ, kháng thể kháng PD-L1 như atezolizumab, avalumab hoặc durvalumab), chất đối kháng yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (vascular endothelial growth factor: VEGF) (ví dụ, aflibercept, bevacizumab), chất ức chế angiotensin-2 (angiotensin-2: Ang2) (ví dụ, kháng thể kháng Ang2 như nesvacumab), chất ức chế gen hoạt hóa tế bào lymphô 3 (lymphocyte-activation gene 3: LAG3), kháng thể đặc hiệu kép CD20xCD3 (ví dụ, REGN1979), độc tố tế bào, chất hóa trị liệu, vacxin bệnh ung thư, phẫu thuật, và liệu pháp xạ trị. Ví dụ bổ sung về các liệu pháp/chất điều trị bổ sung có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư được mô tả ở phần khác của bản mô tả này.

Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng qua dưới da, trong tĩnh mạch, trong chân bì, trong màng bụng, qua đường miệng, trong cơ, hoặc trong sọ.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó được sử dụng khu trú vào khối u (quanh khối u hoặc trong khối u). Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/kg thể trọng đến khoảng 100 mg/kg thể trọng của đối tượng. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 50mg đến khoảng 1000mg cho đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ khoảng 25mg đến khoảng 600mg. Theo một số phương án, kháng thể được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ khoảng 50mg đến khoảng 1200mg.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn mà sẽ có lợi từ việc phong bế sự gắn kết và/hoặc truyền tín hiệu của CTLA-4 như bệnh ung thư.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc dược phẩm chứa chúng, (i) trong việc sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị bằng cách tạo đối kháng CTLA-4 (ví dụ, bệnh ung thư), và/hoặc (ii) trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị bằng cách tạo đối kháng CTLA-4 (ví dụ, bệnh ung thư).

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (bao gồm cả bệnh NSCLC tiến triển hoặc di căn) ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng PD-1. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng CTLA-4 chứa các vùng CDR của HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194 và các vùng CDR của LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng CTLA-4 chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 tương ứng, được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng CTLA-4 chứa vùng HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194, và vùng LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng CTLA-4 chứa vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 là cemiplimab. Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng các kháng thể này trong việc sản xuất một hoặc nhiều thuốc để điều trị bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế

bào không nhỏ, bao gồm cả bệnh NSCLC tiến triển hoặc di căn).

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) ở mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau khi cấy khối u của thử nghiệm được mô tả trong nghiên cứu (A) trong Ví dụ 7. Chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* được cấy các tế bào MC38.Ova qua đường SC (10^6 tế bào/con) vào ngày 0 và được tách thành bốn nhóm điều trị (9 con/nhóm). Chuột được cho sử dụng một trong ba kháng thể hàng đầu kháng CTLA-4 của người (H1H19273P, hoặc H1H19303P, hoặc H1H19319) với liều 10 mg/kg hoặc đối chứng isotyp hIgG1 qua đường trong màng bụng (intraperitoneally: IP) với liều 10 mg/kg vào các ngày 3, 7, 10, 14 và 17. Thể tích khối u được theo dõi bằng các phép đo bằng thước cặp hai lần/tuần trong 37 ngày. Các ngày điều trị được thể hiện bằng mũi tên.

Fig.2 thể hiện thể tích khối u riêng biệt vào ngày 24 của thử nghiệm được mô tả trong nghiên cứu (A) trong Ví dụ 7. Ngày 24 là thời điểm cuối cùng trong nghiên cứu khi tất cả các con chuột trong tất cả các nhóm còn sống. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phương pháp phân tích ANOVA một chiều với kiểm định hậu kiểm nhiều so sánh của Dunnett (**** $p < 0,0001$).

Fig.3 thể hiện đường cong sự sống Kaplan-Meier của thử nghiệm được mô tả trong nghiên cứu (A) trong Ví dụ 7.

Fig.4 thể hiện thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) ở mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau khi cấy khối u của thử nghiệm được mô tả trong nghiên cứu (B) trong Ví dụ 7. Chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* được cho sử dụng kháng thể H1H19303P kháng CTLA-4 hoặc đối chứng isotyp hIgG1 qua đường IP vào các ngày 3, 6, 9, 13 và 16. Thể tích khối u được theo dõi bằng các phép đo bằng thước cặp hai lần/tuần trong 37 ngày. Các ngày điều trị được thể hiện bằng mũi tên.

Fig.5 thể hiện thể tích khối u riêng biệt vào ngày 20 của thử nghiệm được mô tả trong nghiên cứu (B) trong Ví dụ 7. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phương pháp phân tích ANOVA một chiều với kiểm định hậu kiểm nhiều so sánh của Dunnett

(**** $p < 0,0001$).

Fig.6 thể hiện đường cong sự sống Kaplan-Meier của thử nghiệm được mô tả trong nghiên cứu (B) trong Ví dụ 7.

Fig.7 thể hiện nồng độ của kháng thể H1H19303P toàn phần và đối chứng isotyp hIgG1 trong huyết thanh, như được mô tả trong nghiên cứu (B) trong Ví dụ 7.

Fig.8 thể hiện nồng độ của kháng thể của chuột kháng kháng thể của người (mouse anti-human antibody: MAHA) kháng H1H19303P (■) hoặc đối chứng isotyp (●), như được mô tả trong nghiên cứu (B) trong Ví dụ 7.

Fig.9 thể hiện thể tích khối u trung bình ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) ở mỗi nhóm điều trị ở nhiều thời điểm sau khi cấy khối u của thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 8. Các ngày điều trị được thể hiện bằng mũi tên.

Fig.10 thể hiện thể tích khối u riêng biệt vào ngày 10 sau khi bắt đầu điều trị, như được mô tả trong Ví dụ 8.

Fig.11 thể hiện đường cong sự sống Kaplan-Meier của thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 8.

Fig.12 và **Fig.13** thể hiện rằng H1H19303P (còn được gọi là REGN4659) làm chậm sự phát triển của các khối u đã tạo thành ở chuột CTLA-4^{hum/hum}. Chuột được ghép các tế bào Mc38.Ova qua đường dưới da vào sườn (5×10^5 tế bào/con), được chia ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị vào ngày 10 khi thể tích khối u đạt mức 100 mm^3 , và REGN4659 (25 mg/kg, 10 mg/kg, $n=10$) hoặc kháng thể Ab đối chứng isotyp (25 mg/kg, $n=10$) được sử dụng vào các ngày 10,13,17 và thể tích khối u được theo dõi cho đến ngày 27. **Fig.12** thể hiện đường cong sự phát triển của khối u trung bình ở mỗi nhóm điều trị. **Fig.13** thể hiện thể tích khối u riêng biệt ở mỗi nhóm điều trị khi được xác định vào ngày 21, thời điểm cuối cùng khi tất cả các con chuột trong nghiên cứu còn sống.

Fig.14 thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescent intensity: MFI) của sự biểu hiện CTLA-4 toàn phần của người (bề mặt và trong tế bào) trên các tế bào Treg và tế bào T hiệu ứng ở lách và trong khối u ở chuột CTLA-4^{hum/hum} mang khối u được điều trị bằng kháng thể đối chứng hIgG1. Sự biểu hiện của CTLA-4 trên các tế bào hiệu ứng CD8^+ và CD4^+ ở lách không thể phân biệt với sự nhuộm kháng thể đối chứng isotyp (MFI=0) và không được thể hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Nếu không được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Mặc dù các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng để thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên được mô tả sau đây. Tất cả các tài liệu công bố được đề cập trong bản mô tả này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Thuật ngữ “CTLA-4” để chỉ protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4, thụ thể kiểm soát miễn dịch hoặc đồng thụ thể tế bào T, còn được gọi là CD152. Trình tự axit amin của CTLA-4 của người có chiều dài đầy đủ được cung cấp dưới dạng SEQ ID NO: 505 (mã số truy cập NP_005205.2). Thuật ngữ “CTLA-4” bao gồm CTLA-4 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Thuật ngữ này còn bao gồm CTLA-4 hoặc mảnh của nó được liên kết với, ví dụ, đuôi histidin, Fc của người hoặc chuột, trình tự tín hiệu, hoặc miền xuyên màng hoặc chất tế bào của CD300a (aa từ 181 đến 299; mã số truy cập NP_009192.2). Ví dụ, thuật ngữ này bao gồm các trình tự được bản luận trong các ví dụ, ví dụ, chứa đuôi myc-myc-polyhistidin ở đầu tận cùng C của CTLA-4 có chiều dài đầy đủ, hoặc chứa vùng Fc của chuột (mIgG2a) ở đầu tận cùng C của CTLA-4 có chiều dài đầy đủ. Trừ khi được chỉ rõ là từ các loài không phải người, thuật ngữ “CTLA-4” có nghĩa là CTLA-4 của người.

CTLA-4 là thành viên của họ chung globulin miễn dịch (immunoglobulin: Ig), và thể đồng dạng của CD28, nhưng có ái lực gắn kết lớn hơn đối với các phối tử CD80 và CD86. CTLA-4 là protein xuyên màng typ I có 223 axit amin chứa miền V, miền xuyên màng, và đuôi chất tế bào được biểu hiện trên các tế bào T hoạt hóa và

các tế bào T điều hòa. Thụ thể CTLA-4 gắn kết với các phối tử B7-1/CD80 và B7-2/CD86 có mặt trên các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell: APC).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất đồng ức chế tế bào T” để chỉ phối tử và/hoặc thụ thể có tác dụng điều biến đáp ứng miễn dịch bằng cách hoạt hóa hoặc ức chế tế bào T. Thuật ngữ “chất đồng ức chế tế bào T”, còn được gọi là phân tử đồng truyền tín hiệu của tế bào T bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự chết theo chương trình-1 (PD-1), gen hoạt hóa tế bào lymphô 3 (LAG3), chất làm suy giảm tế bào lymphô B và T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, globulin miễn dịch tế bào T và muxin 3 (TIM3), thụ thể miễn dịch tế bào T với globulin miễn dịch và ITIM (TIGIT; còn được gọi là VSIG9), thụ thể 1 tương tự globulin liên quan đến bạch cầu (LAIR1; còn được gọi là CD305), chất đồng kích thích tế bào T có thể cảm ứng (ICOS; còn được gọi là CD278), chất ức chế Ig miền V của sự hoạt hóa tế bào T (VISTA) và CD160.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" được dự định để chỉ các phân tử globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (heavy: H) và hai chuỗi nhẹ (light: L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua (nghĩa là "các phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ"), cũng như các multime của chúng (ví dụ, IgM) hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (“HCVR” hoặc “V_H”) và vùng ổn định của chuỗi nặng (gồm các miền C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (“LCVR hoặc “V_L”) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ (C_L). Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ thêm thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (CDR), xen lẫn với các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (framework region: FR). Mỗi vùng V_H và V_L gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo một số phương án của sáng chế, các vùng 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 bằng phương pháp tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự tương đồng của axit amin có thể được xác định dựa trên phương pháp phân tích đặt cạnh nhau của hai hoặc nhiều vùng CDR.

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

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

Các kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4 của người có chiều dài đầy đủ được bộc lộ ở đây có thể chứa một hoặc nhiều sự thay thế, sự chèn đoạn và/hoặc làm khuyết đoạn axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng. Các đột biến này có thể được xác định dễ dàng bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ ở đây với các trình tự dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự của kháng thể đã công bố. Sáng chế bao gồm các kháng thể, và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ ở đây, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm của người khác, hoặc thành sự thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự này được gọi chung ở đây là "đột biến dòng mầm"). Người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực này, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ ở đây, có thể dễ dàng tạo ra nhiều kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng biệt hoặc các tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, tất cả các gốc trong khung và/hoặc vùng CDR trong các miền V_H và/hoặc V_L được đột biến trở lại thành các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm gốc mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ một số gốc được đột biến trở lại thành trình tự dòng mầm gốc, ví dụ, chỉ các gốc đã đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của vùng FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của vùng FR4, hoặc chỉ các gốc đã đột biến được tìm thấy trong các vùng CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc trong khung và/hoặc vùng CDR được đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (nghĩa là trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc ban đầu từ đó). Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó một số gốc riêng biệt được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi một số gốc khác khác với trình tự dòng mầm gốc được duy trì hoặc đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Khi thu được, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được thử nghiệm 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 tăng lên, đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận được cải thiện hoặc gia tăng (theo trường hợp có thể), tính sinh miễn dịch giảm, v.v.. Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên thu được theo cách thông thường này được bao hàm trong sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4 của người có chiều dài đầy đủ chứa biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ ở đây có một hoặc nhiều sự thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 có các trình tự axit amin của vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. sự thay thế axit amin bảo toàn so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ ở đây.

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

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

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu" để chỉ các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu có thể đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền gắn kết kháng nguyên đặc hiệu với các epitop của nhiều hơn một polypeptit đích. Phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu có thể là polypeptit đơn đa chức năng, hoặc nó có thể là phức hợp multimer của hai hoặc nhiều polypeptit được liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với nhau. Thuật ngữ

“các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu” bao gồm các kháng thể của sáng chế có thể được liên kết hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách liên kết hóa học, dung hợp di truyền, liên kết không cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như protein hoặc mảnh của nó để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu với tính đặc hiệu gắn kết thứ hai. Theo sáng chế, thuật ngữ “các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu” cũng bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Theo một số phương án, 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 có tính đặc hiệu gắn kết thứ hai. Các kháng thể đặc hiệu kép và đa đặc hiệu theo sáng chế được mô tả ở phần khác của bản mô tả này.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” hoặc “gắn kết theo cách đặc hiệu”, hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó tạo thành phức hợp với kháng nguyên tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Sự gắn kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số cân bằng phân ly ít nhất bằng khoảng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn (ví dụ, hằng số K_D nhỏ hơn thể hiện sự gắn kết chặt chẽ hơn). Các phương pháp để xác định xem hai phân tử có gắn kết đặc hiệu hay không là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, phương pháp thẩm tách cân bằng, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự. Như được mô tả ở đây, các kháng thể được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, gắn kết đặc hiệu với CTLA-4. Ngoài ra, các kháng thể đa đặc hiệu gắn kết với một miền trong CTLA-4 và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung hoặc đặc hiệu kép gắn kết với hai vùng khác nhau của CTLA-4 dù sao vẫn được cho là các kháng thể “gắn kết đặc hiệu”, khi được sử dụng trong bản mô tả này.

Thuật ngữ kháng thể có “ái lực cao” để chỉ các kháng thể mAb có ái lực gắn kết với CTLA-4, được ký hiệu là K_D , ít nhất bằng 10^{-8} M; tốt hơn là bằng 10^{-9} M; tốt hơn nữa là bằng 10^{-10} M, đặc biệt tốt hơn là bằng 10^{-11} M, đặc biệt tốt hơn là bằng 10^{-12} M, khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ,

BIACORE™ hoặc phương pháp ELISA ái lực-hòa tan.

Thuật ngữ “tốc độ chậm lại”, “Koff” hoặc “kd” có nghĩa là kháng thể phân ly từ CTLA-4, với hằng số tốc độ bằng $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là bằng $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, và thuật ngữ tương tự, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, có thể thu được bằng phương pháp enzym, tổng hợp, hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể", để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể giữ lại được khả năng gắn kết với CTLA-4.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể của sáng chế có thể được liên hợp với gốc như phối tử hoặc gốc điều trị (“thể liên hợp miễn dịch”), như độc tố tế bào, kháng thể kháng CTLA-4 thứ hai, kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu khối u, được chất kháng bệnh ung thư, hoặc gốc điều trị khác bất kỳ hữu ích để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh bao gồm bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus, bao gồm cả bệnh nhiễm virus mạn tính.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể được phân lập", được dự định để chỉ kháng thể gần như không chứa các kháng thể (Ab) khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể được phân lập gắn kết đặc hiệu với CTLA-4, hoặc mảnh của nó, gần như không chứa các kháng thể Ab gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên không phải CTLA-4).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này “kháng thể phong bế” hoặc "kháng thể trung hòa", (hoặc "kháng thể làm trung hòa hoạt tính của CTLA-4" hoặc “kháng thể đối kháng”), được dự định để chỉ kháng thể gắn kết với CTLA-4 dẫn đến sự ức chế ít nhất một hoạt tính sinh học của CTLA-4. Ví dụ, kháng thể của sáng chế có thể ngăn ngừa hoặc phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với CD80 và/hoặc CD86.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “kháng thể hoạt hóa” hoặc “kháng thể tăng cường”, (hoặc “kháng thể chủ vận”), được dự định để chỉ kháng thể có gắn kết

với CTLA-4 dẫn đến làm gia tăng hoặc kích thích ít nhất một hoạt tính sinh học của CTLA-4. Ví dụ, kháng thể của sáng chế có thể làm gia tăng hoạt tính của CTLA-4 bằng cách gắn kết với CTLA-4 theo cách phù hợp với sự gắn kết phối tử (ví dụ, CD80 hoặc CD86), dẫn đến sự truyền tín hiệu nội bào của CTLA-4.

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

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ " K_D " được dự định để chỉ hằng số cân bằng phân ly của sự tương tác kháng nguyên-kháng thể cụ thể.

Thuật ngữ "epitop" để chỉ yếu tố xác định kháng nguyên tương tác với vị trí gắn kết kháng nguyên cụ thể trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể được gọi là paratop. Kháng nguyên đơn có thể 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 hiệu quả sinh học khác nhau. Thuật ngữ "epitop" cũng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà các tế bào B và/hoặc T đáp ứng với. Thuật ngữ này còn để chỉ vùng của kháng nguyên được gắn kết bởi kháng thể. Các epitop có thể được xác định là epitop cấu trúc hoặc epitop chức năng. Các epitop chức năng thường là tiểu quần thể của các epitop cấu trúc và có các gốc góp phần trực tiếp vào ái lực tương tác. Các epitop cũng có thể là epitop cấu dạng, nghĩa là gồm các axit amin không có mạch thẳng. Theo một số phương án, các epitop có thể bao gồm các yếu tố xác định là các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin, mạch bên của đường, các nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl, và theo một số phương án, có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều cụ thể, và/hoặc các đặc tính điện tích cụ thể.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cạnh tranh chéo" có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với kháng nguyên và ức chế hoặc phong bế sự gắn kết của kháng thể khác hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ này cũng bao gồm sự cạnh tranh giữa hai kháng thể theo cả hai sự định hướng, nghĩa là kháng thể thứ nhất gắn kết và phong bế sự gắn kết của kháng thể thứ hai và ngược lại. Theo một số phương án, kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai

có thể gắn kết với cùng epitop. Theo cách khác, các kháng thể thứ nhất và thứ hai này có thể gắn kết với các epitop khác nhau nhưng không chồng lên nhau sao cho sự gắn kết của một kháng thể ức chế hoặc phong bế sự gắn kết của kháng thể thứ hai, ví dụ, thông qua sự án ngữ không gian. Sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng thử nghiệm đo giao thoa theo lớp sinh học không chứa nguyên tử đánh dấu trong thời gian thực. Sự cạnh tranh chéo giữa hai kháng thể có thể được biểu hiện theo sự gắn kết của kháng thể thứ hai là nhỏ hơn tín hiệu nền do sự tự gắn kết (trong đó các kháng thể thứ nhất và thứ hai là kháng thể giống nhau). Sự cạnh tranh chéo giữa 2 kháng thể có thể được biểu hiện, ví dụ, theo tỷ lệ % mức độ gắn kết của kháng thể thứ hai là nhỏ hơn sự tự gắn kết nền (trong đó các kháng thể thứ nhất và thứ hai là kháng thể giống nhau).

Thuật ngữ "tính đồng nhất đáng kể" hoặc "gần như đồng nhất" khi liên quan đến axit nucleic hoặc mảnh của nó, thể hiện rằng khi được sắp thẳng hàng tùy ý với sự chèn đoạn hoặc khuyết đoạn nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ trợ của nó), có mức độ giống về trình tự nucleotit ít nhất khoảng 90%, và tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% của bazơ nucleotit, khi được xác định bằng thuật toán đã biết rõ bất kỳ về mức độ giống của trình tự, như được bàn luận dưới đây. Trong một số trường hợp, phân tử axit nucleic có tính đồng nhất đáng kể với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể mã hóa polypeptit có trình tự axit amin giống hoặc gần như giống với polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Mức độ giống về trình tự có thể được tính toán bằng cách sử dụng thuật toán, ví dụ, thuật toán Needleman Wunsch (Needleman and Wunsch 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) đối với sự dóng thẳng hàng chung, hoặc thuật toán Smith Waterman (Smith and Waterman 1981, J. Mol. Biol. 147: 195-197) đối với sự dóng thẳng hàng cục bộ. Thuật toán được ưu tiên khác được mô tả bởi Dufresne và các đồng tác giả trong tài liệu: Nature Biotechnology năm 2002 (vol. 20, pp. 1269-71) và được sử dụng trong chương trình phần mềm GenePAST (GQ Life Sciences, Inc. Boston, MA).

Khi được sử dụng với polypeptit, thuật ngữ "tính tương tự đáng kể" hoặc "gần như tương tự" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu, như bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng trọng số khe hở ngầm định, đều có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, đặc biệt tốt hơn là có mức độ giống

về trình tự ít nhất 95%, 98% hoặc 99%. Tốt hơn, nếu các phân gốc không giống nhau, khác biệt về sự thay thế axit amin bảo toàn. "Sự thay thế axit amin bảo toàn" là sự thay thế trong đó gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin khác có mạch bên (nhóm R) có tính chất hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo toàn sẽ làm thay đổi không đáng kể các đặc tính chức năng của protein. Trong các trường hợp mà hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự thay thế bảo toàn, tỷ lệ % của mức độ giống về trình tự hoặc mức độ tương tự có thể được điều chỉnh tăng lên để hiệu chỉnh tính chất bảo toàn của sự thay thế này. Các phương pháp để tạo ra sự điều chỉnh này là đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Ví dụ về các nhóm axit amin có các mạch bên có tính chất hóa học tương tự bao gồm 1) các mạch bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) các mạch bên hydroxyl béo: serin và threonin; 3) các mạch bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) các mạch bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) các mạch bên là bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) các mạch bên là axit: aspartat và glutamat, và 7) các mạch bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thế axit amin bảo toàn được ưu tiên bao gồm: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, sự thay thế bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận log khả năng PAM250 được bộc lộ trong tài liệu: Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443 - 45, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Sự thay thế "bảo toàn ở mức trung bình" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận log khả năng PAM250.

Tính tương tự về trình tự của polypeptit thường được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein lựa chọn các trình tự tương tự bằng cách sử dụng các phép đo mức độ tương tự được gán cho sự thay thế, làm khuyết đoạn khác nhau và các cải biến khác nhau, bao gồm cả sự thay thế axit amin bảo toàn. Chẳng hạn, phần mềm GCG chứa các chương trình như GAP và BESTFIT có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định tính tương đồng trình tự hoặc mức độ giống về trình tự giữa các polypeptit có liên quan gần nhất, như các polypeptit tương đồng từ các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu đại và

protein đột biến của nó. Ví dụ, xem phần mềm GCG, phiên bản 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng phần mềm FASTA với các thông số mặc định hoặc được khuyến cáo; chương trình trong phần mềm GCG, phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp sự sắp xếp thẳng hàng và mức độ giống về trình tự theo tỷ lệ % của các vùng có mức độ trùng lặp tốt nhất giữa các trình tự truy vấn và tra cứu (Pearson (2000) trên đây). Thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự của sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa số lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là chương trình BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Ví dụ, xem tài liệu: Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 và (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, mỗi tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo.

Cụm từ “lượng có hiệu quả điều trị” có nghĩa là lượng tạo ra hiệu quả mong muốn khi lượng này được sử dụng. Lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích của việc điều trị, và sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết (ví dụ, xem tài liệu: Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” để chỉ động vật, tốt hơn là động vật có vú, cần có sự cải thiện, phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn như bệnh nhiễm virus, hoặc bệnh ung thư. Thuật ngữ này bao gồm các đối tượng là người có hoặc có nguy cơ mắc bệnh ung thư, bệnh ung thư di căn hoặc bệnh nhiễm virus.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược chất kháng bệnh ung thư” có nghĩa là chất bất kỳ hữu ích để điều trị hoặc cải thiện hoặc ức chế bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độc tố tế bào và các chất như chất chống chuyển hóa, chất alkyl hóa, anthracyclin, chất kháng sinh, chất chống nguyên phân, procarbazine, hydroxyurea, asparaginase, corticosteroid, cyclophosphamide, mitotane (O,P'-(DDD)), các chất sinh học (ví dụ, các kháng thể và interferon) và chất có hoạt tính phóng xạ. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “độc tố tế bào hoặc chất gây độc tế bào”, còn để chỉ chất hóa trị liệu và có nghĩa là chất bất kỳ có hại cho tế bào. Các ví dụ bao gồm Taxol® (paclitaxel), temozolamide, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetin, cisplatin, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristine,

vinbiastine, coichicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthraxin dion, mitoxantron, mithramyxin, actinomycin D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoid, procain, tetracain, lidocain, propranolol, và puromyxin và các chất tương tự hoặc thể đồng dạng của chúng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược chất kháng virus” để chỉ dược chất hoặc liệu pháp bất kỳ được sử dụng để điều trị, phòng ngừa, hoặc cải thiện bệnh nhiễm virus ở đối tượng là vật chủ. Thuật ngữ “dược chất kháng virus” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, zidovudine, lamivudine, abacavir, ribavirin, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirine, thuốc giảm đau và corticosteroid. Trong ngữ cảnh của sáng chế, các bệnh nhiễm virus bao gồm các bệnh nhiễm khuẩn do virus gây ra trong thời gian dài hoặc mạn tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus gây suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus: HIV), virus viêm gan B (hepatitis B virus: HBV), virus viêm gan C (hepatitis C virus: HCV), virus gây u nhú ở người (human papilloma virus: HPV), virus gây viêm màng não đám rối màng mạch tế bào lymphô (lymphocytic choriomeningitis virus: LCMV), và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (simian immunodeficiency virus: SIV).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tăng cường đáp ứng miễn dịch”, để chỉ sự gia tăng hoạt tính của tế bào miễn dịch như tế bào T hoặc tế bào NK kháng lại tế bào khối u hoặc tế bào đã nhiễm virus. Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ này bao gồm việc phong bế sự ức chế hoạt tính của tế bào T qua trung gian CTLA-4, hoặc khôi phục hoặc đảo ngược tình trạng cạn kiệt của các tế bào T. Thuật ngữ này cũng bao gồm sự ức chế hoạt tính của tế bào T điều hòa. Khi được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế, đáp ứng miễn dịch được tăng cường dẫn đến làm gia tăng mức độ tiêu diệt tế bào khối u và/hoặc mức độ ức chế sự phát triển của khối u.

Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của sáng chế gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 và làm gia tăng sự hoạt hóa tế bào T. Các kháng thể kháng CTLA-4 có thể gắn kết với CTLA-4 với ái lực cao hoặc ái lực thấp. Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế có thể phong bế các kháng thể trong đó các kháng thể này có thể gắn kết với CTLA-4 và ức chế sự truyền tín hiệu CTLA-4. Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với CD80 và/hoặc CD86 và/hoặc kích thích hoặc làm gia tăng mức độ hoạt hóa tế bào T. Theo một số

phương án, các kháng thể gắn kết với CTLA-4 và làm đảo ngược trạng thái vô ứng của các tế bào T đã cạn kiệt. Theo một số phương án, các kháng thể gắn kết với CTLA-4 và ức chế hoạt tính của tế bào T điều hòa. Theo một số phương án, các kháng thể có thể hữu ích để kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc để điều trị cho đối tượng mắc bệnh ung thư, hoặc bệnh nhiễm virus. Khi các kháng thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị có thể làm giảm bệnh nhiễm khuẩn mạn tính do virus như HIV, LCMV hoặc HBV gây ra ở đối tượng. Chúng có thể được sử dụng để ức chế sự phát triển của các tế bào khối u ở đối tượng. Chúng có thể được sử dụng một mình hoặc dưới dạng liệu pháp kết hợp với các gốc hoặc phương thức điều trị khác đã biết trong lĩnh vực này để điều trị bệnh ung thư, hoặc bệnh nhiễm virus.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 có thể là các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu, trong đó chúng có tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với CTLA-4 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng ức chế tế bào T khác, và epitop khác của CTLA-4.

Chất sinh miễn dịch chứa thành phần bất kỳ trong số các thành phần sau có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể với CTLA-4. Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế thu được từ chuột được gây miễn dịch bằng CTLA-4 tự nhiên, có chiều dài đầy đủ (xem mã số truy cập NCBI NP_005205.2) (SEQ ID NO: 505), hoặc bằng peptit CTLA-4 tái tổ hợp. Theo cách khác, CTLA-4 hoặc mảnh của nó có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh hoá chuẩn và được sử dụng làm chất sinh miễn dịch.

Theo một số phương án, chất sinh miễn dịch là miền ngoại bào của CTLA-4. Theo một phương án của sáng chế, chất sinh miễn dịch là mảnh của miền ngoại bào của CTLA-4.

Theo một số phương án, chất sinh miễn dịch có thể là peptit CTLA-4 tái tổ hợp được biểu hiện ở *E. coli* hoặc ở tế bào có nhân điển hình khác bất kỳ hoặc tế bào của động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO).

Theo một số phương án, các kháng thể gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các mảnh của các vùng đã nêu trên đây, hoặc các peptit kéo dài nằm ngoài các vùng đã chọn từ khoảng 5 đến khoảng 20 gốc axit amin từ một

trong hai, hoặc cả hai đầu tận cùng N hoặc C của các vùng được mô tả ở đây. Theo một số phương án, tổ hợp bất kỳ của các vùng đã nêu trên đây hoặc các mảnh của chúng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu với CTLA-4.

Các peptit có thể được cải biến để bao gồm sự bổ sung hoặc thay thế một số gốc để hướng đích hoặc nhằm mục đích liên hợp với các phân tử chất mang, như KLH. Ví dụ, xystein có thể được thêm vào ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của peptit, hoặc trình tự của nhóm liên kết có thể được thêm vào để tạo ra peptit dùng để liên hợp với, ví dụ, KLH để gây miễn dịch.

Một số kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có khả năng gắn kết với và làm trung hòa hoạt tính của CTLA-4, như được xác định bằng các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*. Khả năng gắn kết với và làm trung hòa hoạt tính của CTLA-4 của các kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm các thử nghiệm về sự gắn kết, hoặc thử nghiệm về hoạt tính, như được mô tả ở đây.

Các thử nghiệm *in vitro* làm ví dụ không giới hạn để xác định hoạt tính gắn kết được minh họa trong các ví dụ ở đây. Trong Ví dụ 3, ái lực gắn kết và hằng số động học của các kháng thể kháng CTLA-4 của người đối với CTLA-4 của người và khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc MASS-1. Trong Ví dụ 4, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) kiểu kẹp giữa cạnh tranh được sử dụng để đánh giá khả năng phong bế sự gắn kết của protein CTLA-4 với các phối tử tự nhiên của nó B7-1 và B7-2 của các kháng thể kháng CTLA-4. Ví dụ 5 mô tả sự gắn kết của các kháng thể kháng CTLA-4 với các tế bào biểu hiện CTLA-4. Trong Ví dụ 6, thử nghiệm luciferaza và thử nghiệm giải phóng IL-2 được sử dụng để xác định khả năng hoạt hóa tế bào T và khôi phục sự giải phóng IL-2 của các kháng thể kháng CTLA-4.

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

Các kháng thể đặc hiệu với CTLA-4 có thể không chứa nguyên tử đánh dấu hoặc gốc bổ sung, hoặc chúng có thể chứa nguyên tử đánh dấu hoặc gốc, ví dụ, nguyên tử đánh dấu hoặc gốc ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Theo một phương án, nguyên tử đánh dấu hoặc gốc là biotin. Trong thử nghiệm gắn kết, vị trí của nguyên tử đánh dấu (nếu có) có thể xác định sự định hướng của peptit so với bề mặt mà peptit được gắn kết trên đó. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ bằng avidin, peptit chứa biotin ở đầu tận cùng N sẽ được định hướng sao cho phần ở đầu tận cùng C của peptit sẽ ở xa bề mặt này. Theo một phương án, nguyên tử đánh dấu có thể là chất đồng vị phóng xạ, thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc nguyên tử đánh dấu có thể phát hiện bằng phương pháp MRI. Theo một số phương án, các kháng thể được đánh dấu này có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán bao gồm cả các thử nghiệm bằng chụp hình ảnh.

Các phương án làm ví dụ của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4 của người (CTLA-4) và phong bế sự tương tác giữa hCTLA-4 và các phối tử B7-1 và B7-2.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gây ra sự hoạt hóa tế bào T. Trong một số trường hợp, tế bào T là tế bào T gây độc tế bào. Trong một số trường hợp, tế bào T là tế bào lymphô thâm nhiễm khối u.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với CTLA-4 của khỉ. Trong một số trường hợp, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với tế bào biểu hiện CTLA-4 của khỉ với nồng độ EC50 nhỏ hơn 0,5nM.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với các tế bào biểu hiện hCTLA-4 với nồng độ EC50 nhỏ hơn 5nM, nhỏ hơn 1nM, hoặc nhỏ hơn 0,5nM.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên là kháng thể của người có chiều dài đầy đủ.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó

cạnh tranh gắn kết với CTLA-4 của người với kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, và 490/498.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với cùng epitop trên CTLA-4 của người dưới dạng kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, và 490/498.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chứa: (a) vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474, và 490; và (b) vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482, và 498.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chứa các vùng CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/298, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434, 442/450, 458/466, 474/482, và 490/498.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 tương ứng được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-

44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; 132-134-136-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-204-206-208; 212-214-216-220-222-224; 228-230-232-236-238-240; 244-246-248-252-254-256; 260-262-264-268-270-272; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-300-302-304; 308-310-312-300-302-304; 316-318-320-324-326-328; 332-334-336-340-342-344; 348-350-352-356-358-360; 364-366-368-372-374-376; 380-382-384-388-390-392; 396-398-400-404-406-408; 412-414-416-420-422-424; 428-430-432-436-438-440; 444-446-448-452-454-456; 460-462-464-468-470-472; 476-478-480-484-486-488; và 492-494-496-500-502-504.

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

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

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu bao gồm tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 và tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với epitop đích thứ hai.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử polynucleotit được phân lập và các vector chứa trình tự polynucleotit của các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng

nguyên của nó được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử polynucleotit được phân lập và/hoặc vectơ chứa trình tự polynucleotit mã hóa vùng HCVR của kháng thể như được nêu ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử polynucleotit được phân lập và/hoặc vectơ chứa trình tự polynucleotit mã hóa vùng LCVR của kháng thể như được nêu ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào biểu hiện các vectơ được bàn luận trên đây hoặc ở đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị bằng cách tạo đối kháng CTLA-4 bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây, hoặc được phẩm chứa các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này. Trong một số trường hợp, bệnh hoặc rối loạn là bệnh nhiễm virus mạn tính do virus được chọn từ nhóm bao gồm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus viêm gan C (HCV), virus viêm gan B (HBV), virus gây u nhú ở người (HPV), virus gây viêm màng não đám rối màng mạch tế bào lymphô (LCMV) và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV) gây ra. Trong một số trường hợp, bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư da, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, u lymphô tế bào B, và u melanin.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng được phẩm chứa kháng thể kháng CTLA-4 được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp ức chế tế bào T điều hòa (Treg) ở đối tượng bao gồm bước sử dụng được phẩm chứa kháng thể kháng CTLA-4 được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp làm gia tăng mức độ hoạt hóa tế bào T ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng được phẩm chứa kháng thể kháng CTLA-4 được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như

được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, caxinom tế bào thận (ví dụ, caxinom tế bào thận thể tế bào sáng), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), bệnh ung thư da, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tụy, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, u lymphô (ví dụ, u lymphô tế bào B, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa) và u melanin. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh nhiễm virus mạn tính do virus được chọn từ nhóm bao gồm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus viêm gan C (HCV), virus viêm gan B (HBV), virus gây u nhú ở người (HPV), virus gây viêm màng não đám rối màng mạch tế bào lymphô (LCMV) và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV) gây ra. Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng cho đối tượng kết hợp với chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế PD-1, chất ức chế LAG3, kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu khối u, kháng thể với kháng nguyên tế bào đã nhiễm virus, chất ức chế PD-L1, chất ức chế CD20, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 và CD3, thực phẩm chức năng như chất chống oxy hóa, chất đối kháng VEGF, vacxin kháng bệnh ung thư, chất hóa trị liệu, chất gây độc tế bào, phẫu thuật, xạ trị, NSAID, corticosteroid, và liệu pháp khác bất kỳ hữu ích để cải thiện ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc rối loạn này.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp ức chế sự phát triển của khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây, hoặc được phẩm chứa các kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, khối u là khối u nguyên phát hoặc tái phát. Theo một số phương án, khối u là khối u đã tạo thành. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh di căn và/hoặc đã được điều trị bằng liệu pháp trước đó. Theo một số phương án, khối u có mặt ở đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền

liệt, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, u lymphô, và u melanin. Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng dưới dạng một hoặc nhiều liều trong đó mỗi liều được sử dụng sau liều ngay trước đó từ 1 đến 12 tuần. Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/kg thể trọng đến khoảng 100 mg/kg thể trọng của đối tượng. Theo một số phương án, mỗi liều chứa kháng thể với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 50mg đến khoảng 1000mg. Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng cho đối tượng kết hợp với chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế PD-1, chất ức chế LAG3, kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu khối u, chất ức chế PD-L1, chất ức chế CD20, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 và CD3, thực phẩm chức năng như chất chống oxy hóa, chất đối kháng VEGF, vacxin kháng bệnh ung thư, chất hóa trị liệu, chất gây độc tế bào, phẫu thuật, xạ trị, NSAID, corticosteroid, và liệu pháp khác bất kỳ hữu ích để cải thiện ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc rối loạn. Theo một phương án, chất điều trị thứ hai là chất ức chế PD-1 trong đó chất ức chế PD-1 là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để gắn kết đặc hiệu với PD-1. Theo một số phương án, chất ức chế PD-1 là REGN2810, nivolumab hoặc pembrolizumab. Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng qua đường dưới da, trong tĩnh mạch, trong khối u, quanh khối u, trong chân bì, trong màng bụng, qua đường miệng, trong cơ, hoặc trong sọ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp khôi phục sự ức chế hoạt tính của tế bào T qua trung gian CTLA-4 bao gồm bước cho tế bào T tiếp xúc với kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây. Theo một phương án, tế bào T được cho tiếp xúc với kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (ví dụ, REGN2810).

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây, hoặc được phẩm chứa các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này, trong việc điều trị bệnh

hoặc rối loạn có thể điều trị bằng cách tạo đối kháng CTLA-4. Trong một số trường hợp, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây, hoặc được phẩm chứa các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này, trong việc sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị bằng cách tạo đối kháng CTLA-4. Trong một số trường hợp, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư.

Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể

Trừ khi được chỉ rõ cụ thể theo cách khác, khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" sẽ được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể chứa hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch (nghĩa là "các phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ") cũng như các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, và thuật ngữ tương tự, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên bất kỳ, có thể thu được bằng phương pháp enzym, tổng hợp, hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể" để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với CTLA-4. Mảnh kháng thể có thể bao gồm mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, mảnh Fv, mảnh dAb, mảnh chứa vùng CDR, hoặc CDR được phân lập. Theo một số phương án, thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên" để chỉ mảnh polypeptit của phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu. Các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể thu được từ, ví dụ, các phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như kỹ thuật phân giải protein hoặc kỹ thuật thiết kế di truyền tái tổ hợp bao gồm bước xử lý và biểu hiện ADN mã hóa các miền biến đổi và (tùy ý) ổn định của kháng thể. ADN này là đã biết và/hoặc có thể mua được dễ dàng, ví dụ, từ các nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện kháng thể-thể thực khuẩn), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và xử lý bằng phương pháp hóa 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 ổn định vào cấu hình thích hợp, hoặc để đưa codon vào, tạo ra các gốc xystein, cải biến, bổ sung hoặc loại bỏ các axit amin, v.v..

Ví dụ không làm giới hạn 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 Fv chuỗi đơn (single-chain Fv: scFv); (vi) các mảnh dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết tối thiểu gồm các gốc axit amin bắt chước vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Các phân tử được thiết kế khác, như các kháng thể đặc hiệu miền, các kháng thể miền đơn, các kháng thể bị khuyết đoạn miền, các kháng thể thể khảm, các kháng thể được ghép vùng CDR, kháng thể hai mảnh, kháng thể ba mảnh, kháng thể bốn mảnh, kháng thể nhỏ, kháng thể nano (ví dụ kháng thể nano hóa trị một, kháng thể nano hóa trị hai, v.v.), các dược phẩm có hoạt tính miễn dịch mô đun nhỏ (small modular immunopharmaceuticals: SMIPs), và các miền IgNAR biến đổi của cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên", khi được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi này có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và sẽ thường chứa ít nhất một vùng CDR, vùng này liền kề với hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các mảnh gắn kết kháng nguyên có miền V_H liên quan với miền V_L , các miền V_H và V_L này có thể được bố trí tương đối với nhau theo sự sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Theo cách khác, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền monome V_H hoặc V_L .

Theo một số phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền ổn định. Các cấu hình làm ví dụ không giới hạn của các miền biến đổi và ổn định có thể được tìm thấy trong mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; và (xiv) V_L - C_L . Theo cấu hình bất kỳ của

các miền biến đổi và ổn định, bao gồm cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình làm ví dụ đã liệt kê trên đây, các miền biến đổi và ổn định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bằng vùng bản lề hoặc vùng liên kết một phần hoặc hoàn toàn. Vùng bản lề có thể gồm ít nhất 2 axit amin (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) mà sẽ tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa các miền biến đổi và/hoặc ổn định liền kề trong phân tử polypeptit đơn. Ngoài ra, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa homo-dime hoặc hetero-dime (hoặc các multime khác) của cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình của miền biến đổi và ổn định đã liệt kê trên đây trong liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với các phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ, các mảnh gắn kết kháng nguyên có thể là mảnh đặc hiệu đơn hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể sẽ thường chứa 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 trên cùng kháng nguyên. Định dạng kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, bao gồm các định dạng kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ được bộc lộ ở đây, có thể được làm thích ứng để sử dụng trong ngữ cảnh của mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường có thể sử dụng trong lĩnh vực này.

Tạo ra kháng thể của người

Phương pháp tạo ra các kháng thể của người ở chuột chuyển gen là đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp đã biết bất kỳ này có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế để tạo ra các kháng thể của người gắn kết đặc hiệu với CTLA-4.

Bằng cách sử dụng kỹ thuật VELOCIMMUNE® (ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc phương pháp đã biết khác bất kỳ để tạo ra các kháng thể đơn dòng, các kháng thể thể khảm có ái lực cao với CTLA-4 được phân lập ban đầu có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột. Kỹ thuật VELOCIMMUNE® liên quan đến việc tạo ra chuột chuyển gen có hệ gen chứa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của

người được liên kết hoạt động với locut vùng ổn định của chuột nội sinh sao cho chuột này tạo ra kháng thể chứa vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. ADN mã hóa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lập và được liên kết hoạt động với ADN mã hóa vùng ổn định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người. Sau đó, ADN được biểu hiện trong tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể của người có chiều dài đầy đủ.

Nói chung, chuột theo công nghệ VELOCIMMUNE® được thử thách bằng kháng nguyên quan tâm, và các tế bào bạch huyết (như các tế bào B) được thu hồi từ chuột biểu hiện các kháng thể. Các tế bào bạch huyết có thể được dung hợp với dòng tế bào u tủy để tạo ra dòng tế bào lai bất tử, và các dòng tế bào lai này được sàng lọc và chọn lọc để xác định các dòng tế bào lai sản sinh ra các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên quan tâm. ADN mã hoá các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập và liên kết với các vùng ổn định isotyp mong muốn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này. Protein của kháng thể này có thể được sản sinh trong tế bào, như tế bào CHO. Theo cách khác, ADN mã hóa các kháng thể thể khảm đặc hiệu kháng nguyên hoặc các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập trực tiếp từ các tế bào lymphô đặc hiệu kháng nguyên.

Ban đầu, các kháng thể thể khảm có ái lực cao được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột. Như trong phần ví dụ dưới đây, các kháng thể được xác định tính chất và chọn lọc đối với các đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, epitop, v.v.. Các vùng ổn định của chuột được thay thế bằng vùng ổn định của người mong muốn để tạo ra kháng thể của người có chiều dài đầy đủ theo sáng chế, ví dụ, IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được cải biến. Trong khi vùng ổn định được chọn có thể thay đổi theo ứng dụng cụ thể, các đặc tính về sự gắn kết kháng nguyên ái lực cao và tính đặc hiệu hướng đích tập trung trong vùng biến đổi.

Chất tương đương sinh học

Các kháng thể kháng CTLA-4 và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có trình tự axit amin khác với trình tự của các kháng thể được mô tả, nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết với CTLA-4. Các kháng thể và mảnh kháng thể của biến thể này bao gồm một hoặc nhiều sự bổ sung, làm khuyết đoạn hoặc thay thế axit

amin khi so sánh với trình tự gốc, nhưng có hoạt tính sinh học về cơ bản là tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể được mô tả. Tương tự, các trình tự ADN mã hóa kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự chứa một hoặc nhiều sự bổ sung, làm khuyết đoạn hoặc thay thế nucleotit khi so sánh với trình tự được bộc lộ, nhưng mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể là gần như tương đương sinh học với kháng thể hoặc mảnh kháng thể của sáng chế.

Hai protein gắn kết kháng nguyên, hoặc các kháng thể, được cho là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là chất tương đương về mặt dược học hoặc chất thay thế về mặt dược học có tỷ lệ và mức độ hấp thu không có sự khác biệt đáng kể khi được sử dụng với cùng liều mol trong các điều kiện thử nghiệm tương tự, ở dạng liều đơn hoặc đa liều. Một số kháng thể sẽ được cho là chất tương đương hoặc chất thay thế về mặt dược học nếu chúng tương đương về mức độ hấp thu nhưng vẫn có thể được cho là chất tương đương sinh học do sự khác biệt về tỷ lệ hấp thu là có chủ ý và được thể hiện trên nhãn sản phẩm, là không cần thiết để đạt được nồng độ dược chất trong cơ thể hữu hiệu, ví dụ, khi sử dụng kéo dài, và được cho là không quan trọng về mặt y tế đối với sản phẩm dược chất cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là chất tương đương sinh học nếu không có sự khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết, hoặc hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là chất tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể chuyển đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ có tác dụng phụ dự kiến, bao gồm cả sự thay đổi đáng kể trong lâm sàng về tính gây miễn dịch, hoặc hiệu quả giảm, so với liệu pháp liên tục mà không có sự chuyển đổi này.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là chất tương đương sinh học nếu chúng đều tác dụng theo cơ chế thông thường hoặc cơ chế tác dụng đối với một hoặc nhiều điều kiện sử dụng, đến mức sao cho các cơ chế này là đã biết.

Mức độ tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Các phương pháp tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc các chất chuyển hóa của nó được xác định trong máu, huyết tương, huyết

thanh hoặc các dịch sinh học khác dưới dạng hàm số theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* có tương quan với và là yếu tố tiên lượng hợp lý về số liệu sinh khả dụng *in vivo* của người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác trong đó hiệu quả dược lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định dưới dạng hàm số theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát chặt chẽ để thiết lập độ an toàn, hiệu quả, hoặc độ sinh khả dụng hoặc mức độ tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc, ví dụ, bằng cách tạo ra sự thay thế khác nhau của các gốc hoặc trình tự hoặc loại bỏ các gốc hoặc trình tự ở đầu tận cùng hoặc ở bên trong phân tử không cần thiết cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein không thiết yếu đối với hoạt tính sinh học có thể bị loại bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo ra các liên kết cầu disulfua nội phân tử không cần thiết hoặc không chính xác khi hồi tính. Trong các trường hợp khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể chứa sự thay đổi axit amin, để cải biến các đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, các đột biến loại trừ hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Các kháng thể kháng CTLA-4 chứa biến thể Fc

Theo một số phương án của sáng chế, các kháng thể kháng CTLA-4 được đề xuất chứa miền Fc có chứa một hoặc nhiều đột biến làm gia tăng hoặc làm giảm sự gắn kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở độ pH axit so với độ pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 chứa sự đột biến trong vùng C_{H2} hoặc C_{H3} của miền Fc, trong đó các đột biến này làm gia tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong thể nhân mà ở đó độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0). Các đột biến này có thể dẫn đến làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể khi được sử dụng cho động vật. Ví dụ không làm giới hạn về các cải biến miền Fc này bao gồm, ví dụ, sự 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 sự 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 sự cải biến ở vị trí 250 và/hoặc

428; hoặc sự cải biến ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, sự cải biến bao gồm sự cải biến 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); sự cải biến 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); sự cải biến 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); sự cải biến 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); sự cải biến 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và sự cải biến 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo phương án khác nữa, sự cải biến bao gồm sự cải biến 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 chứa miền Fc có một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm đột biến được chọn từ nhóm bao gồm: 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 các kháng thể kháng CTLA-4 chứa miền Fc có sự đột biến S108P trong vùng bản lề của IgG4 để kích thích sự ổn định dime. Toàn bộ các tổ hợp có thể có của các đột biến miền Fc nêu trên, và các đột biến khác trong miền biến đổi của kháng thể được bộc lộ ở đây, được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 chứa vùng ổn định của chuỗi nặng (C_H) thể khảm, trong đó vùng C_H thể khảm bao gồm các đoạn có nguồn gốc từ vùng C_H của nhiều hơn một isotyp của globulin miễn dịch. Ví dụ, các kháng thể của sáng chế có thể chứa vùng C_H thể khảm bao gồm một phần hoặc toàn bộ miền C_{H2} có nguồn gốc từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được kết hợp với một phần hoặc toàn bộ miền C_{H3} có nguồn gốc từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế chứa vùng C_H thể khảm có vùng bản lề thể khảm. Ví dụ, vùng bản lề thể khảm có thể chứa trình tự axit amin ở vùng "bản lề phía trên" (các gốc axit amin từ vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số của EU) có nguồn gốc từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được kết hợp với trình tự ở vùng "bản lề phía dưới" (các gốc axit amin từ vị trí 228 đến 236 theo cách đánh số của EU) có nguồn gốc từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người.

Theo một số phương án, vùng bản lề thể khảm chứa các gốc axit amin có nguồn gốc từ vùng bản lề phía trên IgG1 của người hoặc IgG4 của người và các gốc axit amin có nguồn gốc từ vùng bản lề phía dưới IgG2 của người. Theo một số phương án, kháng thể chứa vùng C_H thể khảm như được mô tả ở đây có thể có các chức năng hiệu ứng của vùng F_c được cải biến mà không làm ảnh hưởng bất lợi cho đặc tính điều trị hoặc được động học của kháng thể. (Ví dụ, xem công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 20140243504, phần mô tả của tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo nội dung của nó).

Đặc tính sinh học của kháng thể

Nói chung, các kháng thể của sáng chế thực hiện chức năng bằng cách gắn kết với CTLA-4. Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với các phân tử CTLA-4 monome hoặc dime hòa tan với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể gắn kết với CTLA-4 dime của người và khỉ (ví dụ, ở nhiệt độ 25°C) với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 20nM khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với CTLA-4 monome với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 1nM, khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với CTLA-4 với thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 4 phút khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của sáng chế gắn kết với CTLA-4 với thời gian $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 15 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn

khoảng 200 phút, lớn hơn khoảng 300 phút, hoặc lớn hơn khoảng 500 phút, khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây (ví dụ, định dạng bắt giữ mAb), hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của hCTLA-4 với hB7-1 (CD80) và/hoặc hB7-2 (CD86) với nồng độ IC_{50} nhỏ hơn khoảng 320nM khi được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết enzym (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA), ví dụ, như được thể hiện trong Ví dụ 4, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của hCTLA-4 với B7-1 của người và/hoặc B7-2 của người với nồng độ IC_{50} nhỏ hơn khoảng 200nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 70nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,5nM, khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa cạnh tranh, ví dụ, như được xác định trong Ví dụ 4 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự gắn kết của hCTLA-4 với B7-1 của người và/hoặc B7-2 của người ít nhất 85% khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa cạnh tranh, ví dụ, như được xác định trong Ví dụ 4 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với tế bào biểu hiện CTLA-4 của người với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 6nM khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với tế bào biểu hiện hCTLA-4 với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 4nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,5nM, khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với tế bào biểu hiện hCTLA-4 với tỷ lệ cao hơn khoảng 10 lần so với sự gắn kết với tế bào đối chứng, với tỷ lệ cao hơn khoảng 15 lần,

hoặc với tỷ lệ cao hơn khoảng 20 lần so với sự gắn kết với tế bào đối chứng, khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với tế bào biểu hiện CTLA-4 của khỉ cynomolgus với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,5nM khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với tế bào biểu hiện mfCTLA-4-với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,5nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,2nM, khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 (bằng cách phong bế sự tương tác CTLA-4/CD80 và CTLA-4/CD86) với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn 8nM khi được xác định bằng thử nghiệm gen thông báo luciferaza của tế bào T/APC như được xác định trong Ví dụ 6 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 6nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 3nM, nhỏ hơn khoảng 2,5nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 2nM, khi được xác định bằng thử nghiệm gen thông báo luciferaza của tế bào T/APC, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 6 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 của cả CTLA-4 của người và khỉ.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó khôi phục tác dụng ức chế sự giải phóng IL-2 qua trung gian CTLA-4 (bằng cách phong bế sự tương tác của CTLA-4/CD80 và CTLA-4/CD86) với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 50nM khi được xác định bằng thử nghiệm giải phóng IL-2 của tế bào T/APC như được xác định trong Ví dụ 6 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó khôi

phục tác dụng ức chế sự giải phóng IL-2 qua trung gian CTLA-4 với nồng độ EC_{50} nhỏ hơn khoảng 45nM, nhỏ hơn khoảng 35nM, nhỏ hơn khoảng 25nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 20nM, khi được xác định bằng thử nghiệm giải phóng IL-2 của tế bào T/APC, ví dụ, bằng cách sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 6 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 và/hoặc tác dụng ức chế sự giải phóng IL-2 qua trung gian CTLA-4 đối với cả CTLA-4 của người và khỉ. Theo một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4, khi được chứng minh bằng sự sản sinh IL-2, với tỷ lệ gấp từ 4 đến 6 lần so với sự sản sinh quan sát được đối với kháng thể đối chứng isotyp.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế hữu ích trong việc ức chế sự phát triển của khối u hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh ung thư khi được sử dụng theo cách dự phòng cho đối tượng cần điều trị và có thể làm tăng thời gian sống của đối tượng. Ví dụ, việc sử dụng kháng thể của sáng chế có thể dẫn đến làm thu nhỏ khối u nguyên phát và có thể ngăn ngừa sự di căn hoặc sự phát triển của khối u thứ phát. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế hữu ích trong việc ức chế sự phát triển của khối u khi được sử dụng theo cách điều trị cho đối tượng cần điều trị và có thể làm tăng thời gian sống của đối tượng. Ví dụ, việc sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của kháng thể theo sáng chế cho đối tượng có thể dẫn đến làm thu nhỏ và sự biến mất của khối u đã tạo thành ở đối tượng. Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế được sử dụng qua đường khu trú (trong khối u hoặc quanh khối u) và dẫn đến ức chế sự phát triển của khối u trong tổn thương khối u đã tiêm và trong các tổn thương khối u ở xa (hiệu ứng ngoài mục tiêu).

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với CTLA-4, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có một hoặc nhiều đặc điểm sau: (i) chứa vùng HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474, và 490, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất

95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa vùng LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482, và 498, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 320, 336, 352, 368, 384, 400, 416, 432, 448, 464, 480, và 496, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 328, 344, 360, 376, 392, 408, 424, 440, 456, 472, 488, và 504, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 316, 332, 348, 364, 380, 396, 412, 428, 444, 460, 476, và 492, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 318, 334, 350, 366, 382, 398, 414, 430, 446, 462, 478, và 494, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 324, 340, 356, 372, 388, 404, 420, 436, 452, 468, 484, và 500, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 326, 342, 358, 374, 390, 406, 422, 438, 454, 470, 486, và 502, hoặc trình tự gần như tương tự của chúng có mức độ giống về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) gắn kết

với CTLA-4 dime của người và khi với hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) nhỏ hơn khoảng 20nM khi được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C; (vi) gắn kết với CTLA-4 dime của người và khi với thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 4 phút khi được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C; (vii) phong bế sự gắn kết của hCTLA-4 với hB7-1 (CD80) và/hoặc hB7-2 (CD86) với nồng độ IC₅₀ nhỏ hơn khoảng 320 nM khi được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bám dính tế bào; (viii) phong bế sự gắn kết của hCTLA-4 với B7-1 của người và/hoặc B7-2 của người ít nhất 85% khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa cạnh tranh; (ix) gắn kết với tế bào biểu hiện CTLA-4 của người với nồng độ EC₅₀ nhỏ hơn khoảng 6nM khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa; (x) gắn kết với tế bào biểu hiện hCTLA-4 với tỷ lệ cao hơn 10 lần so với sự gắn kết với các tế bào đối chứng; (xi) gắn kết với tế bào biểu hiện CTLA-4 của khi với nồng độ EC₅₀ nhỏ hơn khoảng 0,5 nM khi được xác định bằng thử nghiệm phát quang điện hóa; (xii) phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 với nồng độ EC₅₀ nhỏ hơn 8 nM khi được xác định bằng thử nghiệm gen thông báo luciferaza của tế bào T/APC; (xiii) phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 của cả CTLA-4 của người và khi; (xiv) khôi phục tác dụng ức chế sự giải phóng IL-2 qua trung gian CTLA-4 với nồng độ EC₅₀ nhỏ hơn khoảng 50nM khi được xác định trong thử nghiệm giải phóng IL-2 của tế bào T/APC; (xv)) phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4 và/hoặc tác dụng ức chế sự giải phóng IL-2 qua trung gian CTLA-4 đối với cả CTLA-4 của người và khi; (xvi) phong bế sự điều hòa giảm của tế bào T do CTLA-4, như được chứng minh bằng sự sản sinh IL-2, với tỷ lệ cao hơn từ 4 đến 6 lần so với mức độ quan sát được đối với kháng thể đối chứng isotop; (xvii) ức chế sự phát triển của khối u làm tăng tỷ lệ sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư, và (xviii) là kháng thể của người có chiều dài đầy đủ.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc điểm sinh học đã nêu trên đây hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Các đặc điểm sinh học khác của kháng thể theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi xem xét phần mô tả bao gồm cả các ví dụ thực hiện trong bản mô tả này.

Tính chọn lọc loài và khả năng phản ứng chéo của các loài

Theo một số phương án của sáng chế, các kháng thể kháng CTLA-4 gắn kết với CTLA-4 của người nhưng không gắn kết với CTLA-4 từ các loài khác. Theo cách khác, các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế, theo một số phương án, gắn kết với CTLA-4 của người và với CTLA-4 từ một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế có thể gắn kết với CTLA-4 của người và có thể gắn kết hoặc không gắn kết với, như trường hợp này có thể là, với một hoặc nhiều CTLA-4 của chuột, chuột nhắt, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò cái, ngựa, lạc đà, khỉ cynomolgus, khỉ marmoset, khỉ rhesus hoặc hắc tinh tinh. Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế có thể gắn kết với CTLA-4 của khỉ cynomolgus và người với ái lực giống nhau hoặc khác nhau, nhưng không gắn kết với CTLA-4 của chuột và chuột nhắt.

Lập bản đồ epitop và các kỹ thuật liên quan

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 tương tác với một hoặc nhiều axit amin được tìm thấy trong một hoặc nhiều miền của phân tử CTLA-4 bao gồm, ví dụ, miền ngoại bào, miền xuyên màng, và miền chất tế bào. Epitop mà các kháng thể gắn kết với có thể gồm trình tự liên kế đơn lẻ của 3 axit amin hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) nằm trong miền bất kỳ trong số các miền nêu trên của phân tử CTLA-4 (ví dụ, epitop mạch thẳng trong miền). Theo cách khác, epitop có thể gồm nhiều axit amin (hoặc các trình tự axit amin) không liên kế nằm trong miền bất kỳ hoặc tất cả các miền nêu trên của phân tử CTLA-4 (ví dụ, epitop cấu dạng).

Các kỹ thuật khác nhau đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định xem một kháng thể có thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" hay không trong polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật làm ví dụ bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm phong bế chéo thông thường, như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Các phương pháp khác bao gồm phân tích đột biến quét alanin, phân tích thâm tách peptit (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), phân tích phân giải peptit, các nghiên cứu tinh thể học và phân tích NMR. Ngoài ra, các

phương pháp như phân cắt epitop, chiết epitop và cải biến hóa học kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định các axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với là phương pháp trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng phương pháp phổ khối lượng. Theo các thuật ngữ chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm bước đánh dấu protein quan tâm bằng đoteri, sau đó gắn kết kháng thể với protein đã đánh dấu bằng đoteri này. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và các proton có thể trao đổi trong các axit amin được bảo vệ bằng phức hợp kháng thể được trao đổi ngược đoteri thành hydro với tỷ lệ thấp hơn so với các proton có thể trao đổi trong các axit amin không là một phần của mặt phân cách. Kết quả là các axit amin tạo ra phần mặt phân cách của protein/kháng thể có thể vẫn giữ được đoteri và do đó có khối lượng tương đối cao hơn so với các axit amin không được đưa vào mặt phân cách. Sau khi phân ly kháng thể, protein đích được phân giải bằng proteaza và phân tích phổ khối lượng, nhờ đó cho thấy các gốc được đánh dấu bằng đoteri tương ứng với các axit amin cụ thể mà kháng thể tương tác với. Ví dụ, xem tài liệu: Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Thuật ngữ "epitop" để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc tế bào T đáp ứng với. Các epitop tế bào B có thể được tạo ra từ cả các axit amin liên kế hoặc các axit amin không liên kế nhưng nằm cạnh nhau bởi sự cuộn gấp bậc ba của protein. Các epitop được tạo ra từ các axit amin liên kế thường được giữ lại khi tiếp xúc với các dung môi làm biến tính, trong khi các epitop được tạo ra bởi sự cuộn gấp bậc ba thường biến mất khi xử lý bằng các dung môi làm biến tính. Một epitop thường bao gồm ít nhất 3, và thông thường hơn là bao gồm ít nhất 5 hoặc từ 8 đến 10 axit amin trong cấu hình không gian duy nhất.

Phương pháp lập profin được hỗ trợ bằng sự cải biến (Modification-Assisted Profiling: MAP), còn được gọi là phương pháp lập profin của kháng thể dựa trên cấu trúc kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling: ASAP) là phương pháp phân loại số lượng lớn các kháng thể đơn dòng (mAb) kháng lại cùng một kháng nguyên theo tính tương tự về profin gắn kết của mỗi kháng thể với bề mặt kháng nguyên được cải biến bằng phương pháp hóa học hoặc enzym (xem Công bố đơn đăng

ký sáng chế Mỹ số US 2004/0101920, tài liệu này được viện dẫn cụ thể ở đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó). Mỗi nhóm có thể thể hiện một epitop duy nhất khác biệt hoàn toàn hoặc chồng lấp một phần với epitop được thể hiện bằng một nhóm khác. Kỹ thuật này cho phép lọc nhanh các kháng thể giống nhau về mặt di truyền, sao cho việc xác định tính chất có thể được tập trung vào các kháng thể khác biệt về mặt di truyền. Khi được sử dụng để sàng lọc tế bào lai, phương pháp MAP có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định tính chất của các dòng tế bào lai hiếm để tạo ra các kháng thể mAb có đặc tính mong muốn. Phương pháp MAP có thể được sử dụng để phân loại các kháng thể của sáng chế thành các nhóm kháng thể gắn kết với các epitop khác nhau.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với epitop trong một hoặc nhiều vùng bất kỳ được ví dụ trong CTLA-4, hoặc ở dạng tự nhiên, như được ví dụ trong trình tự SEQ ID NO: 505, hoặc được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp, hoặc với mảnh của chúng.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 gắn kết với cùng epitop, hoặc một phần của epitop này, như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ cụ thể được mô tả ở đây trong Bảng 1, hoặc kháng thể có trình tự vùng CDR của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ được mô tả trong Bảng 1. Tương tự, sáng chế còn bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 cạnh tranh gắn kết với CTLA-4 hoặc mảnh CTLA-4 với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ cụ thể được mô tả ở đây trong Bảng 1, hoặc kháng thể có trình tự vùng CDR của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể làm ví dụ được mô tả trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng CTLA-4 cạnh tranh chéo để gắn kết với CTLA-4 với một hoặc nhiều kháng thể như được ví dụ ở đây (ví dụ, H1H19303P hoặc H1H19319P2).

Có thể xác định dễ dàng liệu một kháng thể có gắn kết với cùng epitop như, hoặc cạnh tranh gắn kết với, kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, để xác định xem liệu kháng thể thử nghiệm có gắn kết với cùng epitop như kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu của sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu này được để gắn kết với protein hoặc peptit CTLA-4 trong điều kiện bão hòa. Sau đó, khả năng gắn kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử CTLA-4 được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả

năng gắn kết với CTLA-4 sau khi bão hòa sự gắn kết với kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm này gắn kết với epitop khác với kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng gắn kết với protein CTLA-4 sau khi bão hòa sự gắn kết với kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm này có thể được gắn kết bởi cùng epitop giống như epitop được gắn kết bởi kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu của sáng chế.

Để xác định xem liệu một kháng thể có cạnh tranh gắn kết với kháng thể kháng CTLA-4 tham chiếu hay không, phương pháp gắn kết đã mô tả trên đây được thực hiện theo hai sự định hướng: Theo sự định hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được để gắn kết với protein CTLA-4 trong điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá mức độ gắn kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử CTLA-4. Theo sự định hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được để gắn kết với phân tử CTLA-4 trong các điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá mức độ gắn kết của kháng thể tham chiếu với phân tử CTLA-4. Nếu theo cả hai sự định hướng, chỉ kháng thể thứ nhất (bão hòa) có khả năng gắn kết với phân tử CTLA-4, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể cạnh tranh gắn kết với CTLA-4. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, kháng thể cạnh tranh gắn kết với kháng thể tham chiếu có thể không cần phải gắn kết với epitop giống như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế về mặt không gian sự gắn kết của kháng thể tham chiếu bằng cách gắn kết với epitop chồng lên nhau hoặc liền kề.

Hai kháng thể gắn kết với cùng epitop hoặc epitop chồng lên nhau nếu mỗi kháng thể này ức chế (phong bế) cạnh tranh sự gắn kết của kháng thể còn lại với kháng nguyên. Nghĩa là lượng dư gấp 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế sự gắn kết của kháng thể còn lại ít nhất 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí là 99% như được xác định trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (ví dụ, xem tài liệu: Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng epitop nếu gần như tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ sự gắn kết của một kháng thể làm giảm hoặc loại bỏ sự gắn kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể có epitop chồng lên nhau nếu một số đột biến axit amin làm giảm hoặc loại bỏ sự gắn kết của một kháng thể làm giảm hoặc loại bỏ sự

gắn kết của kháng thể còn lại.

Sau đó, việc thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, phân tích sự gắn kết và đột biến của peptit) có thể được tiến hành để khẳng định liệu việc không quan sát được sự gắn kết của kháng thể thử nghiệm có thực sự là do sự gắn kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu hay không hoặc nếu sự phong bế về mặt không gian (hoặc hiện tượng khác) là nguyên nhân của việc không có sự gắn kết quan sát được hay không. Các thử nghiệm thuộc loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, RIA, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, phương pháp đếm tế bào theo dòng hoặc thử nghiệm gắn kết kháng thể định lượng hoặc định tính khác bất kỳ có thể sử dụng trong lĩnh vực này.

Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng CTLA-4 của người được liên hợp với gốc điều trị (“thể liên hợp miễn dịch”), như độc tố tế bào hoặc chất hóa trị liệu để điều trị bệnh ung thư. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể liên hợp miễn dịch” đề chỉ kháng thể được liên kết về mặt hóa học hoặc sinh học với độc tố tế bào, chất có hoạt tính phóng xạ, xytokin, interferon, đích hoặc gốc của gen thông báo, enzym, độc tố, peptit hoặc protein hoặc chất điều trị. Kháng thể có thể được liên kết với độc tố tế bào, chất có hoạt tính phóng xạ, xytokin, interferon, đích hoặc gốc của gen thông báo, enzym, độc tố, peptit hoặc chất điều trị ở vị trí bất kỳ dọc theo phân tử, miễn là kháng thể này có thể gắn kết với đích của nó. Ví dụ về các thể liên hợp miễn dịch bao gồm thể liên hợp kháng thể được chất và các protein dung hợp kháng thể-độc tố. Theo một phương án, chất nêu trên có thể là kháng thể thứ hai khác với CTLA-4. Theo một số phương án, kháng thể có thể được liên hợp với chất đặc hiệu với tế bào khối u hoặc tế bào đã nhiễm virus. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất đặc hiệu với tế bào T. Loại gốc điều trị có thể được liên hợp với kháng thể kháng CTLA-4 và sẽ tính đến tình trạng bệnh cần được điều trị và hiệu quả điều trị mong muốn cần đạt được. Ví dụ về các chất thích hợp để tạo ra thể liên hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực này; ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO 05/103081.

Kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa có thể đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền gắn kết kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một polypeptit đích. Ví dụ, xem tài liệu: Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó trong đó một tính đặc hiệu của globulin miễn dịch đặc hiệu với miền ngoại bào của CTLA-4, hoặc mảnh của nó, và tính đặc hiệu còn lại của globulin miễn dịch đặc hiệu với sự gắn kết nằm ngoài miền ngoại bào của CTLA-4, hoặc đích điều trị thứ hai, hoặc được liên hợp với gốc điều trị.

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

Theo một số phương án, các kháng thể đặc hiệu CTLA-4 được tạo ra theo định dạng đặc hiệu kép ("đặc hiệu kép") trong đó các vùng biến đổi gắn kết với miền khác biệt của CTLA-4 được liên kết cùng nhau để tạo ra tính đặc hiệu miền kép trong phân tử gắn kết đơn. Định dạng đặc hiệu kép được thiết kế thích hợp có thể làm gia tăng tổng hiệu quả ức chế CTLA-4 bằng cách làm gia tăng cả tính đặc hiệu và ái lực gắn kết. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với các miền riêng biệt, (ví dụ, các đoạn của miền ở đầu tận cùng N), hoặc đoạn có thể gắn kết với các vùng khác nhau trong một miền, được ghép cặp trên khung cấu trúc cho phép mỗi vùng gắn kết đồng thời với các epitop riêng biệt, hoặc với các vùng khác nhau ở trong một miền. Theo một ví dụ về các vùng biến đổi cuối nặng (V_H), đặc hiệu kép từ chất gắn kết có tính đặc hiệu đối với một miền được tái kết hợp với các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) từ loạt các chất gắn kết có tính đặc hiệu đối với miền thứ hai để xác định các đối tác V_L không cùng nguồn gốc có thể được ghép cặp với vùng V_H ban đầu mà không phá vỡ tính đặc hiệu ban đầu đối với vùng V_H này. Theo cách này, đoạn V_L đơn lẻ (ví dụ, V_{L1}) có thể được kết hợp với hai miền V_H khác nhau (ví dụ, V_{H1} và V_{H2}) để tạo ra dạng đặc hiệu kép gồm hai "nhánh" gắn kết (V_{H1} - V_{L1} và V_{H2} - V_{L1}). Việc sử dụng đoạn V_L đơn lẻ làm

giảm tính phức tạp của hệ thống và do đó làm đơn giản hóa và làm tăng hiệu quả trong các quy trình tách dòng, biểu hiện, và tinh chế được sử dụng để tạo ra dạng đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu USSN13/022759 và US2010/0331527).

Theo cách khác, các kháng thể gắn kết với nhiều hơn một miền và đích thứ hai như, nhưng không giới hạn ở, ví dụ, kháng thể kháng CTLA-4 thứ hai khác, có thể được tạo ra ở định dạng đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở đây, hoặc các kỹ thuật khác đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các vùng biến đổi của kháng thể gắn kết với các vùng khác biệt có thể được liên kết cùng nhau với các vùng biến đổi để gắn kết với các vị trí thích hợp trên, ví dụ, miền ngoại bào của CTLA-4, để tạo ra tính đặc hiệu kháng nguyên kép trong phân tử gắn kết đơn. Các dạng đặc hiệu kép được thiết kế thích hợp có tính chất này dùng làm chức năng kép. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với miền ngoại bào được kết hợp với vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với bên ngoài miền ngoại bào và được ghép cặp trên khung cấu trúc để cho phép mỗi vùng biến đổi gắn kết với các kháng nguyên riêng biệt.

Định dạng của kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm việc sử dụng miền C_H3 của globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_H3 của Ig thứ hai, trong đó các miền C_H3 của Ig thứ nhất và thứ hai khác nhau về ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác biệt ít nhất một axit amin này làm giảm mức độ gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác biệt axit amin này. Theo một phương án, miền C_H3 của Ig thứ nhất gắn kết với protein A và miền C_H3 của Ig thứ hai chứa sự đột biến làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết với protein A như sự cải biến H95R (theo cách đánh số exon của IMGT; H435R theo cách đánh số EU). Miền C_H3 thứ hai có thể chứa sự cải biến Y96F (theo cách đánh số IMGT; Y436F theo cách đánh số EU). Các cải biến khác có thể được tìm thấy trong miền C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo cách đánh số IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo cách đánh số EU) trong trường hợp các kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I theo cách đánh số EU) trong trường hợp các kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo cách đánh số IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K,

E419Q, và V422I theo cách đánh số EU) trong trường hợp các kháng thể IgG4. Các biến đổi đối với định dạng kháng thể đặc hiệu kép đã mô tả trên đây được dự định nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các định dạng đặc hiệu kép làm ví dụ khác có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, các định dạng đặc hiệu kép của kháng thể hai mảnh hoặc trên cơ sở scFv, thể dung hợp IgG-scFv, miền biến đổi kép (dual variable domain: DVD)-Ig, Quadroma, chỗ phình vào chỗ lõm, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường có chỗ phình vào chỗ lõm, v.v.), CrossMab, CrossFab, thể (SEED), khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác dụng kép, và các định dạng đặc hiệu kép Mab² (ví dụ, xem tài liệu: Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu tham khảo được nêu ở đây, để tham khảo các định dạng nêu trên). Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng sự liên hợp peptit/axit nucleic, ví dụ, trong đó các axit amin không tự nhiên có khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra các thể liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí mà sau đó tự ghép vào phức hợp multimer với thành phần, hóa trị và hình học xác định. (Ví dụ, xem tài liệu: Kazane *et al.*, J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Sử dụng trong điều trị và dạng bào chế

Sáng chế đề xuất các chế phẩm điều trị chứa các kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Chế phẩm điều trị theo sáng chế sẽ được sử dụng với chất mang, tá dược, và các chất khác thích hợp được đưa vào dạng bào chế để tạo ra sự vận chuyển, giải phóng, dung nạp và quá trình tương tự được cải thiện. Nhiều dạng bào chế thích hợp có thể được tìm thấy trong lĩnh vực bào chế là đã biết đối với tất cả các nhà hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dạng bào chế này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, gel, sáp, dầu, lipid, nang chứa lipid (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™), thể liên hợp ADN, bột nhão hấp thụ dạng khan, nhũ tương dầu trong nước và nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương carbowax (polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và các hỗn hợp bán rắn chứa carbowax. Xem thêm tài liệu: Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral

formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều của kháng thể có thể thay đổi tùy theo độ tuổi và thể trạng của đối tượng cần được điều trị, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường sử dụng, và yếu tố tương tự. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở bệnh nhân là người trưởng thành, hoặc để phòng ngừa bệnh này, có lợi nếu sử dụng kháng thể theo sáng chế thường là với liều đơn nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến khoảng 60 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 60, từ khoảng 20 đến khoảng 50, từ khoảng 10 đến khoảng 50, từ khoảng 1 đến khoảng 10, hoặc từ khoảng 0,8 đến khoảng 11 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ nặng của tình trạng bệnh, tần suất và khoảng thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng liều ban đầu ít nhất là nằm trong khoảng từ khoảng 0,1mg đến khoảng 800mg, từ khoảng 1 đến khoảng 500mg, từ khoảng 5 đến khoảng 300mg, hoặc từ khoảng 10 đến khoảng 200mg, đến khoảng 100mg, hoặc đến khoảng 50mg. Theo một số phương án, sau liều ban đầu, có thể sử dụng liều thứ hai hoặc nhiều liều sau đó của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó với lượng có thể gần bằng hoặc thấp hơn liều ban đầu, trong đó các liều tiếp theo cách nhau ít nhất từ 1 ngày đến 3 ngày; ít nhất một tuần, ít nhất 2 tuần; ít nhất 3 tuần; ít nhất 4 tuần; ít nhất 5 tuần; ít nhất 6 tuần; ít nhất 7 tuần; ít nhất 8 tuần; ít nhất 9 tuần; ít nhất 10 tuần; ít nhất 12 tuần; hoặc ít nhất 14 tuần.

Các hệ giải phóng khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để bào chế được phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus thể đột biến, nhập nội bào qua trung gian thụ thể (ví dụ, xem tài liệu: Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp đưa vào cơ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường trong chân bì, qua chân bì, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng và đường miệng. Dược phẩm có thể được sử dụng qua đường thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm truyền hoặc tiêm liều lớn, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng có thể là qua đường toàn thân hoặc khu trú. Dược phẩm cũng có thể được phân phối trong nang, cụ

thể là liposom (ví dụ, xem tài liệu: Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Việc sử dụng các hạt nano để giải phóng các kháng thể theo sáng chế cũng được dự định ở đây. Các hạt nano liên hợp với kháng thể có thể được sử dụng cả trong lĩnh vực điều trị và chẩn đoán. Các hạt nano liên hợp với kháng thể và các phương pháp bào chế và sử dụng được mô tả chi tiết trong tài liệu: Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo. Các hạt nano có thể được phát triển và được liên hợp với kháng thể chứa trong dược phẩm để hướng đích các tế bào khối u và tế bào mô bệnh tự miễn hoặc các tế bào đã nhiễm virus. Các hạt nano để giải phóng dược chất cũng được mô tả, ví dụ, trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 8257740, hoặc US 8246995, mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây với toàn bộ nội dung của nó.

Trong một số trường hợp, dược phẩm có thể được giải phóng trong hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng. Theo phương án khác, các chất polyme có thể được sử dụng. Theo phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở gần đích của dược phẩm, do đó chỉ cần một phần của liều dùng qua đường toàn thân.

Dược phẩm dạng tiêm có thể bao gồm các dạng liều dùng để tiêm qua đường trong tĩnh mạch, dưới da, trong khối u, quanh khối u, trong da, trong sọ, trong màng bụng và trong cơ, truyền nhỏ giọt, v.v.. Các dược phẩm dạng tiêm này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, các dược phẩm dạng tiêm có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, tạo hỗn dịch hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó đã mô tả trên đây trong môi trường nước vô khuẩn hoặc môi trường dạng dầu được sử dụng theo cách thuận tiện để tiêm. Để làm môi trường nước dùng để tiêm, có các môi trường, ví dụ, nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất phụ trợ khác, v.v., có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, ethanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (polyoxyetylen (50 mol) sản phẩm cộng của dầu thầu dầu được hydro hóa)], v.v.. Để làm môi trường dạng dầu, có các môi trường được sử dụng, ví dụ, dầu vừng, dầu đậu tương, v.v., có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Do đó, tốt hơn nếu dược

phẩm dạng tiêm bào chế được được nạp đầy vào ampun thích hợp.

Dược phẩm của sáng chế có thể được giải phóng qua đường dưới da hoặc trong tĩnh mạch bằng kim tiêm và bơm tiêm chuẩn. Ngoài ra, đối với sự giải phóng qua da, dụng cụ phân phối dạng bút dễ dàng có các ứng dụng để giải phóng dược phẩm theo sáng chế. Dụng cụ phân phối dạng bút này có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần. Dụng cụ phân phối dạng bút có thể tái sử dụng thường có ống chứa có thể thay thế để đựng dược phẩm. Khi toàn bộ dược phẩm trong ống chứa này đã được sử dụng và ống này rỗng, ống rỗng này có thể được lấy ra và thay thế dễ dàng bằng ống mới chứa dược phẩm. Sau đó, dụng cụ phân phối dạng bút này có thể được tái sử dụng. Trong dụng cụ phân phối dạng bút dùng một lần, không có ống chứa có thể thay thế. Đúng hơn là dụng cụ phân phối dạng bút dùng một lần này đã nạp sẵn dược phẩm được chứa trong khoang chứa bên trong dụng cụ này. Khi khoang chứa này đã hết dược phẩm bên trong, toàn bộ dụng cụ được bỏ đi.

Nhiều dụng cụ phân phối dạng dụng cụ tiêm tự động và bút dạng tái sử dụng có các ứng dụng trong việc phân phối dược phẩm theo sáng chế qua đường dưới da. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Vương Quốc Anh), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Thụy Sĩ), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ấn Độ), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Đức), chỉ là một số loại làm ví dụ. Ví dụ về các dụng cụ phân phối dạng bút dùng một lần có ứng dụng trong việc phân phối dược phẩm theo sáng chế qua đường dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), dụng cụ tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Đức), EPIPEN (Dey, L.P.) và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), chỉ là một số loại làm ví dụ.

Có lợi nếu các dược phẩm để sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa đã mô tả trên đây được bào chế thành dạng liều dùng là liều đơn vị thích hợp để

phù hợp với liều của thành phần có hoạt tính. Các dạng dùng liều là liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, dạng tiêm (ampun), thuốc đạn, v.v.. Kháng thể thường được chứa với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 500mg trong mỗi dạng liều dùng là liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng tiêm, được ưu tiên nếu kháng thể được chứa với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 100mg và nằm trong khoảng từ khoảng 10 đến khoảng 250mg đối với các dạng liều dùng khác.

Sử dụng kháng thể để điều trị

Các kháng thể theo sáng chế hữu ích, ngoài các ưu điểm khác, để điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan đến, hoặc trung gian bởi sự biểu hiện, sự truyền tín hiệu hoặc hoạt tính của CTLA-4, hoặc có thể điều trị bằng cách phong bế sự tương tác giữa CTLA-4 và các phối tử CTLA-4 là B7-1/CD80 và/hoặc B7-2/CD86, hoặc theo cách khác, ức chế hoạt tính và/hoặc sự truyền tín hiệu của CTLA-4. Một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm bớt hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm mức độ nặng của một hoặc nhiều triệu chứng hoặc tình trạng của bệnh hoặc rối loạn. Ví dụ, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư (ức chế sự phát triển của khối u) và/hoặc bệnh nhiễm virus bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 (hoặc được phẩm chứa kháng thể kháng CTLA-4) như được mô tả ở đây, và các kháng thể kháng CTLA-4 (hoặc được phẩm chứa kháng thể kháng CTLA-4) để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư (ức chế sự phát triển của khối u) và/hoặc bệnh nhiễm virus. Các kháng thể theo sáng chế hữu ích để điều trị, phòng ngừa, và/hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh như bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus và/hoặc để cải thiện ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh này. Trong ngữ cảnh các phương pháp điều trị được mô tả ở đây, kháng thể kháng CTLA-4 có thể được sử dụng dưới dạng liệu pháp đơn (nghĩa là dưới dạng chất điều trị duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung (ví dụ về các chất này được mô tả ở phần khác của bản mô tả này).

Theo một số phương án của sáng chế, các kháng thể được mô tả ở đây hữu ích để điều trị cho các đối tượng bị bệnh ung thư nguyên phát hoặc tái phát bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên

bào xốp đa dạng), caxinom tế bào thận (ví dụ, bệnh ung thư thận thể tế bào sáng), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú (ví dụ, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư da, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, và u melanin.

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

Các kháng thể có thể được sử dụng để điều trị các triệu chứng ở giai đoạn sớm hoặc giai đoạn muộn của bệnh ung thư. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư di căn hoặc tiến triển. Các kháng thể này hữu ích trong việc làm giảm hoặc ức chế hoặc thu nhỏ sự phát triển của khối u của cả khối u dạng rắn và bệnh ung thư máu. Theo một số phương án, việc điều trị bằng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế dẫn đến sự thoái triển khối u ở đối tượng hơn 40%, hơn 50%, hơn 60%, hơn 70%, hơn 80% hoặc hơn 90%. Theo một số phương án, các kháng thể có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự tái phát của khối u. Theo một số phương án, các kháng thể hữu ích trong việc kéo dài thời gian sống không có sự tiến triển của bệnh hoặc tổng thời gian sống ở đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, các kháng thể hữu ích trong việc làm giảm độc tính do liệu pháp hóa trị hoặc liệu pháp xạ trị trong khi

duy trì sự sống trong thời gian dài ở đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế được sử dụng qua đường khu trú vào một hoặc nhiều tổn thương khối u qua đường trong khối u hoặc quanh khối u), và dẫn đến ức chế sự phát triển của khối u ở khối u được tiêm cũng như ở một hoặc nhiều khối u liên kề hoặc ở xa ở đối tượng (hiệu ứng ngoài mục tiêu).

Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế hữu ích để điều trị cho đối tượng bị bệnh nhiễm virus mạn tính. Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế hữu ích trong việc làm giảm chuẩn độ virus ở vật chủ và/hoặc khôi phục các tế bào T đã cạn kiệt. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhiễm virus mạn tính do virus viêm màng não đám rối màng mạch tế bào lymphô (LCMV) gây ra. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng với liều điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) hoặc virus gây u nhú ở người (HPV) hoặc virus viêm gan B/C (HBV/HCV). Theo phương án liên quan, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV) ở đối tượng là khỉ như khỉ cynomolgus.

Theo một số phương án, kháng thể phong bế của sáng chế có thể được sử dụng với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị cho đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế được sử dụng qua đường khu trú vào khối u hoặc ở gần tổn thương khối u (trong khối u hoặc quanh khối u) ở đối tượng mắc bệnh ung thư để làm giảm đến mức tối thiểu sự tiếp xúc toàn thân và để phòng ngừa/cải thiện độc tính do sự tiếp xúc toàn thân với kháng thể.

Sáng chế cũng mô tả ở đây việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế theo cách dự phòng cho các bệnh nhân có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư, và bệnh nhiễm virus.

Theo phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để bào chế được phẩm dùng để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh ung thư, hoặc bệnh nhiễm virus. Theo phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng dưới dạng liệu pháp hỗ trợ với chất khác bất kỳ hoặc liệu pháp khác bất

kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hữu ích để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus.

Liệu pháp kết hợp và dạng bào chế

Các liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế và chất điều trị bổ sung bất kỳ có thể được kết hợp theo cách có lợi với kháng thể của sáng chế, hoặc với mảnh có hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế.

Các kháng thể của sáng chế có thể được kết hợp theo cách hiệp đồng với một hoặc nhiều dược chất kháng bệnh ung thư hoặc liệu pháp được sử dụng để điều trị hoặc ức chế bệnh ung thư bao gồm, ví dụ, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào xốp đa dạng), caxinom tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư da, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, và u melanin. Sáng chế mô tả việc sử dụng các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế kết hợp với liệu pháp kích thích miễn dịch và/hoặc liệu pháp hỗ trợ miễn dịch để ức chế sự phát triển của khối u, và/hoặc làm gia tăng thời gian sống của bệnh nhân ung thư. Các liệu pháp kích thích miễn dịch bao gồm các liệu pháp kích thích miễn dịch trực tiếp để làm gia tăng hoạt tính của tế bào miễn dịch bằng cách “ngừng ức chế” các tế bào miễn dịch bị ức chế hoặc “kích hoạt” để hoạt hóa đáp ứng miễn dịch. Các ví dụ bao gồm hướng đích các thụ thể kiểm soát khác, tiêm chủng vacxin và các chất phụ trợ. Các phương thức hỗ trợ miễn dịch có thể làm gia tăng tính kháng nguyên của khối u bằng cách kích thích sự chết của tế bào sinh miễn dịch, tình trạng viêm hoặc các tác dụng gián tiếp khác để kích thích đáp ứng miễn dịch kháng u. Các ví dụ bao gồm phương pháp xạ trị, hóa trị, chất chống tạo mạch, và phẫu thuật.

Theo các phương án khác nhau, một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, BGB-A317 hoặc REGN2810), chất ức chế PD-L1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-L1 như avelumab, atezolizumab, durvalumab, MDX-1105, hoặc REGN3504), chất ức chế LAG3, chất ức chế TIM3, chất ức chế

BTLA, chất ức chế TIGIT, chất ức chế CD47, chất ức chế CD28, chất ức chế CSF1R, chất ức chế CXCR, chất ức chế CCR4, chất ức chế CCR8, chất ức chế CD40, chất ức chế OX40, chất ức chế GTR, chất đối kháng của chất đồng ức chế tế bào T khác hoặc phối tử (ví dụ, kháng thể với CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 hoặc VISTA), chất ức chế indoleamin-2,3-dioxygenaza (IDO), chất đối kháng yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF) [ví dụ, “bẫy VEGF” như aflibercept hoặc protein dung hợp ức chế VEGF khác như được nêu trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.087.411, hoặc kháng thể kháng VEGF hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó (ví dụ, bevacizumab, hoặc ranibizumab) hoặc chất ức chế kinaza phân tử nhỏ của thụ thể VEGF (ví dụ, sunitinib, sorafenib, hoặc pazopanib)], chất ức chế Ang2 (ví dụ, nesvacumab), chất ức chế yếu tố sinh trưởng biến đổi beta (transforming growth factor beta: TGF β), chất ức chế thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor: EGFR) (ví dụ, erlotinib, cetuximab), chất ức chế CD20 (ví dụ, kháng thể kháng CD20 như rituximab), kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu khối u [ví dụ, CA9, CA125, kháng nguyên liên quan đến u melanin 3 (melanoma-associated antigen 3: MAGE3), kháng nguyên ung thư phôi (carcinoembryonic antigen: CEA), vimentin, khối u -M2-PK, kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt (prostate-specific antigen: PSA), mucin-1, MART-1, và CA19-9], vaccin (ví dụ, Bacillus Calmette-Guerin, vaccin bệnh ung thư), chất phụ trợ làm tăng mức độ trình diện kháng nguyên (ví dụ, yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt-đại thực bào), kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép CD3xCD20, hoặc kháng thể đặc hiệu kép PSMAxCD3), độc tố tế bào, chất hóa trị liệu (ví dụ, dacarbazine, temozolomide, cyclophosphamid, docetaxel, doxorubicin, daunorubicin, cisplatin, carboplatin, gemcitabine, methotrexate, mitoxantrone, oxaliplatin, paclitaxel, và vincristine), cyclophosphamid, phẫu thuật, liệu pháp xạ trị, chất ức chế IL-6R (ví dụ, sarilumab), chất ức chế IL-4R (ví dụ, dupilumab), chất ức chế IL-10, cytokin như IL-2, IL-7, IL-21, và IL-15, thể liên hợp kháng thể-dược chất (antibody-drug conjugate: ADC) (ví dụ, ADC kháng CD19-DM4, và ADC kháng DS6-DM4), dược chất kháng viêm (ví dụ, corticosteroid và các dược chất kháng viêm không steroid), thực phẩm chức năng như các chất chống oxy hóa hoặc liệu pháp chăm sóc khác bất kỳ để điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp

với vaccin bệnh ung thư bao gồm vaccin tế bào đuôi gai, virus hủy u, vaccin tế bào khối u, v.v. để làm gia tăng đáp ứng kháng u. Ví dụ về các vaccin bệnh ung thư có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế bao gồm vaccin MAGE3 đối với u melanin và bệnh ung thư bàng quang, vaccin MUC1 đối với bệnh ung thư vú, EGFRv3 (ví dụ, Rindopepimut) đối với bệnh ung thư não (bao gồm cả u nguyên bào xốp đa dạng), hoặc ALVAC-CEA (đối với CEA+ các bệnh ung thư).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp xạ trị trong các phương pháp tạo ra đáp ứng kháng u lâu dài trong thời gian dài và/hoặc làm gia tăng thời gian sống của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có thể được sử dụng trước, đồng thời hoặc sau khi sử dụng liệu pháp xạ trị cho bệnh nhân ung thư. Ví dụ, liệu pháp xạ trị có thể được sử dụng với một hoặc nhiều liều cho tổn thương khối u, sau đó sử dụng một hoặc nhiều liều kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế. Theo một số phương án, liệu pháp xạ trị có thể được sử dụng qua đường khu trú cho tổn thương khối u để làm gia tăng tính sinh miễn dịch cục bộ của khối u ở bệnh nhân (xạ trị bổ trợ) và/hoặc để tiêu diệt các tế bào khối u (xạ trị cắt bỏ) sau khi sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế qua đường toàn thân. Ví dụ, phương pháp xạ trị nội sọ có thể được sử dụng cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào xốp đa dạng) kết hợp với sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế qua đường toàn thân. Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp xạ trị và chất hóa trị liệu (ví dụ, temozolomide) hoặc chất đối kháng VEGF (ví dụ, aflibercept). Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp xạ trị và chất hóa trị liệu (ví dụ, temozolomide) hoặc chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như REGN2810, nivolumab, hoặc pembrolizumab).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều dược chất kháng virus để điều trị bệnh nhiễm virus mạn tính do các virus LCMV, HIV, HPV, HBV hoặc HCV gây ra. Ví dụ về các dược chất kháng virus bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, zidovudine, lamivudine, abacavir, ribavirin, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirine

và corticosteroid.

(Các) chất/thành phần có hoạt tính điều trị bổ sung có thể được sử dụng trước khi, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế. Nhằm mục đích của sáng chế, các chế độ sử dụng này được cho là sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 “kết hợp với” thành phần có hoạt tính điều trị thứ hai.

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

của sáng chế, việc sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 "trước khi", "đồng thời với" hoặc "sau khi" (như các thuật ngữ này đã được định nghĩa trên đây) sử dụng thành phần có hoạt tính điều trị bổ sung được cho là sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 "kết hợp với" thành phần có hoạt tính điều trị bổ sung).

Sáng chế bao gồm được phẩm trong đó kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế được đồng bào chế với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính điều trị bổ sung như được mô tả trong phần khác của bản mô tả này bằng cách sử dụng nhiều tổ hợp liều dùng khác nhau.

Trong các phương án làm ví dụ trong đó kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như được bộc lộ trong công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2015/0203579, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó), bao gồm việc sử dụng các dạng đồng bào chế chứa kháng thể kháng CTLA-4 và chất ức chế PD-1, các thành phần riêng rẽ có thể được sử dụng cho đối tượng và/hoặc được đồng bào chế bằng cách sử dụng nhiều loại tổ hợp liều dùng khác nhau. Do đó, sáng chế bao gồm tổ hợp của (i) kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế, và (ii) chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như được bộc lộ trong công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2015/0203579, tài liệu này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó), để sử dụng đồng thời, riêng rẽ và/hoặc lần lượt trong việc điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virut. Ví dụ, kháng thể kháng CTLA-4 và chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1), mỗi thành phần này có thể được sử dụng cho đối tượng và/hoặc được chứa trong dạng đồng bào chế với lượng được chọn từ nhóm bao gồm 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg, và 10,0 mg/kg. Theo một phương án, kháng thể kháng CTLA-4 và chất ức chế PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1), mỗi thành phần này có thể được sử dụng cho đối tượng và/hoặc được chứa trong dạng đồng bào chế với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 50mg đến khoảng 600mg, ví dụ, lượng được chọn từ nhóm bao gồm 50mg, 100mg, 200mg, 250mg, 300mg, 350mg, 400mg, 450mg, 500mg, 550mg, và 600mg. Các tổ hợp/dạng đồng bào chế có thể được

sử dụng cho đối tượng theo chế độ bất kỳ trong số các chế độ sử dụng được bộc lộ trong phần khác của bản mô tả này bao gồm, ví dụ, mỗi tuần hai lần, mỗi tuần một lần, 2 tuần một lần, 3 tuần một lần, mỗi tháng một lần, 2 tháng một lần, 3 tháng một lần, 4 tháng một lần, 5 tháng một lần, 6 tháng một lần, v.v.. Kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế có thể được sử dụng với liều, chẳng hạn nằm trong khoảng từ khoảng 0,8 đến khoảng 11, từ khoảng 1 đến khoảng 10, từ khoảng 3 đến khoảng 10, khoảng 1, khoảng 3 hoặc khoảng 10 mg/kg, đồng thời với chất ức chế PD-1 (ví dụ kháng thể kháng PD-1 như được bộc lộ trong công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2015/0203579) với liều nằm trong khoảng từ khoảng 3 đến 5, hoặc khoảng 3,0 mg/kg. Việc sử dụng đồng thời có thể diễn ra, chẳng hạn, trong mỗi 14 ngày, 21 ngày hoặc 28 ngày.

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

Chế độ sử dụng

Theo một số phương án của sáng chế, nhiều liều kháng thể kháng CTLA-4 (hoặc dược phẩm chứa hỗn hợp của kháng thể kháng CTLA-4 và chất bất kỳ trong số các chất có hoạt tính điều trị bổ sung được nêu ở đây) có thể được sử dụng cho đối tượng trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lần lượt nhiều liều của kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sử dụng lần lượt" có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng cho đối tượng ở thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau cách nhau một khoảng thời gian định trước (ví dụ, nhiều giờ, nhiều ngày, nhiều tuần hoặc nhiều tháng). Sáng chế bao gồm phương pháp bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng lần lượt một liều ban đầu của kháng thể kháng CTLA-4, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng CTLA-4, và tùy ý, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng CTLA-4. Kháng thể kháng CTLA-4 có thể được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg đến 100 mg/kg thể trọng của đối tượng.

Các thuật ngữ "liều ban đầu", "các liều thứ hai" và "các liều thứ ba" để chỉ thứ tự sử dụng theo thời gian của kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế. Do đó, "liều ban đầu" là liều được sử dụng khi bắt đầu chế độ điều trị (còn được gọi là "liều cơ sở"); "các liều thứ hai" là các liều được sử dụng sau liều ban đầu; và "các liều thứ ba" là các liều được sử dụng sau các liều thứ hai. Tất cả các liều ban đầu, thứ hai, và thứ ba có thể chứa cùng lượng kháng thể kháng CTLA-4, nhưng nói chung là có thể chứa lượng khác nhau theo tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án, lượng kháng thể kháng CTLA-4 được chứa trong liều ban đầu, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba có thể khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh tăng hoặc giảm khi thích hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều liều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) được sử dụng khi bắt đầu chế độ điều trị dưới dạng "liều tải", sau đó các liều tiếp theo được sử dụng trên cơ sở tần suất ít hơn (ví dụ, "liều duy trì").

Theo một số phương án, lượng kháng thể kháng CTLA-4 được chứa trong liều ban đầu, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba có thể là liều dưới mức tối ưu hoặc dưới mức điều trị. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "dưới mức điều trị"

hoặc “dưới mức tối ưu” để chỉ liệu kháng thể được sử dụng ở mức rất thấp để tạo ra hiệu quả điều trị hoặc thấp hơn mức cần thiết để điều trị bệnh như bệnh ung thư.

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

Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng số lượng bất kỳ của liệu thứ hai và/hoặc liệu thứ ba của kháng thể kháng CTLA-4. Ví dụ, theo một số phương án, bệnh nhân được cho sử dụng chỉ một liệu thứ hai. Theo các phương án khác, bệnh nhân được cho sử dụng hai hoặc nhiều liệu thứ hai (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 liệu, hoặc nhiều hơn). Tương tự, theo một số phương án, bệnh nhân được cho sử dụng chỉ một liệu thứ ba. Theo các phương án khác, bệnh nhân được cho sử dụng hai hoặc nhiều liệu thứ ba (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 liệu, hoặc nhiều hơn).

Theo các phương án liên quan đến nhiều liệu thứ hai, mỗi liệu thứ hai có thể được sử dụng với cùng tần suất như các liệu thứ hai còn lại. Ví dụ, mỗi liệu thứ hai có thể được sử dụng cho bệnh nhân sau liệu ngay trước đó từ 1 đến 2 tuần hoặc từ 1 đến 2 tháng. Tương tự, theo các phương án liên quan đến nhiều liệu thứ ba, mỗi liệu thứ ba có thể được sử dụng với cùng tần suất như các liệu thứ ba còn lại. Ví dụ, mỗi liệu thứ ba có thể được sử dụng cho bệnh nhân sau liệu ngay trước đó từ 2 đến 12 tuần. Theo một số phương án của sáng chế, tần suất mà khi đó các liệu thứ hai và/hoặc thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân có thể thay đổi theo thời gian của chế độ điều trị. Tần suất sử dụng cũng có thể được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sĩ, tùy theo nhu cầu của mỗi bệnh nhân sau khi khám lâm sàng.

Sử dụng kháng thể để chẩn đoán

Các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện

và/hoặc xác định CTLA-4 trong mẫu, ví dụ, cho các mục đích chẩn đoán. Một số phương án dự tính việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế trong các thử nghiệm để phát hiện bệnh hoặc rối loạn như bệnh ung thư, bệnh tự miễn hoặc bệnh nhiễm virus. Các thử nghiệm chẩn đoán làm ví dụ đối với CTLA-4 có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu thu được từ đối tượng (ví dụ, bệnh nhân), tiếp xúc với kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 được đánh dấu bằng nguyên tử đánh dấu hoặc phân tử của gen thông báo có thể phát hiện hoặc được sử dụng làm phối tử bắt giữ để phân lập chọn lọc CTLA-4 ra khỏi các mẫu của đối tượng. Theo cách khác, kháng thể kháng CTLA-4 không được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ cấp là kháng thể được đánh dấu theo cách tự phát hiện. Nguyên tử đánh dấu hoặc phân tử của gen thông báo có thể phát hiện có thể là chất đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc phát huỳnh quang hoặc phát quang hóa học như florescein isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc enzym như phosphatase kiềm, β -galactosidaza, peroxidaza của cây củ cải cay, hoặc luciferaza. Các thử nghiệm làm ví dụ cụ thể có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định CTLA-4 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và thử nghiệm phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting: FACS).

Các mẫu có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán CTLA-4 theo sáng chế bao gồm mẫu dịch hoặc mô bất kỳ có thể thu được từ đối tượng, chứa lượng có thể phát hiện của protein CTLA-4, hoặc các mảnh của chúng, trong điều kiện bình thường và điều kiện bệnh lý. Nói chung, hàm lượng CTLA-4 trong mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị bệnh ung thư hoặc bệnh tự miễn) sẽ được xác định để thiết lập mức cơ sở hoặc tiêu chuẩn của CTLA-4. Sau đó, mức cơ sở của CTLA-4 này có thể được so sánh với mức CTLA-4 xác định được trong mẫu thu được các đối tượng bị nghi ngờ là có tình trạng bệnh liên quan đến bệnh ung thư, hoặc các triệu chứng có liên quan đến tình trạng bệnh này.

Các kháng thể đặc hiệu với CTLA-4 có thể không chứa các nguyên tử đánh dấu hoặc gốc bổ sung, hoặc chúng có thể chứa nguyên tử đánh dấu hoặc gốc ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Theo một phương án, nguyên tử đánh dấu hoặc gốc là biotin. Trong thử nghiệm gắn kết, vị trí của nguyên tử đánh dấu (nếu có) có thể xác

định sự định hướng của peptit so với bề mặt mà peptit được gắn kết trên đó. Ví dụ, nếu một bề mặt được phủ bằng avidin, peptit chứa biotin ở đầu tận cùng N sẽ được định hướng sao cho phần đầu tận cùng C của peptit sẽ ở xa bề mặt này.

Các khía cạnh của sáng chế mô tả việc sử dụng các kháng thể được bộc lộ làm dấu ấn để dự đoán sự tiên lượng bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm virus ở bệnh nhân. Các kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán để đánh giá tiên lượng bệnh ung thư ở bệnh nhân và dự đoán khả năng sống.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bản mô tả đầy đủ và mô tả cách tạo ra và sử dụng các phương pháp và được phẩm theo sáng chế, và không dự định làm giới hạn phạm vi mà sáng chế này thuộc về. Các nỗ lực đã được tiến hành để đảm bảo độ chính xác của các chữ số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.) tuy nhiên cần tính đến một số sai số và độ lệch khi thử nghiệm. Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, các phần là phần theo trọng lượng, trọng lượng phân tử là trọng lượng phân tử trung bình, nhiệt độ tính theo °C, nhiệt độ trong phòng bằng khoảng 25°C, và áp suất là áp suất không khí hoặc gần bằng áp suất không khí.

Ví dụ 1: Tạo ra các kháng thể của người với CTLA-4

Các kháng thể của người với CTLA-4 được tạo ra bằng cách sử dụng protein CTLA-4 của người (Cat. số: 7268-CT, R&D Systems) hoặc hCTLA-4 mã hóa ADN (Mã số truy cập: NM_005214.4). Chất sinh miễn dịch được sử dụng trực tiếp với chất bổ trợ để kích thích đáp ứng miễn dịch, cho chuột VELOCIMMUNE[®] (nghĩa là chuột được thiết kế chứa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người mã hóa ADN), như được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 8502018 B2. Đáp ứng miễn dịch của kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu CTLA-4. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, các tế bào lách được thu hoạch và dung hợp với các tế bào u tủy của chuột để bảo toàn khả năng sống của chúng và tạo ra các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và chọn lọc để xác định các dòng tế bào sản sinh ra kháng thể đặc hiệu với CTLA-

4. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, và chất sinh miễn dịch đã mô tả trên đây, thu được một số kháng thể thể khảm kháng CTLA-4 (nghĩa là các kháng thể có miền biến đổi của người và miền ổn định của chuột); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này từ chuột VELOCIMMUNE® được ký hiệu là H1M20370N, H1M20372N, H1M20393N, H2M20361N, H2M20368N, H2M20369N, H2M20373N, H2M20375N, H2M20379N, H2M20385N, H2M20386N, và H2M20387N.

Các kháng thể kháng CTLA-4 cũng được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng nguyên (từ một trong hai con chuột được gây miễn dịch) mà không dung hợp với tế bào u tủy, như được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.582.298, tài liệu này được viện dẫn cụ thể ở đây để tham khảo toàn bộ nội dung của nó. Bằng cách sử dụng phương pháp này, thu được một số kháng thể kháng CTLA-4 của người có chiều dài đầy đủ (nghĩa là các kháng thể có miền biến đổi của người và miền ổn định của người); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu như sau: H1H19264P, H1H19269P, H1H19273P, H1H19274P, H1H19278P, H1H19279P, H1H19280P, H1H19281P, H1H19283P, H1H19284P, H1H19291P, H1H19294P, H1H19303P, H1H19305P, H1H19307P, H1H19312P, H1H19313P, H1H19314P2, H1H19319P2, và H1H19327P2.

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

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

Bảng 1 thể hiện các bộ nhận dạng trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và vùng CDR của các kháng thể kháng CTLA-4 được chọn lọc theo sáng chế. Các bộ nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 1: các bộ nhận dạng trình tự axit amin

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCD R1	LCDR 2	LCDR 3
H1H19264P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H19269P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H19273P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H19274P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H19278P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H19279P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H19280P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H19281P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H19283P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H19284P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H19291P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H19294P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H19303P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H19305P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H19307P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H19312P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H19313P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H19314P2	274	276	278	280	282	284	286	288
H1H19319P2	290	292	294	296	298	300	302	304
H1H19327P2	306	308	310	312	298	300	302	304
H1M20370N	314	316	318	320	322	324	326	328
H1M20372N	330	332	334	336	338	340	342	344
H1M20393N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M20361N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M20368N	378	380	382	384	386	388	390	392
H2M20369N	394	396	398	400	402	404	406	408

H2M20373N	410	412	414	416	418	420	422	424
H2M20375N	426	428	430	432	434	436	438	440
H2M20379N	442	444	446	448	450	452	454	456
H2M20385N	458	460	462	464	466	468	470	472
H2M20386N	474	476	478	480	482	484	486	488
H2M20387N	490	492	494	496	498	500	502	504

Bảng 2: Các bộ nhận dạng trình tự axit nucleic

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCD R1	LCDR 2	LCD R3
H1H19264P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H19269P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H19273P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H19274P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H19278P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H19279P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H19280P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H19281P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H19283P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H19284P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H19291P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1H19294P	177	179	181	183	185	187	189	191
H1H19303P	193	195	197	199	201	203	205	207
H1H19305P	209	211	213	215	217	219	221	223
H1H19307P	225	227	229	231	233	235	237	239
H1H19312P	241	243	245	247	249	251	253	255
H1H19313P	257	259	261	263	265	267	269	271
H1H19314P2	273	275	277	279	281	283	285	287
H1H19319P2	289	291	293	295	297	299	301	303

H1H19327P2	305	307	309	311	297	299	301	303
H1M20370N	313	315	317	319	321	323	325	327
H1M20372N	329	331	333	335	337	339	341	343
H1M20393N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M20361N	361	363	365	367	369	371	373	375
H2M20368N	377	379	381	383	385	387	389	391
H2M20369N	393	395	397	399	401	403	405	407
H2M20373N	409	411	413	415	417	419	421	423
H2M20375N	425	427	429	431	433	435	437	439
H2M20379N	441	443	445	447	449	451	453	455
H2M20385N	457	459	461	463	465	467	469	471
H2M20386N	473	475	477	479	481	483	485	487
H2M20387N	489	491	493	495	497	499	501	503

Các kháng thể thường được gọi ở đây theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ "H1M," "H4H," v.v.), sau đó là bộ nhận dạng bằng số (ví dụ "19264," "20370," v.v., như được thể hiện trong Bảng 1), sau đó là hậu tố "P," "P2," hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, một kháng thể có được gọi ở đây là, ví dụ, "H1M20370N", "H1H19264P", "H1H19314P2," v.v.. Tiền tố H1H đối với ký hiệu kháng thể được sử dụng ở đây thể hiện isotyp vùng Fc cụ thể của kháng thể này. Ví dụ, kháng thể "H1H" có vùng Fc IgG1 của người, kháng thể "H1M" có vùng Fc IgG1 của chuột, và kháng thể "H2M" có vùng Fc IgG2 của chuột (tất cả các vùng biến đổi hoàn toàn là của người như được ký hiệu bằng chữ 'H' thứ nhất trong ký hiệu kháng thể). Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ, kháng thể có isotyp Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể có isotyp Fc khác (ví dụ, kháng thể có Fc IgG1 của chuột có thể được biến đổi thành kháng thể có IgG1 của người hoặc IgG4 của người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, các miền biến đổi (bao gồm cả các vùng CDR) – được thể hiện bằng bộ nhận dạng dạng số được thể hiện trong Bảng 1 – sẽ vẫn giống nhau, và các đặc tính gắn kết với kháng nguyên được cho là giống hoặc gần như tương tự, bất kể tính chất của miền Fc.

Cấu trúc đối chứng:

Hai cấu trúc đối chứng (các kháng thể kháng CTLA-4) được sử dụng trong các thử nghiệm sau đây nhằm mục đích so sánh:

COMP1: kháng thể kháng CTLA-4 của người với các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có trình tự axit amin của các miền tương ứng của “10D1”, như được nêu trong Công bố đơn quốc tế số WO 01/14424 A2 (Bristol Myers Squibb) và được tạo ra với vùng Fc của hIgG1.

COMP2: kháng thể kháng CTLA-4 của người với các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có trình tự axit amin của các miền tương ứng của “11.2.1”, như được nêu trong công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2014/099325 A1 (Pfizer) và được tạo ra với vùng Fc của hIgG2.

Ví dụ 3: Ái lực gắn kết có nguồn gốc từ sự cộng hưởng plasmon bề mặt và hằng số động học của kháng thể đơn dòng của người kháng CTLA-4

Ái lực gắn kết và hằng số động học của các kháng thể kháng CTLA-4 của người được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore 4000 (GE, Pittsburgh, PA) hoặc MASS-1 (Sierra Sensors, Greenville, RI)) ở nhiệt độ 25°C (các Bảng 3 và 4). Các kháng thể được biểu hiện dưới dạng IgG1 của người (nghĩa là “H1H”) được bắt giữ trên bề mặt của thiết bị cảm biến CM5 (GE) được dẫn xuất hóa bằng amin ghép với kháng thể đơn dòng của chuột kháng vùng Fc của người (GE). Các kháng thể được biểu hiện dưới dạng IgG1 của chuột hoặc IgG2 của chuột (nghĩa là “H1M”, “H2M”) được bắt giữ trên bề mặt của thiết bị cảm biến amin dung lượng cao (Sierra Sensors) được dẫn xuất hóa bằng amin ghép với kháng thể đa dòng của dê kháng vùng Fc của chuột (GE). Nồng độ khác nhau của các protein hòa tan CTLA-4 của người (h) (SEQ ID NO: 506) hoặc CTLA-4 của khỉ *Macaca fascicularis* (mf) (SEQ ID NO: 507) được biểu hiện với đuôi myc-myc-polyhistidin (myc-myc-polyhistidine: mmh) ở đầu tận cùng C được bơm lên bề mặt của thiết bị cảm biến đã bắt giữ mAb kháng CTLA-4 với tốc độ dòng bằng 30 hoặc 50ul/phút. CTLA-4 là homodime được liên kết với nhau bằng một liên kết disulfua trong miền ngoại bào ở gốc xystein 157.

Tất cả các nghiên cứu về sự gắn kết được thực hiện trong dung dịch đệm gồm HEPES 0,01M có độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20

0,05% theo thể tích (dung dịch đệm chạy HBS-ET). Sự kết hợp của hCTLA4.mmh hoặc mfCTLA4.mmh với kháng thể đơn dòng bị bắt giữ được theo dõi trong thời gian 4 hoặc 5 phút và sự phân ly của hCTLA4.mmh hoặc mfCTLA4.mmh trong dung dịch đệm chạy HBS-ET được theo dõi trong 10 phút.

Hằng số kết hợp động học (k_a) và hằng số tốc độ phân ly (k_d) được xác định bằng cách làm khớp biểu đồ cảm biến trong thời gian thực với mô hình gắn kết theo tỷ lệ 1:1 bằng cách sử dụng chương trình phần mềm làm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) và thời gian bán phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ các hằng số tốc độ động lực học như sau:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ và } t_{1/2} (\text{phút}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Như được thể hiện trong Bảng 3, tất cả các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế này đều gắn kết với CTLA-4 của người, nhiều loại có ái lực nanomol với hCTLA-4.mmh, và có khả năng phản ứng chéo với protein CTLA-4 của khỉ cynomolgus. Không quan sát được khả năng phản ứng chéo với protein CTLA-4 của chuột hoặc chuột nhắt (số liệu không được thể hiện).

Bảng 3: Ái lực gắn kết Biacore của mAb Fc của người ở nhiệt độ 25°C

Sự gắn kết ở nhiệt độ 25°C/Định dạng bắt giữ Mab					
AbPID	Chất phân tích*	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H1H19264P	hCTLA-4.mmh	6,04E+04	7,31E-04	1,21E-08	15,8
	mf CTLA-4.mmh	4,90E+04	9,94E-04	2,03E-08	11,6
H1H19269P	hCTLA-4.mmh	3,94E+05	4,74E-04	1,20E-09	24,4
	mf CTLA-4.mmh	3,56E+05	4,35E-04	1,22E-09	26,6
H1H19273P	hCTLA-4.mmh	3,74E+05	3,62E-04	9,66E-10	31,9
	mf CTLA-4.mmh	3,62E+05	3,46E-04	9,56E-10	33,4
H1H19274P	hCTLA-4.mmh	5,30E+05	7,60E-04	1,43E-09	15,2
	mf CTLA-4.mmh	5,22E+05	4,63E-04	8,87E-10	25
H1H19278P	hCTLA-4.mmh	1,79E+05	4,02E-04	2,25E-09	28,8
	mf CTLA-4.mmh	1,66E+05	1,01E-03	6,11E-09	11,4

H1H19279P	hCTLA-4.mmh	3,46E+05	2,61E-04	7,52E-10	44,3
	mf CTLA-4. mmh	3,40E+05	2,59E-04	7,63E-10	44,6
H1H19280P	hCTLA-4.mmh	3,37E+05	3,46E-04	1,03E-09	33,4
	mf CTLA-4. mmh	3,20E+05	3,09E-04	9,64E-10	37,4
H1H19281P	hCTLA-4.mmh	4,84E+05	7,41E-04	1,53E-09	15,6
	mf CTLA-4. mmh	4,72E+05	1,01E-03	2,14E-09	11,5
H1H19283P	hCTLA-4.mmh	2,21E+05	8,28E-04	3,75E-09	14
	mf CTLA-4. mmh	2,20E+05	6,83E-04	3,11E-09	16,9
H1H19284P	hCTLA-4.mmh	1,48E+05	3,69E-04	2,49E-09	31,3
	mf CTLA-4. mmh	1,94E+05	3,05E-04	1,57E-09	37,9
H1H19291P	hCTLA-4.mmh	8,88E+04	1,23E-03	1,38E-08	9,4
	mf CTLA-4. mmh	9,31E+04	1,21E-03	1,30E-08	9,6
H1H19294P	hCTLA-4.mmh	2,85E+05	3,23E-04	1,13E-09	35,7
	mf CTLA-4. mmh	2,63E+05	2,69E-04	1,02E-09	43
H1H19303P	hCTLA-4.mmh	1,21E+05	1,99E-03	1,64E-08	5,8
	mf CTLA-4. mmh	1,56E+05	2,45E-03	1,57E-08	4,7
H1H19305P	hCTLA-4.mmh	2,89E+05	1,21E-03	4,19E-09	9,5
	mf CTLA-4. mmh	2,84E+05	9,02E-04	3,18E-09	12,8
H1H19307P	hCTLA-4.mmh	2,17E+05	2,84E-04	1,31E-09	40,6
	mf CTLA-4. mmh	2,09E+05	2,92E-04	1,40E-09	39,5
H1H19312P	hCTLA-4.mmh	3,20E+05	1,05E-03	3,29E-09	11
	mf CTLA-4. mmh	3,33E+05	7,60E-04	2,28E-09	15,2
H1H19313P	hCTLA-4.mmh	4,89E+05	7,58E-04	1,55E-09	15,2
	mf CTLA-4. mmh	4,75E+05	4,64E-04	9,76E-10	24,9
H1H19314P2	hCTLA-4.mmh	1,15E+05	1,13E-03	9,87E-09	10,2
	mf CTLA-4. mmh	1,07E+05	9,13E-04	8,57E-09	12,6
H1H19319P2	hCTLA-4.mmh	1,43E+05	1,46E-03	1,02E-08	7,9
	mf CTLA-4. mmh	2,03E+05	2,61E-03	1,29E-08	4,4
H1H19327P2	hCTLA-4.mmh	8,81E+03	5,85E-04	6,63E-08	19,8

	mf CTLA-4. mmh	1,88E+05	1,17E-02	6,24E-08	1
H1H20361N	hCTLA-4.mmh	6,21E+04	1,99E-03	3,21E-08	5,8
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20361N2	hCTLA-4.mmh	5,39E+04	2,51E-03	4,65E-08	4,6
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20370N	hCTLA-4.mmh	1,72E+05	5,88E-04	3,43E-09	19,6
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20370N2	hCTLA-4.mmh	5,13E+04	1,21E-03	2,36E-08	9,5
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20372N	hCTLA-4.mmh	8,05E+04	3,67E-04	4,55E-09	31,5
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20373N	hCTLA-4.mmh	5,23E+05	4,01E-04	7,66E-10	28,8
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20375N	hCTLA-4.mmh	4,19E+04	2,79E-03	6,65E-08	4,1
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20380N2	hCTLA-4.mmh	1,37E+06	3,20E-04	2,33E-10	36,2
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20386N	hCTLA-4.mmh	1,85E+05	1,94E-03	1,05E-08	6
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND
H1H20386N2	hCTLA-4.mmh	1,35E+05	1,68E-03	1,24E-08	6,9
	mf CTLA-4. mmh	ND	ND	ND	ND

*Các protein h và mf CTLA-4 mmh chảy trên bề mặt đã bắt giữ mAb với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,37nM đến 90nM trong hệ pha loãng 3 lần; ND = Không xác định

Ví dụ 4: Các kháng thể kháng CTLA-4 phong bế sự tương tác giữa CTLA-4 của người và các phối tử tự nhiên của nó, B7-1 và B7-2

CTLA-4 (protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4) là thụ thể kiểm soát sự ức chế tế bào T xuyên màng typ I được biểu hiện trên tế bào T bình thường và tế bào T điều hòa. CTLA-4 điều hòa âm tính sự hoạt hóa tế bào T bằng

cách cạnh tranh vượt trội thụ thể kích thích CD28 từ sự gắn kết với các phối tử tự nhiên của nó, B7-1 (CD80) và B7-2 (CD86). Trong ví dụ này, khả năng phong bế sự gắn kết của protein CTLA-4 với B7-1 và B7-2 đã gắn với đĩa của các kháng thể kháng CTLA-4 được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) kiểu kẹp giữa cạnh tranh. Nồng độ khác nhau của kháng thể kháng CTLA-4 được trộn sơ bộ với lượng không đổi của protein CTLA-4 dimer và sự giảm mức độ gắn kết của CTLA-4 với B7-1 hoặc B7-2 được cố định trên đĩa, do sự có mặt của kháng thể, được theo dõi.

Tóm lại, các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình sau đây: các protein B7-1 và B7-2 của người, được biểu hiện với IgG1 của người ở đầu tận cùng C và đuôi 6x (hIgG1-6xHis; R&D Systems, Minneapolis, MN) được phủ riêng rẽ với nồng độ 2 µg/ml trong PBS trên đĩa vi chuẩn có 96 lỗ qua đêm (overnight: ON) ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các vị trí gắn kết không đặc hiệu bị phong bế bằng cách sử dụng dung dịch BSA 0,5% (trọng lượng/thể tích) trong PBS. Theo cách riêng biệt, lượng không đổi bằng 200pM hoặc 400pM của protein hCTLA-4-mFc tái tổ hợp (miền ngoại bào CTLA-4 của người được biểu hiện với phần Fc ở đầu tận cùng C của IgG2a của chuột, SEQ ID NO: 508) được cho thêm vào các kháng thể kháng CTLA-4 đã pha loãng theo bậc, hoặc các dung dịch không có mặt kháng thể. Trong ví dụ này, liều dùng của kháng thể kháng CTLA-4 nằm trong khoảng từ 1,7pM đến mức tối đa bằng 100nM hoặc 1,0 µM. Tiếp theo, sau 1 giờ ở nhiệt độ phòng (room temperature: RT), các phức hợp kháng thể-protein với nồng độ không đổi của protein hCTLA-4-mFc 200pM được chuyển vào các đĩa vi chuẩn được phủ hB7-1-hIgG1-6His, và phức hợp kháng thể-protein với nồng độ không đổi của hCTLA-4-mFc 400pM được chuyển vào các đĩa đã phủ hB7-2-hIgG1-6His. Sau khi ủ trong 1 giờ nữa ở nhiệt độ RT, các lỗ được rửa, và hCTLA-4-mFc đã gắn kết với đĩa được phát hiện bằng kháng thể đa dòng của dê đặc hiệu với mảnh kháng thể kháng Fcγ của chuột được liên hợp với peroxidaza của cây củ cải cay (horseradish peroxidase: HRP) (JacksonImmunoResearch, West Grove, PA). Các đĩa được làm hiện màu bằng cách sử dụng dung dịch cơ chất TMB (BD Biosciences, San Jose, CA) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất và năng suất hấp thụ được xác định ở bước sóng 450nm trên thiết bị đọc đĩa Victor (PerkinElmerTM, Waltham, MA).

Tất cả các phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng mức liều theo đường sigmoid logistic trong chương trình phần mềm Prism™ (GraphPad, LaJolla, CA). Các tính toán được thực hiện như sau: nồng độ IC₅₀, được định nghĩa là nồng độ kháng thể cần thiết để làm giảm 50% mức độ gắn kết của hCTLA-4 với hB7-1 hoặc B7-2, được sử dụng làm dấu hiệu chỉ báo của khả năng phong bế. Tỷ lệ % mức độ phong bế với nồng độ tối đa của kháng thể được thử nghiệm (100nM hoặc 1,0 uM) được tính toán theo khả năng phong bế của kháng thể đối với sự gắn kết của hCTLA-4-mFc nồng độ 200pM hoặc 400pM với hB7-1 hoặc hB7-2, tương ứng, so với mức nền của thử nghiệm. Tín hiệu gắn kết của các mẫu với hCTLA-4-mFc nồng độ 200pM hoặc 400pM khi không có mặt kháng thể được tham chiếu làm mức độ gắn kết 100% hoặc mức độ phong bế 0%; và tín hiệu cơ sở của dung dịch đệm mẫu không có hCTLA-4-mFc hoặc kháng thể được tham chiếu làm mức độ gắn kết 0% hoặc mức độ phong bế 100%.

Theo các kết quả được thể hiện trong Bảng 4, các kháng thể kháng CTLA-4 của sáng chế có khả năng phong bế sự gắn kết của CTLA-4 của người với các phối tử tự nhiên của nó, B7-1 hoặc B7-2 trong khoảng rộng. Các kháng thể làm ví dụ H1H19273P và H1H19313P có khả năng phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với B7-1 hoặc B7-2 với giá trị IC₅₀ tính theo picomol và với tỷ lệ % mức độ phong bế ~100% với nồng độ kháng thể tối đa 1,0uM. Một số kháng thể, như H1H20373N là các chất phong bế mạnh hơn đối với sự gắn kết của CTLA-4 với B7-2 so với B7-1, trong khi một số kháng thể có khả năng phong bế tối thiểu phối tử khác (H1H19314P2).

Bảng 4: Các kháng thể kháng CTLA-4 phong bế sự gắn kết của hCTLA-4 với các phối tử hB7-1 hoặc hB7-2

	Ab phong bế sự gắn kết của hCTLA-4-mFc 200pM với đĩa được phủ hB7-1/CD80-hIgG1-6His		Ab phong bế sự gắn kết của hCTLA-4-mFc 400pM với đĩa được phủ hB7-2/CD86-hIgG1-6His	
AbPID	Nồng độ Ab tối đa: 100nM			
	IC ₅₀ (M)	Tỷ lệ % phong bế	IC ₅₀ (M)	Tỷ lệ % phong bế
Khả năng phong bế các kháng thể kháng CTLA-4 vùng Fc của người				
H1H19264P	-	8	-	43
H1H19269P	1,0E-10	98	1,9E-10*	100
H1H19274P	1,3E-10	99	2,5E-10	100

H1H19278P	3,2E-10	99	5,4E-10	100
H1H19279P	2,1E-10	97	2,2E-10	100
H1H19280P	1,1E-10	99	2,0E-10	100
H1H19281P	9,4E-11*	99	1,9E-10*	100
H1H19283P	9,7E-09	96	1,2E-09	99
H1H19284P	1,7E-10	98	3,1E-10	99
H1H19291P	2,0E-09	98	2,5E-09	99
H1H19294P	1,5E-10	99	2,5E-10	99
H1H19305P	1,9E-10	98	3,6E-10	99
H1H19307P	1,8E-10	99	2,9E-10	99
H1H19312P	2,0E-10	97	5,1E-10	99
H1H19314P2	-	0	-	7
H1H19327P2	-	7	-	38
H1H19273P	2,5E-10	98	5,4E-10	98
H1H19303P	1,8E-07	90	3,9E-08	97
H1H19313P	4,0E-10	98	7,7E-10	99
H1H19319P2	3,2E-07	85	4,3E-08	97
H1H20370N	8,6E-10	95	9,9E-10	96
H1H20370N2	1,1E-08	85	9,8E-09	92
H1H20372N	2,5E-09	98	9,9E-10	98
H1H20361N	6,9E-08	73	6,5E-08	82
H1H20361N2	1,2E-07	53	1,1E-07	70
H1H20373N	-	22	3,4E-08	91
H1H20375N	-	13	-	29
H1H20380N2	5,0E-10	98	3,8E-10	98
H1H20386N	1,8E-08	94	7,7E-09	96
H1H20386N2	INC	59	1,7E-07	87
Các đối chứng				
Isotyp mIgG2a	-	-6	-	1
Isotyp hIgG1	-	15	-	14

Tỷ lệ % phong bế tối đa âm tính (nghĩa là -8) thể hiện sự tăng mức độ gắn kết của hCTLA-4 phát hiện được khi có mặt kháng thể.

(-) thể hiện giá trị IC_{50} không định lượng đối với sự phong bế các kháng thể <50% với nồng độ cao nhất được thử nghiệm.

(INC): không có kết quả: đường cong gắn kết theo đường sigmoid logistic không được làm khớp bằng chương trình phần mềm Prism™ để tính giá trị IC_{50} .

(*) thể hiện giá trị IC_{50} nhỏ hơn giá trị đáy theo lý thuyết của thử nghiệm ($0,1 \times 10^{-9}$ M

đối với sự gắn kết của hCTLA-4 với hB7-1/CD80, hoặc $0,2 \times 10^9$ M đối với sự gắn kết của hCTLA-4 với hB7-2/CD86)

Ví dụ 5: Các kháng thể kháng CTLA-4 có sự gắn kết mạnh và đặc hiệu với các dòng tế bào được thiết kế với CTLA-4 của người

Trong ví dụ này, khả năng gắn kết đặc hiệu của kháng thể kháng CTLA-4 của người (h) với các dòng tế bào biểu hiện CTLA-4 của người được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện trên cơ sở sự phát quang điện hóa (electrochemiluminescence: ECL).

Tóm lại, các tế bào nguyên bào sợi phôi chuột được phân lập từ chuột Velocimmune® (các nguyên bào sợi VI) được chuyển nhiễm ổn định với CTLA-4 của người (các axit amin M1-N223, mã số truy cập NCBI # NM_005214.4). Các tế bào nguyên bào sợi VI không được chuyển nhiễm không có sự biểu hiện CTLA-4 có thể phát hiện bằng phương pháp phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) và được đưa vào làm đối chứng gắn kết. Ngoài ra, dòng tế bào T của gen thông báo được tạo ra bằng cách tải nạp các tế bào T Jurkat của người bắt tử (ATCC, Manassas, VA) với gen thông báo của lentivirus NFAT-Luc (Qiagen, Germantown, MD) và các cấu trúc thể khảm h, m hoặc mf CTLA-4 cũng được đánh giá trong thử nghiệm này. Các cấu trúc thể khảm chứa miền ngoại bào của hCTLA-4 (aa từ 1 đến 161; mã số truy cập NP_005205.2), CTLA-4 của chuột (ms CTLA-4, các axit amin từ 1 đến 161, mã số truy cập NM_009843.4) hoặc mf CTLA-4 (aa từ 1 đến 161; mã số truy cập XP_005574071.1) được dung hợp với miền xuyên màng và miền chất tế bào của hCD300a (aa từ 181 đến 299; mã số truy cập NP_009192.2).

Khoảng $2,0 \times 10^4$ tế bào nguyên bào sợi VI/hCTLA-4 hoặc $1,0 \times 10^4$ tế bào thể khảm Jurkat/NFAT được cấy riêng rẽ lên các đĩa 96 lỗ có điện cực là cacbon (đĩa gắn kết ở mức cao MULTI-ARRAY, Meso Scale Discovery (MSD; Rockville, MD)) và được ủ trong 1 giờ (h) ở nhiệt độ 37°C . Các vị trí gắn kết không đặc hiệu được phong bế bằng BSA 2% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Hệ pha loãng theo bậc của kháng thể kháng CTLA-4 hoặc kháng thể đối chứng isotyp, nằm trong khoảng từ 1,7 pM đến 150 nM, hoặc dung dịch đệm không chứa kháng thể được cho thêm vào các tế bào đã gắn kết với đĩa trong 1 giờ, ở nhiệt độ RT.

Sau đó, các đĩa được rửa để loại bỏ các kháng thể không gắn kết bằng cách sử dụng thiết bị rửa đĩa AquaMax2000 có đầu rửa tế bào (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Các kháng thể đã gắn kết với đĩa được phát hiện bằng kháng thể đa dòng của dê liên hợp với SULFO-TAGTM kháng kháng thể IgG của người đặc hiệu với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) hoặc kháng thể đa dòng của dê liên hợp với SULFO-TAGTM kháng kháng thể IgG của chuột đặc hiệu với mảnh Fc γ (Jackson ImmunoResearch) trong 1 giờ, ở nhiệt độ RT.

Sau khi rửa, các đĩa được làm hiện màu bằng dung dịch đệm Read (MSD) theo quy trình được khuyến cáo của nhà sản xuất và các tín hiệu phát quang được ghi lại bằng thiết bị SECTOR Imager 600 (MSD). Cường độ phát quang, được xác định theo đơn vị ánh sáng tương đối (relative light unit: RLU), được ghi lại để chỉ ra cường độ gắn kết của mỗi kháng thể ở khoảng nồng độ. Tỷ lệ tín hiệu được phát hiện bằng 0,4nM hoặc 0,6nM kháng thể gắn kết với các tế bào được thiết kế với CTLA-4 so với các tế bào gốc ở cùng nồng độ được ghi lại dưới dạng dấu hiệu của tính đặc hiệu sự gắn kết CTLA-4.

Ngoài ra, các tín hiệu gắn kết trực tiếp (tính theo RLU) được phân tích dưới dạng hàm số của nồng độ kháng thể và các số liệu được làm khớp với mô hình đáp ứng mức liều theo đường sigmoid logistic (bốn thông số logistic) bằng cách sử dụng chương trình phần mềm GraphPad PrismTM (GraphPad, LaJolla, CA). Giá trị EC₅₀, được xác định theo nồng độ của kháng thể mà khi đó phát hiện được 50% tín hiệu gắn kết tối đa, được xác định để chỉ ra hiệu lực gắn kết với các tế bào được thiết kế với CTLA-4.

Các kết quả trong Bảng 5 cho thấy phần lớn các kháng thể kháng CTLA-4 theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với các dòng tế bào được thiết kế với hCTLA-4. Một số kháng thể làm ví dụ, như H1H19303P và H1H19280P gắn kết với giá trị EC₅₀ tính theo picomol và với tỷ lệ gắn kết cao hơn từ 20 đến 23 lần so với sự gắn kết với các dòng tế bào đối chứng.

Sự chọn lọc của các kháng thể được đánh giá thêm về khả năng phản ứng chéo với các dòng tế bào được thiết kế của chuột và khỉ cynomolgus. Kết quả trong Bảng 6 cho thấy các kháng thể kháng CTLA-4 H1H19303P, H1H19273P, H1H19319P2 và H1H19319P có khả năng gắn kết với các dòng tế bào thể khảm Jurkat/NFAT Luc/của

người và CTLA-4 của khỉ cynomolgus/hCD300, với giá trị EC_{50} tính theo picomol. Không quan sát thấy khả năng phản ứng chéo với các tế bào thể khảm CTLA-4 của chuột.

Bảng 5: Các kháng thể kháng CTLA-4 gắn kết đặc hiệu với dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện CTLA-4 của người

Ab PID	Khả năng gắn kết của tế bào với nguyên bào sợi VI/hCTLA-4, EC50 (M)	Tỷ lệ tín hiệu RLU gắn kết với nguyên bào sợi VI /hCTLA-4 so với nguyên bào sợi VI gốc
		Tỷ lệ ở nồng độ Ab 0,4nM
Các đặc tính gắn kết tế bào của kháng thể kháng CTLA-4 vùng Fc của người		
H1H19264P	NB	1
H1H19269P (*)	4,0E-10	15
H1H19273P	INC	11
H1H19274P (*)	3,9E-10	18
H1H19278P	2,2E-10	19
H1H19279P	2,4E-10	18
H1H19280P	1,3E-09	15
H1H19281P	7,5E-11	23
H1H19283P	7,9E-10	7
H1H19284P	INC	7
H1H19291P	INC	5
H1H19294P	6,8E-10	10
H1H19303P (*)	2,1E-10	20
H1H19305P (*)	8,4E-10	12
H1H19307P	3,7E-09	7
H1H19312P (*)	7,0E-10	14
H1H19313P (*)	1,6E-10	11
H1H19314P2 (*)	3,4E-09	8
H1H19319P2	2,4E-10	16
H1H19327P2	2,9E-10	16
Đối chứng		
Đối chứng isotyp hIgG1	NB	1
Các đặc tính gắn kết tế bào của các kháng thể CTLA-4 thể lai (H1M, H2M)		
		Tỷ lệ ở nồng độ Ab 0,6nM

H1M20370N	2,2E-10	23
H1M20372N	8,8E-10	14
H1M20393N (*)	7,3E-09	12
H2M20361N	3,2E-10	19
H2M20368N	2,6E-10	25
H2M20369N	9,0E-10	18
H2M20373N	6,2E-11	22
H2M20375N	1,9E-10	18
H2M20379N	9,2E-11	28
H2M20380N	1,2E-10	28
H2M20385N	5,5E-09	8
H2M20386N	INC	3
H2M20387N	INC	3
Đối chứng		
COMP1	INC	11
Đối chứng isotyp mIgG2	NB	1

NB = không có chất gắn kết; các kháng thể có tỷ lệ gắn kết nhỏ hơn 3 được phân loại làm chất không gắn kết

(*) Giá trị RLU của hai nồng độ kháng thể cao nhất được loại trừ để tính giá trị EC50.

INC = không có kết quả, chương trình phần mềm GraphPad Prism™ không thể làm khớp đường cong sigmoid logistic 4 thông số để tính giá trị EC50, nhưng kháng thể gắn kết đặc hiệu với các tế bào biểu hiện CTLA-4 với tỷ lệ gấp 3 lần hoặc cao hơn so với tế bào gốc.

Bảng 6: Các kháng thể kháng CTLA-4 đã chọn lọc có tính đặc hiệu gắn kết với các dòng tế bào của khỉ và người Jurkat được thiết kế

Ab PID	Khả năng gắn kết của tế bào đối với thể khảm Jurkat/NFAT Luc/CTLA-4 hCD300a, EC50 (M)		Tỷ lệ tín hiệu RLU gắn kết với thể khảm Jurkat/NFAT Luc / CTLA-4 hC300a để gắn kết với Jurkat/NFAT Luc/cl.3C7		
	hCTLA-4	mf CTLA-4	hCTLA-4	mf CTLA-4	ms CTLA-4
			0,4nM	0,4nM	0,4nM
H1H19303P (*)	2,9E-10	1,1E-10	13	17	1
H1H19273P (*)	5,2E-10	2,2E-10	14	20	1
H1H19319P2 (*)	2,8E-10	1,7E-10	13	15	1
H1H19313P (*)	1,1E-10	1,4E-10	16	25	1
Đối chứng					
COMP1	INC	INC	6	8	1
Đối chứng isotyp hIgG1	NB	NB	1	1	1

Khỉ = *Macaca fascicularis*.

NB = không phải chất gắn kết; các kháng thể có tỷ lệ gắn kết nhỏ hơn 3 được phân loại làm chất không gắn kết

(*) Giá trị RLU của hai nồng độ kháng thể cao nhất được loại trừ để tính giá trị EC50. INC = không có kết quả, chương trình phần mềm GraphPad Prism™ không thể làm khớp đường cong sigmoid logistic 4 thông số để tính giá trị EC50, nhưng kháng thể gắn kết đặc hiệu với các tế bào biểu hiện CTLA-4 với tỷ lệ gấp 3 lần hoặc cao hơn so với tế bào gốc.

Ví dụ 6: Các kháng thể kháng CTLA-4 gây ra sự hoạt hóa của tế bào T trong hệ thử nghiệm sinh học tế bào T/APC của gen thông báo được thiết kế

Trong ví dụ này, các thử nghiệm sinh học đối với gen thông báo luciferaza trên cơ sở tế bào T/tế bào trình diện kháng nguyên (Antigen Presenting Cell: APC) được phát triển để đánh giá hiệu quả phong bế sự tương tác CTLA-4/CD80 hoặc CTLA-4/CD86 và sự hoạt hóa tế bào T. Trong một định dạng thử nghiệm sinh học, hiệu quả của việc sử dụng kháng thể kháng CTLA-4 đối với hệ tế bào T/APC được đánh giá bằng cách xác định hoạt tính của luciferaza. Trong thử nghiệm thứ hai, khả năng gây

ra sự giải phóng interleukin (IL)-2 của các kháng thể kháng CTLA-4 được đánh giá.

Như được mô tả trong các ví dụ trên đây, các kháng thể kháng CTLA-4 được thử nghiệm trong ví dụ này có sự gắn kết với CTLA-4 của người và khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) thông qua sự cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) và có sự gắn kết đặc hiệu và mạnh với các dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện CTLA-4 của người. Các kháng thể CTLA-4 đã chọn lọc này cũng đã được chứng minh trước đây là có tác dụng phong bế sự gắn kết của CTLA-4 với B7-1 (CD80) và B7-2 (CD86).

Bối cảnh

Sự hoạt hóa tế bào T đạt được bằng cách kích thích các thụ thể tế bào T (TCR) nhận biết các peptit đặc hiệu được trình diện bởi các protein của phức hợp tương thích mô chính nhóm I hoặc II (MHCI hoặc MHCII) trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) (Goldrath *et al.* 1999). Thụ thể TCR đã hoạt hóa lại khởi mào thác sự kiện truyền tín hiệu, sự kiện này có thể được theo dõi bằng các gen thông báo, được định hướng bởi các yếu tố phiên mã khác nhau như chất hoạt hóa-protein 1 (AP-1), yếu tố nhân của các tế bào T được hoạt hóa (NFAT) hoặc chất tăng cường chuỗi nhẹ kappa của yếu tố nhân của các tế bào T hoạt hóa (NF κ B). Sau đó, sự đáp ứng của tế bào T được cải thiện thêm thông qua sự tham gia của các đồng thụ thể biểu hiện cơ định hoặc cảm ứng trên các tế bào T như CD28, CTLA-4 (protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4), PD-1 (protein 1 gây chết tế bào theo chương trình), LAG-3 (gen hoạt hóa tế bào lymphô 3) hoặc các phân tử khác (Sharpe *et al.* 2002). Các đồng thụ thể, CD28 và CTLA-4 cạnh tranh với các phối tử giống nhau, CD80 và CD86 được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) mà CTLA-4 có ái lực với nó cao hơn so với CD28. CTLA-4 có chức năng làm mờ và ức chế sự hoạt hóa của CD28 bằng cách cô lập các phối tử dẫn đến làm giảm sự hoạt hóa tế bào T. (Alegre *et al.* 2001 và Walker *et al.* 2011).

Hoạt tính NFAT-Luciferaza

Thiết kế dòng tế bào: Các tế bào T của gen thông báo được thiết kế bằng cách tải nạp các dòng tế bào T Jurkat của người bất tử (ATCC), biểu hiện nội sinh TCR và CD28 trên bề mặt tế bào, với gen thông báo của lentivirus NFAT-Luc (Qiagen, Rockville, MD) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Lentivirus mã hóa gen luciferaza của đom đóm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu của virus cự bào (Cytomegalovirus: CMV)

tối thiểu và các đoạn lặp nối tiếp của yếu tố đáp ứng phiên mã (transcriptional response element: TRE) NFAT và gen kháng puromycin.

Sau khi chọn lọc kháng sinh và tách dòng đơn, dòng vô tính Jurkat/NFAT-Luc 3C7 (Jurkat/NFAT-Luc cl.3C7) được tải nạp với các protein thể khảm CTLA-4 của người (h) hoặc khỉ (mf - *Macaca fascicularis*) mã hóa lentivirus. Cấu trúc thể khảm chứa miền ngoại bào của hCTLA-4 (aa từ 1 đến 161; mã số truy cập NP_005205.2) hoặc mfCTLA-4 (aa từ 1 đến 161; mã số truy cập XP_005574071.1) được dung hợp với miền xuyên màng và miền chất tế bào của CD300a (aa từ 181 đến 299; mã số truy cập NP_00919.2). CD300a được tìm thấy trên các tế bào miễn dịch và truyền tín hiệu ức chế qua motif ức chế trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch của nó (ITIM) (DeBell *et al.* 2012). Các dòng tế bào T ổn định tạo thành, Jurkat/NFAT-Luc/ hCTLA-4-hCD300a và Jurkat/NFAT-Luc/mfCTLA-4-hCD300a, được chọn lọc và duy trì trong môi trường RPMI + FBS 10% + penicillin + streptomycin + glutamine được bổ sung G418 500µg/ml và puromycin 1µg/ml.

Các tế bào B Raji của người (ATCC, Manassas, VA), biểu hiện nội sinh CD20, các thụ thể Fc gamma (FcγR), CD80 và CD86 trên bề mặt tế bào, được sử dụng làm tế bào APC trong thử nghiệm sinh học trên cơ sở luciferaza. Các tế bào Raji được duy trì trong môi trường RPMI + FBS 10%+ penicillin + streptomycin + glutamine được bổ sung HEPES và natri pyruvat.

Sự kích thích tế bào T/APC: các tế bào T của gen thông báo được kích thích bằng tế bào T hoạt hóa kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20xCD3 (REGN2281), hướng đích CD3 được biểu hiện trên các tế bào T Jurkat và hướng đích CD20 trên các tế bào B Raji. Chế độ đặc hiệu kép của sự gắn kết của REGN2281 dẫn đến làm gia tăng nồng độ gen thông báo được ghép đôi với NFAT, luciferaza, trong các tế bào T Jurkat/NFAT-Luc.

Tuy nhiên, trong các tế bào thể khảm Jurkat/NFAT-Luc/CTLA-hCD300a, sự hoạt hóa tối đa của gen thông báo với REGN2281 bị suy giảm do sự truyền tín hiệu ức chế được truyền thông qua sự tương tác của các thụ thể thể khảm CTLA-4-hCD300a với các phối tử của nó, CD80/CD86, được biểu hiện trên các tế bào Raji. Trong thử nghiệm sinh học này, về mặt lý thuyết, các kháng thể kháng CTLA-4 phong bế trực tiếp CTLA-4/CD80 và CD86 sẽ khôi phục hoạt tính của NFAT-Luc trong các tế bào của

gen thông báo Jurkat bằng cách làm vô hiệu hóa tín hiệu ức chế được cung cấp qua đuôi CD300a của protein CTLA-4 thể khảm.

Trong định dạng thử nghiệm này, các kháng thể kháng CTLA-4 có thể đồng thời tạo ra tín hiệu chủ vận trong Jurkats, được khơi mào bởi sự gắn kết của kháng thể Fc với FcγR trên các tế bào Raji. Sự phong bế FcγR với mức bão hòa của phân tử IgG hoặc các kháng thể đặc hiệu FcγR có thể làm giảm tác dụng chủ vận của các kháng thể CTLA-4. Do đó, bước phong bế Fc được đưa vào thử nghiệm này để ức chế sự gắn kết của mAb CTLA-4 với FcγR trên các tế bào Raji.

Thử nghiệm luciferaza: 24 giờ trước khi sàng lọc, 5×10^5 tế bào T của gen thông báo và $7,5 \times 10^5$ APC Raji được nuôi cấy trong môi trường thử nghiệm (RPMI1640 được bổ sung FBS 10% và penicillin + streptomycin + glutamine (PSG)). Ngày hôm sau, các kháng thể kháng CTLA-4 và các đối chứng âm tính phù hợp isotyp (được pha loãng theo bậc theo tỷ lệ 1:3; khoảng liều từ 15 pM đến 100 nM) được thử nghiệm với sự có mặt của REGN2281 100pM và chất phong bế Fc 10nM hoặc đối chứng isotyp IgG4 của người 10nM để giữ các thụ thể FcγRIIb nội sinh trên tế bào Raji. Các kháng thể đã pha loãng theo bậc được cho vào các lỗ tương ứng trong đĩa đáy phẳng màu trắng có 96 lỗ (Nunc/Thermo Fisher, Pittsburgh, PA) chứa nồng độ cố định của REGN2281 100pM/chất phong bế Fc 10nM hoặc REGN2281 100pM /đối chứng isotyp hIgG4 10 nM. Các tế bào T của gen thông báo và APC Raji được tái tạo hỗn dịch với nồng độ 2×10^6 /ml và trước tiên, các tế bào T được cho thêm trước tiên vào các lỗ với nồng độ cuối bằng 5×10^4 tế bào/lỗ. Các đĩa được ủ trong thời gian từ 15 đến 30 phút ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%, sau đó cho thêm các tế bào Raji với nồng độ cuối bằng 5×10^4 tế bào/lỗ. Các mẫu được ủ trong thời gian từ 4 đến 6 giờ nữa ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%, trước khi cho thêm 100μl ONE-Glo™ (Promega, Madison WI) để phát hiện hoạt tính NFAT-Luc. Ánh sáng phát ra được thu giữ theo đơn vị ánh sáng tương đối (RLU) trên thiết bị đọc đĩa đa nhãn Victor (PerkinElmer, Waltham, MA). Tất cả các hệ pha loãng theo bậc được thử nghiệm hai lần.

Giá trị EC_{50} của các kháng thể CTLA-4 được xác định từ phương trình logistic bốn thông số trên đường cong đáp ứng liều theo 10 điểm bằng cách sử dụng chương trình phần mềm GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA). Tỷ lệ cảm ứng được tính bằng cách chuẩn hóa giá trị RLU tương đối của mỗi mẫu với giá trị trung bình của các

mẫu không chứa kháng thể CTLA-4, được thiết lập bằng 1.

Kết quả: Theo kết quả được thể hiện trong Bảng 7, không quan sát thấy sự tăng hoạt tính của gen thông báo (luciferaza) khi các kháng thể kháng CTLA-4 được cho thêm vào các tế bào gốc Jurkat/NFAT-Luc cl 3C7 cùng với APC Raji, với sự có mặt của chất phong bế REGN2281 +/- Fc. Tuy nhiên, mức độ tăng hoạt tính của luciferaza ghi được khi các kháng thể kháng CTLA-4 được cho thêm vào hệ Jurkat/NFAT-Luc/h các dòng tế bào thể khảm mf CTLA-4/hCD300/APC Raji, với sự có mặt của chất phong bế REGN2281 +/- Fc. Trong định dạng thử nghiệm sinh học này, các kháng thể kháng CTLA-4 phong bế sự tương tác của CTLA-4 trên các tế bào của gen thông báo Jurkat với CD80/CD86 được biểu hiện nội sinh trên các tế bào Raji, dẫn đến tạo ra protein luciferaza. Các kháng thể kháng CTLA-4 được thử nghiệm trong thử nghiệm này làm tăng hoạt tính của luciferaza, với giá trị lớn nhất quan sát được khi có mặt chất phong bế Fc, với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 1,77nM đến 7,67nM. Như được thể hiện trong Bảng 7, H1H19303P có hiệu quả tốt hơn so với các chất so sánh 1 và 2 khi được thử nghiệm.

Thử nghiệm giải phóng intolokin 2 của người (hIL-2) của tế bào T/APC CTLA-4

Thiết kế dòng tế bào: Dòng vô tính Jurkat/NFAT-Luc 3C7 (như đã mô tả trên đây) được tải nạp với sup lentivirus tự tạo ra mã hóa protein hCTLA-4 có chiều dài đầy đủ (mã số truy cập NP_005205.2). Dòng tế bào T ổn định tạo thành (Jurkat/NFAT-Luc/hCTLA-4 wt) được lựa chọn để biểu hiện ở mức cao bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng và được duy trì trong môi trường RPMI + FBS 10%+ PSG được bổ sung G418 500 µg/ml và puromycin 1µg/ml.

Các tế bào thận phôi người (Human Embryonic Kidney: HEK) 293 (ATCC) được chuyển nhiễm với CD20 của người và được dùng để tải nạp với sup lentivirus để biểu hiện qua mức hCD80 (aa từ 1 đến 288; mã số truy cập NP_005182.1) hoặc hCD86 (aa từ 1 đến 329; mã số truy cập NP_787058.4) được dung hợp với protein huỳnh quang xanh lá cây ((green fluorescent protein: GFP); aa từ 2 đến 240; mã số truy cập WP_031943942.1) với nhóm liên kết 4xG4S ở giữa. Sau khi tách dòng vô tính bằng cách giới hạn mức pha loãng, các dòng vô tính tạo thành sau đây được tạo ra: HEK293/hCD20/hCD80-GFP dòng vô tính 1F4 và HEK293/hCD20/hCD86-GFP

dòng vô tính 4G5. Các dòng tế bào được duy trì trong DME + FBS 10% + PSG + các axit amin không thiết yếu ((non-essential-amino-acid: NEAA), Irvine Scientific, Santa Ana, CA) được bổ sung G418 500 $\mu\text{g/ml}$.

Kích thích tế bào T/APC: Các tế bào đã thiết kế được kích thích bằng kháng thể đặc hiệu kép REGN2281 hoạt hóa tế bào T, như được mô tả trên đây. Sự gắn kết của REGN2281 với CD3 dẫn đến sự kết cụm của cấu trúc dưới phân tử CD3 trong phức hợp với thụ thể TCR và hoạt hóa tế bào T, quá trình này lại giải phóng hIL-2. Sự giải phóng IL-2 có thể được gắn kết thêm bằng sự tương tác của CD28 với các phối tử của nó, CD80 hoặc CD86 nằm trên các tế bào HEK293 đã thiết kế. Sự hoạt hóa tối đa các tế bào Jurkat/NFAT-Luc/hCTLA-4 bị suy giảm do sự cạnh tranh của CTLA-4 với CD28 để gắn kết của các phối tử CD80/CD86 trên tế bào HEK293 (Carreno *et al.* 2000).

Trong thử nghiệm sinh học này, các kháng thể phong bế sự tương tác CTLA-4/CD80 hoặc CD86 sẽ khôi phục sự giải phóng IL-2 trong các tế bào Jurkat đã thiết kế bằng cách vô hiệu hóa nhánh CTLA-4 ức chế.

Thử nghiệm giải phóng IL-2: trước khi sàng lọc 24 giờ, các tế bào T đã thiết kế được nuôi cấy thành mật độ 5×10^5 tế bào/ml trong môi trường thử nghiệm (RPMI 1640 + FBS 10%+ PSG). Ngày hôm sau, các tế bào HEK293 được rửa bằng D-PBS (Irvine Scientific), được tách bằng trypsin (Specialty Media) và được phong bế bằng môi trường thử nghiệm. Tiếp theo, các tế bào HEK293 được xử lý bằng môi trường thử nghiệm chứa Mitomycin C 50 $\mu\text{g/ml}$ để làm ngừng sự phát triển của tế bào, trong 1 giờ ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%. Sau đó, các tế bào được rửa kỹ bằng môi trường thử nghiệm để loại bỏ Mitomycin C tự do.

Các kháng thể kháng CTLA-4 và đối chứng isotyp của chúng được pha loãng theo bậc theo tỷ lệ 1:3 trong môi trường thử nghiệm, với hệ pha loãng 10 điểm nằm trong khoảng từ 15pM đến 100nM. Các kháng thể đã pha loãng theo bậc được cho vào các lỗ tương ứng trong các đĩa đáy tròn có 96 lỗ (Nunc) chứa nồng độ cố định của REGN2281 300pM. Các tế bào của gen thông báo được cho vào các đĩa với nồng độ cuối bằng 1×10^5 tế bào/lỗ. Các đĩa được ủ trong thời gian từ 15 đến 30 phút ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 5%, sau đó cho thêm các tế bào HEK293 với nồng độ cuối bằng $2,5 \times 10^3$ tế

bào/lỗ. Các đĩa được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5% và các dịch nổi bề mặt được thu gom và sử dụng cho các phép đo IL-2. Nồng độ IL-2 được xác định bằng cách sử dụng kit AlphaLISA (PerkinElmer) theo quy trình của nhà sản xuất. Các kết quả đo thu được trên thiết bị đọc đĩa đa nhãn Envision (PerkinElmer). Tất cả các hệ pha loãng theo bậc được thử nghiệm hai lần.

Giá trị EC₅₀ của các kháng thể mAb CTLA-4 được xác định từ phương trình logistic bốn thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism. Tỷ lệ cảm ứng được tính toán bằng cách chuẩn hóa các giá trị IL-2 tương đối của mỗi mẫu với mẫu không chứa kháng thể CTLA-4. Bảng 9 thể hiện tỷ lệ cảm ứng đạt được ở mức 100nM và giá trị EC₅₀ theo tính toán đạt được trong thử nghiệm giải phóng hIL-2.

Kết quả: Như kết quả được thể hiện trong Bảng 8, các kháng thể kháng CTLA-4 được thử nghiệm trong thử nghiệm này tạo ra sự sản sinh IL-2 trong hệ Jurkat/NFAT-Luc/CTLA-4 thể khảm//Raji APC. Ở nồng độ 100nM, các kháng thể kháng CTLA-4 tạo ra sự sản sinh IL-2 với hoạt tính cao hơn từ 4 đến 6 lần hoạt tính quan sát được trong hệ thử nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào T của gen thông báo âm tính với CTLA-4. Như được thể hiện trong Bảng 8, H1H19303P có tính năng tốt hơn so với các chất so sánh 1 và 2 khi được thử nghiệm.

Tóm lại

Tóm lại, các kháng thể kháng CTLA-4 đã chọn lọc được thử nghiệm trong hai hệ thử nghiệm sinh học tế bào T đã thiết kế/APC được thiết kế để đánh giá hoạt tính của các kháng thể đối với sự hoạt hóa tế bào T. Theo một định dạng, các kháng thể kháng CTLA-4 hoạt hóa tế bào T khi được xác định theo mức tăng hoạt tính NFAT-Luciferaza, điều này cho thấy rằng các kháng thể này phong bế sự tương tác giữa CTLA-4 và các phối tử CD80 và CD86. Theo định dạng thứ hai, các kháng thể kháng CTLA-4 gây ra sự sản sinh IL-2, điều này cho thấy rằng các kháng thể kháng CTLA-4 có thể phong bế sự tương tác CTLA-4/CD80 và CTLA-4/CD86, nhờ đó khôi phục sự giải phóng IL-2.

Bảng 7: EC₅₀ của Mab CTLA-4 trong thử nghiệm hoạt tính luciferaza đối với tế bào T/APC của CTLA-4

Hệ thử nghiệm	Tế bào T: Jurkat/NFATLuc cl.3C7 gốc [M]		Tế bào T: Jurkat/NFAT-Luc hCTLA- 44/hCD300 [M]		Tế bào T: Jurkat/NFAT-Luc mfCTLA- 4/hCD300 [M]	
	APC: Raji		APC: Raji		APC: Raji	
Kháng thể 100nM	Phong bể - Fc	Phong bể + Fc	Phong bể - Fc	Phong bể + Fc	Phong bể - Fc	Phong bể + Fc
H1H19273P	-	-	2,74E- 09	3,83E- 09	3,05E- 09	1,83E- 09
H1H19291P	-	-	2,36E- 09	3,92E- 09	-	7,67E- 09
H1H19313P	-	-	1,69E- 09	3,47E- 09	1,34E- 09	1,84E- 09
H1H19303P	-	-	1,61E- 09	1,73E- 09	1,28E- 09	1,77E- 09
H1H19319P2	-	-	2,47E- 09	4,18E- 09	-	4,91E- 09
H1H19327P2	-	-	4,20E- 09	5,49E- 09	-	5,76E- 09
COMP1			3,20E- 09	3,30E- 09	-	3,00E- 09
COMP2			1,97E- 09	2,07E- 09	1,11E- 09	1,70E- 09
Isotyp hIgG1	-	-	-	-	-	-
Isotyp hIgG2	-	-	-	-	-	-

(-) thể hiện rằng không thể xác định được giá trị EC₅₀ từ đường cong đã làm khớp

Bảng 8: Tỷ lệ cảm ứng của Mab CTLA-4 ở nồng độ 100nM và EC₅₀ của Mab CTLA-4 trong thử nghiệm giải phóng IL-2 của tế bào T/APC của CTLA-4

Hệ thử nghiệm	Tế bào T: Jurkat/NFATLuc cl.3C7 gốc		Tế bào T: Jurkat/NFAT-Luc hCTLA-44/hCD300		Tế bào T: Jurkat/NFAT-Luc mfCTLA-4/hCD300	
	APC: HEK293/hCD20		APC: HEK293/hCD20/hCD80		APC: HEK293/hCD20/hCD86	
Kháng thể 100nM	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ cao gấp ở nồng độ 100nM	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ cao gấp ở nồng độ 100nM	EC ₅₀ [M]	Tỷ lệ cao gấp ở nồng độ 100 nM
H1H19273P	-	0,9	3,33E-08	5,1	1,14E-08	6,5
H1H19303P	-	1,1	4,09E-08	5,4	4,09E-08	4,4
H1H19313P	-	0,9	2,19E-08	5,7	2,19E-08	6,1
H1H19319P2	-	1,6	1,56E-08	4,2	1,56E-08	6,4
COMP1	-	1,3	1,83E-08	4,1	4,63E-08	6,3
COMP2	-	0,9	1,17E-08	5,0	9,71E-08	5,0
Isotyp hIgG1	-	1,2	-	0,8	-	1,1
Isotyp hIgG2	-	0,8	-	1,0	-	1,0

(-) thể hiện rằng không thể xác định được giá trị EC₅₀ từ đường cong đã làm khớp

Ví dụ 7: Hiệu quả của các kháng thể kháng CTLA-4 đối với khối u

Thử nghiệm này mô tả hiệu quả kháng u của các kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ của sáng chế đối với sự phát triển của khối u MC38.Ova ở chuột được làm cho giống với của người về gen CTLA-4.

Chuột nhập gen CTLA-4^{hum/hum} của người được thiết kế trên cơ sở chủng C57BL/6 bằng cách sử dụng kỹ thuật VelociGene™, trong đó chuột biểu hiện protein thể khảm chứa miền ngoại bào CTLA-4 của người được dung hợp với miền xuyên màng và miền chất tế bào CTLA-4 của chuột từ locut Ctla4 nội sinh (Valenzuela et al 2003; Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Dòng tế bào MC38.Ova được thiết kế bằng cách tải nạp các tế bào MC38 bằng lentivirus ổn định để biểu hiện kháng nguyên lòng trắng trứng gà xuyên màng (Ova).

Nghiên cứu (A)

Chuột nhập gen CTLA-4^{hum/hum} được cấy các tế bào MC38.Ova qua đường dưới da (subcutaneously: SC) (10⁶ tế bào/con) vào ngày 0 và được cho sử dụng

H1H19273P, hoặc H1H19303P, hoặc H1H19319 với liều 10 mg/kg hoặc đối chứng isotyp hIgG1 với liều 10 mg/kg qua đường IP vào các ngày 3, 7, 10, 14 và 17. Thể tích khối u và các con chuột không có khối u được theo dõi trong tối đa 37 ngày.

Cả ba kháng thể kháng CTLA-4 đều có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u một phần được thử nghiệm với liều 10 mg/kg so với nhóm điều trị bằng đối chứng isotyp (Fig.1). Việc điều trị bằng H1H19303P làm cho 8 trong số 9 con chuột (89%) không có khối u ở nhóm dùng liều 10 mg/kg vào ngày 24 (Fig.2). Việc điều trị bằng H1H19319P hoặc H1H19273P có hiệu quả tương tự, dẫn đến ức chế sự phát triển của khối u hoàn toàn ở 7 trong số 9 con chuột (78%) và 5 trong số 9 con chuột (56%) tương ứng vào ngày 24. Không con chuột nào không có khối u ở nhóm được điều trị bằng đối chứng isotyp vào ngày 24. Thể tích khối u vào ngày 24 là nhỏ hơn đáng kể ($p < 0,0001$) đối với mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể kháng CTLA-4 so với nhóm được cho sử dụng đối chứng isotyp.

Chuột quan sát thấy không có khối u vào ngày 24 được theo dõi trong 37 ngày sau khi cấy. Tỷ lệ sống cao hơn đáng kể ở chuột được điều trị bằng các kháng thể kháng CTLA-4 của người ($p < 0,0001$) so với chuột được cho sử dụng đối chứng isotyp (Fig.3). Quan sát thấy không có sự tái phát khối u ở tất cả các con chuột không có khối u ở nhóm sử dụng kháng thể kháng CTLA-4. Không quan sát được dấu hiệu về sự giảm trọng lượng cơ thể do việc điều trị bằng kháng thể.

Tóm lại, việc điều trị bằng mỗi kháng thể trong số ba kháng thể kháng CTLA-4 của người (H1H19273P, H1H19303P, và H1H19319) dẫn đến làm giảm sự phát triển của khối u, cải thiện sự thanh thải khối u và cải thiện sự sống so với đối chứng isotyp. Hiệu quả của mỗi kháng thể trong số ba kháng thể kháng CTLA-4 của người trong mô hình này là tương đương.

Nghiên cứu (B)

Kháng thể kháng CTLA-4 làm ví dụ được sử dụng cho nghiên cứu này là kháng thể của người có chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với CTLA-4 của người và chứa vùng HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 có trình tự SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208 và vùng HCVR/LCVR có trình tự SEQ ID No: 194/202 (còn được gọi là H1H19303P). Trình tự axit amin chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của H1H19303P (còn được gọi là REGN4659) được thể hiện trong trình tự

SEQ ID NO: 509, và trình tự axit amin chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của H1H19303P được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 510 (Bảng 9).

Bảng 9: các trình tự axit amin của H1H19303P

Vùng Ab	Trình tự axit amin
HCVR	SEQ ID NO: 194 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMSWVRQAPGKG LEWVSSIRTSGTT KYYADSMKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGG TFLHYWGQGTLLTVSS
LCVR	SEQ ID NO: 202 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASYLAWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQTGVP SRFSGSGYGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAQSFPMYTFGQGTKL EIK
HCDR1	SEQ ID NO: 196 GFTFSNYE
HCDR2	SEQ ID NO: 198 IRTSGTTK
HCDR3	SEQ ID NO: 200 AGGGTFLHY
LCDR1	SEQ ID NO: 204 QGIASY
LCDR2	SEQ ID NO: 206 AAS
LCDR3	SEQ ID NO: 208 QQAQSFPMYT
HC	SEQ ID NO: 509 <u>*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSSIRTSGTT</u> <u>KYYADSMKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGG</u> <u>TFLHYWGQGTLLTVSS</u> ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGA LTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHITCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP

	SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
LC	SEQ ID NO: 510 *DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGIASYLA WYQQKPGKAP KLLIYAASSLQTGVP SRFSGSGYGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA KSFP MYTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

*trình tự được gạch chân là vùng biến đổi

Sử dụng và phân tích hoạt tính kháng u của các kháng thể kháng CTLA-4

Hoạt tính kháng u của H1H19303P được thử nghiệm với liều khác nhau ở chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* mang khối u MC38.Ova. Đối chứng isotyp hIgG1 được đưa vào làm đối chứng âm tính. Chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* được cấy qua đường SC vào sườn sau với liều 1×10^6 tế bào MC38.Ova vào ngày 0 và được iách thành bốn nhóm điều trị (Bảng 10). Chuột được cho sử dụng H1H19303P, hoặc đối chứng isotyp hIgG1 qua đường IP vào các ngày 3, 6, 9, 13 và 16. Thể tích khối u được xác định bằng thước cặp hai lần một tuần trong 37 ngày. Chuột có khối u bị giết bằng CO₂ hoặc vào ngày 37 hoặc ở các thời điểm sau: thể tích khối u $> 2000 \text{ mm}^3$ hoặc khối u bị loét. Chuột không có khối u được theo dõi cho đến 107 ngày để nghiên cứu sự sống.

Bảng 10: Kế hoạch dùng liều đối với nghiên cứu hiệu quả ở chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* được cấy các tế bào MC38.Ova

Các nhóm điều trị	Liều	Số lượng chuột/nhóm	Đường sử dụng	Liệu trình dùng liều	Liệu trình lấy máu ^a
H1H19303P	2 mg/kg	8	IP	Các ngày 3, 6, 9, 13, và 16	Các ngày -2, 6, 13, 20
H1H19303P	5 mg/kg	8			
H1H19303P	10 mg/kg	8			
Đối chứng isotyp hIgG1	10 mg/kg	7			

^a Các mẫu huyết thanh được phân tích về nồng độ kháng thể bằng thử nghiệm ELISA. Các mẫu được lấy vào các ngày 6, 13, và 20 được phân tích đối với nhóm sử dụng

H1H19303P và nhóm đối chứng sử dụng hIgG1 với liều 10 mg/kg, và các mẫu được lấy vào các ngày 6 và 20 được phân tích đối với nhóm sử dụng H1H19303P với liều 2 mg/kg và 5 mg/kg.

Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch dưới hàm dưới hai ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm (ngày -2) và hai giờ trước khi sử dụng kháng thể vào các ngày 6, 13 và 20. Các mẫu huyết thanh được đông lạnh và bảo quản dùng cho các phép đo sau đó về nồng độ kháng thể trong huyết thanh.

Việc phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism (Version 6). Ý nghĩa thống kê đối với sự khác biệt về thể tích khối u giữa các nhóm động vật được xác định bằng phương pháp phân tích ANOVA một chiều với kiểm định hậu kiểm nhiều so sánh Dunnett. Ý nghĩa thống kê đối với sự sống không có khối u được xác định bằng kiểm định log-rank (Mantel-Cox). Để xác định xem mỗi nhóm có khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng hay không, phép phân tích Mantel-Cox hai nhóm được thực hiện với mức có ý nghĩa ($\alpha=0,05$) được điều chỉnh đối với số lượng so sánh ($k=6$) bằng cách sử dụng phương pháp Bonferroni ($\alpha_{\text{điều chỉnh}}=0,05/6$).

Nồng độ trong huyết thanh của kháng thể IgG toàn phần của người

Nồng độ trong huyết thanh của kháng thể H1H19303P toàn phần và kháng thể đối chứng isotyp hIgG1 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa đặc hiệu với sự phát hiện Fc γ của người. Các mẫu huyết thanh được lấy vào các ngày 6, 13, và 20 được phân tích đối với nhóm sử dụng H1H19303P và nhóm đối chứng sử dụng hIgG1 với liều 10 mg/kg, và các mẫu được lấy vào ngày 6 và ngày 20 được phân tích đối với nhóm sử dụng H1H19303P với liều 2 mg/kg và 5 mg/kg. Tóm lại, kháng thể đa dòng của dê kháng Fc γ của người với nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$ trong PBS được cho hấp phụ thụ động vào đĩa vi chuẩn qua đêm ở nhiệt độ 4°C, sau đó phong bế sự gắn kết không đặc hiệu bằng BSA 5% trong PBS. Chất chuẩn được sử dụng để hiệu chỉnh trong thử nghiệm này là H1H19303P, hoặc kháng thể đối chứng isotyp với nồng độ nằm trong khoảng từ 2,7 đến 350 ng/ml (pha loãng theo bậc với tỷ lệ 1:2). Các hệ pha loãng theo bậc của chất chuẩn và các mẫu huyết thanh được điều chế trong chất đệm pha loãng (BSA 0,5% trong PBS). Sau đó, các mẫu được cho vào đĩa đã phủ

kháng thể kháng hFcγ- (100 μl/lỗ) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các kháng thể IgG của người bị bắt giữ trên đĩa được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng hFcγ liên hợp với HRP 160 ng/ml trong chất đệm pha loãng. Cơ chất HRP tạo sắc tố, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) được sử dụng để phát hiện hoạt tính của HRP, và giá trị OD₄₅₀ tạo thành được đọc trên đầu đọc đĩa đa phương thức Perkin Elmer Victor X4. Nồng độ thấp nhất của chất chuẩn (H1H19303P, hoặc kháng thể đối chứng isotyp) được sử dụng để hiệu chỉnh (2,7 ng/ml) nằm trong khoảng động lực học của thử nghiệm và được xác định là giá trị LLOQ của thử nghiệm này. Dữ liệu được phân tích bằng phương pháp hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism. Nồng độ trung bình của 2 thử nghiệm lặp lại được sử dụng để phân tích.

Nồng độ trong huyết thanh của kháng thể của chuột kháng kháng thể của người

Chuẩn độ IgG của chuột của kháng thể kháng H1H19303P hoặc kháng thể đối chứng kháng IgG1 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa đặc hiệu với việc phát hiện mỗi kháng thể trong số các kháng thể được tiêm. Các mẫu huyết thanh được lấy vào các ngày 6, 13, và 20 được phân tích đối với nhóm sử dụng H1H19303P và nhóm đối chứng sử dụng hIgG1 với liều 10 mg/kg, và các mẫu được lấy vào ngày 6 và ngày 20 được phân tích đối với nhóm sử dụng H1H19303P với liều 2 mg/kg và 5 mg/kg. Tóm lại, kháng thể H1H19303P hoặc kháng thể đối chứng kháng IgG1 với nồng độ 1 μg/ml trong PBS được hấp thụ thụ động vào đĩa vi chuẩn qua đêm ở nhiệt độ 4°C, sau đó phong bế sự gắn kết không chọn lọc bằng albumin huyết thanh bò 5% (bovine serum albumin: BSA) trong PBS. Các hệ pha loãng theo bậc của các mẫu huyết thanh được điều chế trong dung dịch đệm pha loãng (BSA 0,5% trong PBS) bắt đầu từ tỷ lệ 1:500. Do đó, hệ số pha loãng tương ứng (500) được xác định theo giới hạn phát hiện dưới (limit of detection: LOD) của thử nghiệm. Sau đó, các mẫu được cho vào các đĩa đã phủ kháng thể H1H19303P hoặc kháng thể đối chứng kháng IgG1 (100μl/lỗ) và được ủ trong thời gian từ 16 đến 18 giờ ở nhiệt độ 4°C. Các lỗ chỉ được bổ sung thêm chất đệm pha loãng được đưa vào để xác định mức nền của thử nghiệm. Sau đó, IgG của chuột bị bắt giữ trên đĩa được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng của dê kháng Fcγ của chuột được liên hợp với peroxidaza của cây cải cay (HRP) với nồng độ 40 ng/ml. Cơ chất HRP tạo sắc tố, TMB được sử dụng

để phát hiện hoạt tính của HRP, và mật độ quang tạo thành ở bước sóng 450nm (OD_{450}) được đọc trên đầu đọc đĩa đa chế độ Perkin Elmer Victor X4. Số liệu của tín hiệu gắn kết so với hệ số pha loãng được phân tích bằng phương pháp hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism và các chuẩn độ được tính toán. Chuẩn độ MAHA được xác định làm hệ số pha loãng theo tính toán của mẫu huyết thanh tương ứng với tín hiệu gắn kết tương đương với hai lần tín hiệu nền của thử nghiệm.

Kết quả

Chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* được cấy các tế bào MC38.Ova qua đường SC vào ngày 0 và được cho sử dụng H1H19303P với liều 2, 5, hoặc 10 mg/kg hoặc đối chứng isotyp hIgG1 với liều 10 mg/kg qua đường IP vào các ngày 3, 6, 9, 13 và 16. Thử tích khối u được theo dõi trong 37 ngày, và các con chuột không có khối u được theo dõi cho đến 107 ngày.

H1H19303P có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u một phần với tất cả các liều được thử nghiệm (Fig.4) so với việc điều trị bằng đối chứng isotyp. Việc điều trị bằng H1H19303P dẫn đến 5 trong số 8 con chuột (63%) không có khối u ở cả nhóm dùng liều 5 mg/kg và 10 mg/kg và 2 trong số 8 con chuột (25%) không có khối u ở nhóm dùng liều 2 mg/kg vào ngày 20. Thử tích khối u vào ngày 20 nhỏ hơn đáng kể ($p<0,0001$) ở các nhóm điều trị bằng H1H19303P so với nhóm được cho sử dụng đối chứng isotyp (Fig.5).

Các con chuột quan sát thấy không có khối u vào ngày 20 được theo dõi cho đến 107 ngày sau khi cấy. Tỷ lệ sống ở chuột được điều trị bằng H1H19303P ($p<0,0001$) cao hơn đáng kể so với chuột được cho sử dụng đối chứng isotyp (Fig.6). Không quan sát thấy sự phát triển của khối u ở 24 trong số 25 con chuột không có khối u ở tất cả các nhóm dùng liều. Không quan sát được dấu hiệu về sự giảm trọng lượng cơ thể do việc điều trị bằng kháng thể.

Tóm lại, việc điều trị dự phòng bằng H1H19303P làm giảm đáng kể sự phát triển của khối u theo cách phụ thuộc liều, cải thiện sự thanh thải khối u và cải thiện tỷ lệ sống so với việc điều trị bằng đối chứng isotyp.

Đánh giá nồng độ kháng thể trong huyết thanh và MAHA bằng thử nghiệm ELISA

Các mẫu huyết thanh được lấy vào các ngày 6, 13 và 20 được phân tích về nồng độ H1H19303P và đối chứng isotyp, cũng như phân tích về chuẩn độ MAHA bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA. Nồng độ kháng thể H1H19303P và đối chứng isotyp hIgG1 trong huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa đặc hiệu với sự phát hiện IgG của người (Fig.7). Các chuẩn độ IgG của chuột đặc hiệu với kháng thể H1H19303P hoặc kháng thể đối chứng IgG1 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA kiểu kẹp giữa đặc hiệu với sự phát hiện mỗi kháng thể (Fig.8).

Vào ngày 6, phát hiện được kháng thể H1H19303P và đối chứng isotyp trong huyết thanh với tất cả các liều được thử nghiệm, với việc quan sát được nồng độ trong huyết thanh trung bình bằng $39,8 \pm 24$, $33,5 \pm 8,9$, và $10,4 \pm 2,9$ đối với liều dùng của H1H19303P lần lượt là 10, 5, và 2 mg/kg, (Bảng 11).

Bảng 11: Nồng độ trong huyết thanh của H1H19303P và đối chứng isotyp

Liều dùng	Kháng thể được sử dụng	Nồng độ trong huyết thanh trung bình ($\mu\text{g/ml}$) ^a		
		Ngày 6	Ngày 13	Ngày 20
10 mg/kg	H1H19303P	$39,8 \pm 24$	$12,0 \pm 13$	$0,21 \pm 0,254$
	Đối chứng isotyp	$130 \pm 10,4$	$255 \pm 43,4$	$279 \pm 64,4$
5 mg/kg	H1H19303P	$33,5 \pm 8,9$	NT	$\leq \text{LLOQ}$
2 mg/kg	H1H19303P	$10,4 \pm 2,9$	NT	$\leq \text{LLOQ}$

^aSố liệu được thể hiện là nồng độ trong huyết thanh trung bình với độ lệch chuẩn.

NT (Not tested): Không được thử nghiệm; LLOQ (lower limit of quantification): Giới hạn định lượng dưới

Bảng 12: Chuẩn độ trung bình của kháng thể kháng H1H19303P của chuột và kháng thể đối chứng kháng isotyp

Liều dùng	Kháng thể được sử dụng	Chuẩn độ trung bình ^a		
		Ngày 6	Ngày 13	Ngày 20
10 mg/kg	H1H19303P	$\leq \text{LOD}$	39831 ± 24087	711076 ± 352075
	Đối chứng hIgG1	$\leq \text{LOD}$	$\leq \text{LOD}$	564 ± 658
5 mg/kg	H1H19303P	$\leq \text{LOD}$	NT	779150 ± 514583
2 mg/kg	H1H19303P	$\leq \text{LOD}$	NT	878074 ± 409564

^aSố liệu được thể hiện là chuẩn độ trung bình có độ lệch chuẩn.

NT: không được thử nghiệm; LOD (Limit of detection): Giới hạn phát hiện

Sau ngày 6, quan sát được sự giảm nồng độ trong huyết thanh của H1H19303P đối với tất cả nhóm dùng liều vào ngày 20, mặc dù sử dụng thêm kháng thể vào các ngày 6, 9, 13, và 16 (Bảng 11). Quan sát được sự thanh thải kháng thể nhanh chóng so với đối chứng isotyp ở các nhóm dùng liều 10mg/kg. Sự giảm nồng độ trong huyết thanh của H1H19303P có thể góp phần vào sự phát triển MAHA (Fig.8, Bảng 12). Quan sát được chuẩn độ MAHA ở tất cả các thời điểm được xác định sau ngày 6 đối với tất cả các liều của H1H19303P. Tuy nhiên, chuẩn độ MAHA đối với đối chứng isotyp là ở giới hạn phát hiện tại tất cả các thời điểm được kiểm tra.

Kết luận

Việc sử dụng H1H19303P qua đường trong màng bụng với liều 10 mg/kg, 5 mg/kg hoặc 2 mg/kg dẫn đến làm giảm sự phát triển của khối u, cải thiện sự thanh thải khối u, và cải thiện sự sống so với việc sử dụng đối chứng hIgG1 ở chuột nhập gen *CTLA-4^{hum/hum}* được cấy các tế bào khối u MC38.Ova. Nồng độ trong huyết thanh của H1H19303P giảm đi theo thời gian, tương ứng với sự phát triển của MAHA kháng H1H19303P ở các thời điểm sau ngày 6.

Ví dụ 8: Hiệu quả của việc điều trị kết hợp bằng kháng thể kháng CTLA-4 của chuột và kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) ở chuột nhập gen *PD-I^{hum/hum}* mang khối u MC38.Ova

Ví dụ này mô tả hiệu quả kháng u của kháng thể kháng CTLA-4 kết hợp với kháng thể kháng PD-1 ở chuột được làm cho giống với của người về gen PD-1. Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng trong nghiên cứu này là REGN2810 (còn được gọi là cemiplimab), và đã được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 9.987.500 dưới dạng H4H7798N. Chuột nhập gen *PD-I^{hum/hum}* đã được mô tả trong Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US2015/0203579.

Chuột nhập gen *PD-I^{hum/hum}* được cấy các tế bào MC38.Ova qua đường dưới da (5×10^5 tế bào/con). Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm điều trị khi kích thước khối u trung bình đạt 100 mm^3 (ngày 0 của đợt điều trị). Chuột được cho sử dụng kháng thể đối chứng isotyp, kháng thể kháng CTLA-4-mIgG2a của chuột (dòng vô tính 9D9), kháng thể kháng PD-1 của người (REGN2810) với liều 10 mg/kg hoặc hỗn

hợp của kháng thể kháng CTLA-4 của chuột và kháng thể kháng PD-1 của người (10 mg/kg + 10 mg/kg) qua đường IP vào các ngày 0, 3, 7, 10 và 14. Thể tích khối u và chuột không có khối u được theo dõi cho đến 22 ngày. Thể tích khối u được theo dõi bằng các phép đo bằng thước cặp hai lần/tuần trong 22 ngày. Liệu pháp đơn bằng các kháng thể kháng CTLA-4 hoặc kháng thể kháng PD-1 có tác dụng ức chế sự phát triển của khối u một phần được thử nghiệm với liều 10 mg/kg so với việc điều trị bằng đối chứng isotyp (Fig.9). Thể tích khối u riêng rẽ vào ngày 10 sau khi bắt đầu điều trị (Fig.10) được sử dụng để phân tích thống kê, do đây là thời điểm cuối cùng trong nghiên cứu khi mà tất cả các con chuột ở tất cả các nhóm đều còn sống. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phương pháp phân tích ANOVA một chiều với kiểm định hậu kiểm nhiều so sánh của Dunnett (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Việc kết hợp điều trị bằng kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng PD-1 tạo ra sự ức chế mức độ phát triển của khối u hữu hiệu hơn so với liệu pháp đơn bằng kháng thể với khối u nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê vào ngày 10 ở nhóm được điều trị kết hợp so với nhóm được điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 (**** $p < 0,0001$, Fig.10). Một trong số tám con chuột ở nhóm điều trị bằng kháng thể kháng CTLA-4 và 2 trong số 8 con chuột ở nhóm được điều trị kết hợp trở nên không có khối u vào ngày 22. Việc điều trị bằng cách kết hợp kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng PD-1 cũng tạo ra sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ sống của chuột so với nhóm đối chứng (kiểm định Mantel-Cox, **** $p < 0,0001$, Fig.11). Không quan sát được dấu hiệu về sự giảm trọng lượng cơ thể do việc điều trị bằng kháng thể.

Tóm lại, việc điều trị bằng cách kết hợp kháng thể kháng mCTLA-4 và kháng thể kháng PD-1 (REGN2810) dẫn đến làm giảm sự phát triển của khối u và cải thiện tỷ lệ sống so với liệu pháp đơn bằng một trong hai kháng thể.

Ví dụ 9: Hiệu quả kháng u của việc điều trị bằng REGN4659 trong mô hình khối u MC38.Ova được tạo ra ở chuột CTLA-4^{hum/hum}

Thiết kế thử nghiệm

Sáu mươi con chuột CTLA-4^{hum/hum} được cấy 5×10^5 tế bào MC38.Ova qua đường dưới da vào sườn vào ngày 0. Vào ngày 10, ba mươi con chuột có thể tích khối u trung bình bằng 100 mm^3 được chọn và chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm điều trị

(N=10 con/nhóm). Vào các ngày 10, 13 và 17, chuột được cho sử dụng các kháng thể với liều như sau: nhóm 1, Ab đối chứng isotyp hIgG1 (REGN1932) với liều 25 mg/kg; nhóm 2, Ab kháng hCTLA-4 (REGN4659; H1H19303P) với liều 25 mg/kg; nhóm 3, Ab kháng hCTLA-4 (REGN4659; H1H19303P) với liều 10 mg/kg.

Tất cả các kháng thể được sử dụng bằng cách tiêm qua đường IP. Thể tích khối u được theo dõi bằng các phép đo bằng thước cặp trong suốt thời gian thử nghiệm (27 ngày).

Kết quả

Việc điều trị bằng REGN4659 cho khối u MC38.Ova làm ức chế một phần sự phát triển của khối u (Fig.12).

Liệu pháp đơn REGN4659 tạo ra hiệu quả tương tự ở cả hai liều, 10 mg/kg và 25 mg/kg, trong việc làm giảm sự phát triển của khối u (Fig.13).

Phép phân tích phương sai một chiều (ANOVA) với kiểm định hậu kiểm nhiều so sánh của Tukey cho thấy sự khác biệt đáng kể về thể tích khối u trung bình giữa mỗi nhóm sử dụng liệu pháp đơn REGN4659 và nhóm đối chứng sử dụng isotyp hIgG1 ($p < 0,05$) vào ngày 21, ngày cuối cùng khi tất cả các con chuột trong tất cả các nhóm được điều trị đều còn sống (Fig.13).

Ví dụ 10: Phân tích tế bào T trong khối u và tế bào T ngoại biên sau khi điều trị bằng REGN4659 đối với khối u MC38.Ova dưới da được tạo ra ở chuột CTLA-4^{hum/hum}

Thiết kế thử nghiệm

Bốn mươi con chuột CTLA-4^{hum/hum} được cấy 5×10^5 tế bào MC38.Ova qua đường dưới da vào sườn vào ngày 0. Vào ngày 10, hai mươi con chuột có thể tích khối u trung bình 100 mm^3 được chọn và chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm điều trị (N=10 con/nhóm). Vào các ngày 10 và 13, chuột được cho sử dụng các kháng thể với liều như sau: nhóm 1, Ab đối chứng isotyp hIgG1 (REGN1932) với liều 25 mg/kg; nhóm 2, Ab kháng hCTLA-4 (REGN4659; H1H19303P) với liều 25 mg/kg. Tất cả các kháng thể được sử dụng bằng cách tiêm qua đường IP. Thể tích khối u được theo dõi bằng các phép đo bằng thước cặp. Vào ngày 17, khi các khối u đạt $355 \pm 35 \text{ mm}^3$ (giá trị trung bình $\pm$ SEM) ở nhóm sử dụng hIgG1 và $180 \pm 43 \text{ mm}^3$ (giá trị trung bình

+/- SEM) ở nhóm được điều trị bằng REGN4659, tất cả các con chuột bị giết. Các khối u và lách được thu hoạch để phân tích tế bào lymphô bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Các hỗn dịch đơn bào của khối u và lách được tạo ra. Các tế bào được xử lý bằng 24G.2 (Bioxcell), để phong bế sự gắn kết của Fc với FcγRIIb và FcγRIII, và sau đó được nhuộm màu để đánh giá khả năng sống bằng dung dịch thuốc nhuộm tế bào đã chết có thể cố định LIVE/DEAD™ (Invitrogen) và sau đó nhuộm bằng hỗn hợp của các kháng thể kháng CD45 (dòng vô tính 30-F11; Biolegend), C90.2 (dòng vô tính 30-H12; Biolegend), CD8 (dòng vô tính 53-6.7; Biolegend), CD4 (GK1.5; Biolegend), CD11b (dòng vô tính M1/70; Biolegend) và CTLA-4 của người (dòng vô tính BNI3, BD). Để nhuộm trong tế bào, các mẫu được cố định, được làm tăng tính thấm, và nhuộm bằng các kháng thể với FoxP3 (dòng vô tính FJK-16s, Invitrogen) và CTLA-4 của người. Sau đó, các mẫu được phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy FACS Canto (BD).

Kết quả

Tiểu quần thể tế bào T được phân tích trong các khối u và lách của chuột mang khối u MC38.Ova vào ngày 17 sau khi cấy và điều trị bằng kháng thể REGN4659. Việc đánh giá quần thể tế bào Teff và Treg ở vị trí khối u và trong vùng ngoại vi của lách cho thấy rằng REGN4659, có isotyp hIgG1 (SEQ ID NO: 509 là trình tự axit amin chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của H1H19303P, còn được gọi là REGN4659), làm trung gian cho sự giảm số lượng Treg ở vị trí khối u chỉ sau hai lần sử dụng kháng thể điều trị ở chuột CTLA-4^{hum/hum} mang khối u MC38.Ova (Bảng 12). Quan sát được sự mở rộng của các tế bào hiệu ứng CD4⁺ và tế bào CD8⁺ ở vị trí khối u trong khi việc điều trị bằng REGN4659 làm mở rộng tế bào Treg ở lách. Các số liệu này cho thấy rằng REGN4659 kích thích hoạt tính kháng u trong mô hình khối u MC38.Ova ở chuột CTLA-4^{hum/hum} bằng cách làm giảm chọn lọc số lượng tế bào Treg trong khối u cùng với sự hoạt hóa các tế bào T hiệu ứng trong khối u. Kết quả khác biệt của REGN4659 đối với số lượng Treg trong khối u so với các tế bào Treg ở lách hoặc tế bào T hiệu ứng có thể góp phần vào sự khác biệt về mức độ biểu hiện của CTLA-4. Để trả lời câu hỏi này, mức độ biểu hiện của CTLA-4 (trên bề mặt và trong tế bào) đối với các tế bào T được xác định bằng thiết bị FACS từ nhóm được điều trị bằng kháng thể đối chứng hIgG1. Mức độ biểu hiện của tổng lượng CTLA-4 trên Treg trong khối

u cao hơn khoảng 3 lần so với mức độ biểu hiện trên các tế bào hiệu ứng $CD8^+$ và $CD4^+$ trong khối u và cao hơn khoảng 8 lần so với mức độ biểu hiện trên Treg từ lách (Fig.14). Sự khác biệt về mức độ biểu hiện này có thể giải thích sự mất chọn lọc của số lượng Treg ở khối u theo cơ chế phụ thuộc FcγR, do ái lực gắn kết cao của các kháng thể có vùng ổn định IgG1 của người với các thụ thể Fcγ của chuột.

Bảng 13: Sự phong bế CTLA-4 bằng REGN4659 làm mở rộng các tế bào hiệu ứng $CD4^+$ và các tế bào $CD8^+$ trong khối u, nhưng làm giảm số lượng tế bào Treg.

	Khối u		
	Tế bào hiệu ứng $CD4^+$ (**)	Treg $CD4^+$ (**)	$CD8^+$ (**)
hIgG1	$2,12 \pm 0,72$	$56,82 \pm 5,14$	$6,12 \pm 0,64$
REGN4659	$5,83 \pm 0,87$	$35,38 \pm 3,08$	$11,83 \pm 1,49$
	Lách		
	Tế bào hiệu ứng $CD4^+$ (***)	Treg $CD4^+$ (**)	$CD8^+$
hIgG1	$10,11 \pm 1,33$	$30,6 \pm 1,60$	$8,73 \pm 0,74$
REGN4659	$14,67 \pm 0,78$	$40,4 \pm 0,93$	$6,99 \pm 0,52$

Bảng 13 cho thấy tỷ lệ % tế bào $CD45^+$ là $CD4^+FoxP3^-$ (tế bào hiệu ứng $CD4^+$), tỷ lệ % tế bào $CD45^+$ là $CD8^+$ và tỷ lệ % tế bào $CD4^+$ là $FoxP3^+$ (Treg $CD4^+$). Phân tích kiểm định t-test không ghép đôi cho thấy sự khác biệt đáng kể về tế bào hiệu ứng $CD4^+$, tế bào $CD8^+$, tế bào Treg $CD4^+$ trong các khối u và về tế bào hiệu ứng $CD4^+$ và tế bào Treg $CD4^+$ ở lách giữa nhóm sử dụng REGN4659 và nhóm được điều trị bằng đối chứng isotyp (**p<0,005, *** p<0,001).

Ví dụ 11: Sự thay đổi về chức năng của tế bào T và sự hoạt hóa miễn dịch toàn thân ở lách của chuột mang khối u được điều trị bằng REGN4659

Thiết kế thử nghiệm

Hai mươi con chuột CTLA-4^{hum/hum} được cấy dưới da bằng 5×10^5 tế bào MC38.Ova vào sườn vào ngày 0 và được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm điều trị (N=9 con/nhóm). Vào các ngày 3, 7, 11, 14 và 17, chuột được cho sử dụng Ab đối chứng isotyp hIgG1 (REGN1932) với liều 10 mg/kg hoặc Ab kháng hCTLA-4 (REGN4659;

H1H19303P) với liều 10 mg/kg. Tất cả các kháng thể được sử dụng bằng cách tiêm qua đường IP. Thể tích khối u được theo dõi bằng các phép đo bằng thước cặp. Chuột bị giết bắt đầu từ ngày 24 (khi khối u phát triển quá lớn) đến ngày 37 (kết thúc thử nghiệm). Ở nhóm sử dụng REGN4659, 8 trong số 9 con chuột trở nên không có khối u, trong khi ở nhóm đối chứng, không có con chuột nào không có khối u vào ngày 24. Mức độ biểu hiện của các gen chuột (được chuẩn hóa với mức độ biểu hiện ARN xyclophilin B của chuột) được xác định bằng phản ứng PCR trong thời gian thực Taqman. Kiểm định t-test không ghép đôi cho thấy sự gia tăng có ý nghĩa thống kê về nồng độ tương đối của FoxP3, CD3e, Perforin, IFN γ , TNF α , PD-L1, PD-L2 ở nhóm sử dụng REGN4659 so với nhóm đối chứng isotyp.

Kết quả

Phân tích Taqman đối với lách của chuột được điều trị bằng REGN4659 cho thấy nồng độ sản phẩm phiên mã tăng lên đối với FoxP3, CD3e, Perforin, IFN γ , TNF α , PD-L1, PD-L2, điều này gợi ý sự gia tăng chức năng hiệu ứng của tế bào T và chức năng tăng cường miễn dịch toàn phần của REGN4659. Mức độ biểu hiện của các gen chuột (được chuẩn hóa với mức độ biểu hiện ARN xyclophilin B của chuột) được thể hiện trong Bảng 14. Kiểm định t-test không ghép đôi cho thấy sự gia tăng có ý nghĩa thống kê về nồng độ tương đối của FoxP3, CD3e, Perforin, IFN γ , TNF α , PD-L1 và PD-L2 ở nhóm sử dụng REGN4659 so với nhóm sử dụng đối chứng isotyp.

Bảng 14: Liệu pháp REGN4659 làm tăng cường đáp ứng miễn dịch thích ứng *in vivo*.

	FOXP3 (***)	CD3 ϵ (***)	Perforin (***)	IFN γ (***)	TNF α (***)	PD-L1 (*)	PD-L2 (***)
hIgG1	3,12 $\pm$ 0,54	2,72 $\pm$ 0,39	2,46 $\pm$ 0,35	0,962 $\pm$ 0,16	1,98 $\pm$ 0,34	2,81 $\pm$ 0,59	1,98 $\pm$ 0,30
REGN 4659	9,15 $\pm$ 1,28	11,48 $\pm$ 1,57	10,65 $\pm$ 1,45	4,33 $\pm$ 0,61	6,42 $\pm$ 0,88	5,33 $\pm$ 0,61	7,46 $\pm$ 1,02

Giá trị trung bình được thông báo $\pm$ SEM; kiểm định t-test không ghép đôi, hai đầu;

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Ví dụ 12: Thử nghiệm lâm sàng ở người về kháng thể kháng CTLA-4 (REGN4659) kết hợp với Cemiplimab (kháng thể kháng PD-1) trong việc điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ tiến triển hoặc di căn

Nghiên cứu này là nghiên cứu nhãn mở, pha I, lần đầu tiên ở người (first-in-human: FIH) để đánh giá REGN4659 (nghĩa là H1H19303P của các ví dụ từ 1 đến 7 và từ 9 đến 11), sử dụng cemiplimab liều cao một mình (nhóm C), và kết hợp REGN4659 với cemiplimab trong việc điều trị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) di căn hoặc tiến triển. Nghiên cứu này bao gồm cả pha tăng liều và pha mở rộng liều.

Cemiplimab (REGN2810; Ví dụ 8) là kháng thể IgG4P được làm ổn định ở vùng rìa, có ái lực cao, có chiều dài đầy đủ của người được định hướng với thụ thể PD-1 để có khả năng phong bế sự tương tác của PD-1 với các phối tử của nó là PD-L1 và PD-L2.

Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chính của pha tăng liều là để đánh giá độ an toàn, khả năng dung nạp, và đặc tính dược động học (pharmacokinetics: PK) của REGN4659 một mình, cemiplimab liều cao một mình, và kết hợp REGN4659 với cemiplimab ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) đã được điều trị. Mục tiêu chính của pha mở rộng liều là để đánh giá hoạt tính kháng u sơ bộ của việc kết hợp REGN4659 với cemiplimab khi được xác định bằng tỷ lệ đáp ứng khách quan (objective response rate: ORR) ở các bệnh nhân NSCLC đã được điều trị bằng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-L1, và để đánh giá độ an toàn, khả năng dung nạp, và PK của REGN4659 và cemiplimab ở các bệnh nhân NSCLC đã được điều trị bằng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-L1.

Mục tiêu phụ của nghiên cứu này là (i) để đánh giá hoạt tính kháng u sơ bộ của liệu pháp đơn cemiplimab liều cao và kết hợp REGN4659 với cemiplimab khi được xác định bằng tỷ lệ ORR ở các bệnh nhân NSCLC đã được điều trị trong pha tăng liều, (ii) để đánh giá hoạt tính kháng u của REGN4659 với cemiplimab bằng nhiều tiêu chí trong khi tăng liều và mở rộng liều, và (iii) để đánh giá hiệu quả dược lý toàn thân của REGN4659 và cemiplimab, được xác định theo sự thay đổi về dấu ấn sinh

học trong máu ngoại vi của sự hoạt hóa tế bào T, bao gồm cả các tế bào T CD4 ICOS+.

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu này là nghiên cứu nhãn mở, pha I, lần đầu tiên ở người (FIH) để đánh giá việc sử dụng REGN4659 một mình, cemiplimab liều cao một mình (nhóm C), và sử dụng kết hợp REGN4659 với cemiplimab trong việc điều trị NSCLC tiến triển hoặc di căn. Có 2 pha của nghiên cứu này: pha tăng liều ở các bệnh nhân mắc bệnh NSCLC đã được điều trị (liệu pháp hóa trị và/hoặc liệu pháp kháng PD-1/PD-L1 trước đó), và pha mở rộng liều ở các bệnh nhân mắc bệnh NSCLC đã điều trị bằng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-L1.

Nghiên cứu này bao gồm pha sàng lọc tối đa là 28 ngày (từ ngày -28 đến ngày -1), sau đó là tối đa mười bảy liệu trình điều trị 42 ngày (trong tối đa là 102 tuần điều trị), và khoảng thời gian theo dõi 24 tuần. Bệnh nhân sẽ được điều trị cho đến khi khoảng thời gian điều trị 102 tuần kết thúc, hoặc cho đến khi sự tiến triển của bệnh không rõ ràng, có độc tính không chấp nhận được, rút lại sự đồng ý hoặc cho đến khi đáp ứng tiêu chí rút lui tham gia nghiên cứu khác. Sau tối thiểu 24 tuần điều trị, bệnh nhân có tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn (complete response: CR) được xác nhận có thể lựa chọn ngừng điều trị và tiếp tục tất cả các đánh giá nghiên cứu có liên quan. Trong pha tăng liều, việc sinh thiết khối u được dự kiến là sẽ được thực hiện, trừ khi có chống chỉ định về mặt y tế. Việc sinh thiết khối u là bắt buộc làm một phần của nhóm có pha mở rộng liều. Đối với các bệnh nhân có sự đáp ứng và sau đó là sự tiến triển bệnh, việc sinh thiết khối u ở thời điểm tiến triển bệnh sẽ được yêu cầu nhưng không bắt buộc.

Các bệnh nhân có sự tiến triển trong vòng 6 tháng sau khi kết thúc khoảng thời gian điều trị đối với CR, đáp ứng một phần (partial response: PR), hoặc bệnh ổn định (stable disease: SD) sau khi đáp ứng các tiêu chí xác định của nghiên cứu và tiếp tục với các lần thăm khám xác định được phép tiếp tục điều trị nghiên cứu sau khi xác nhận lại các tiêu chí đủ điều kiện nghiên cứu có liên quan. Các bệnh nhân có thể được điều trị tối đa 102 tuần bằng liệu pháp bổ sung. Liều và (các) dược chất được sử dụng tiếp tục thường cần phải giống như khi bệnh nhân sử dụng ban đầu hoặc mức liều dùng được chọn cho (các) nhóm mở rộng liều sau khi bàn luận giữa nhà tài trợ và nhà

ngiên cứu.

Các bệnh nhân ở nhóm C dung nạp 2 liều cemiplimab (1050mg Q3W), nhưng sau đó có PD, sẽ có lựa chọn là bổ sung thêm liều kết hợp cao nhất của cemiplimab và REGN4659 được sử dụng an toàn cho đến thời điểm nỗ lực tìm kiếm đáp ứng bằng cách sử dụng sự phong bế CTLA-4 và PD-1 kết hợp.

Tăng liều: Tám nhóm sử dụng tăng liều được chuẩn bị. Ba mức liều của REGN4659 (liều cố định qua đường trong tĩnh mạch [IV] 25, 75, và 250 mg) sẽ được nghiên cứu với các liệu trình khác nhau, mỗi liệu trình dài 3, 6, và 12 tuần (Q3W, Q6W, Q12W) kết hợp với cemiplimab với 2 mức liều (liều cố định qua đường IV là 350 và 1050 mg) được sử dụng 3 tuần một lần (Q3W). Trước khi bắt đầu nhóm điều trị kết hợp với 1050mg cemiplimab, nhóm sử dụng liệu pháp đơn 1050mg cemiplimab Q3W sẽ được đánh giá (nhóm C). Đối với các nhóm sử dụng tăng liều được ký hiệu bằng dấu hoa thị (các nhóm 1*, 2*, và 4*), một liều ban đầu của liệu pháp đơn REGN4659 sẽ được sử dụng trước khi sử dụng liệu pháp kết hợp 3 tuần để đánh giá độ an toàn của REGN4649 trước khi kết hợp với cemiplimab. Sáu trong số 8 nhóm (1*, C, 2*, 2, 3, và 4*) sẽ được sử dụng để đánh giá độc tính giới hạn liều dùng (dose-limiting toxicity: DLT). Ngoài các nhóm có thể đánh giá DLT, 2 nhóm dùng liều bổ sung (5 và 6) mỗi nhóm sẽ có 6 bệnh nhân tham gia để đánh giá độ an toàn và PK/đặc tính dược lực học. Các nhóm 5 và 6 sẽ được tham gia sau khi khả năng dung nạp của các nhóm 2 và 3 được thiết lập tương ứng. Sự kết hợp liều dùng ở nhóm 5 và 6 có thể được quan tâm ngay cả khi cường độ liều dùng cao hơn của REGN4659 (nhóm 2 và 3) có thể dung nạp. Tuy nhiên, các nhóm này sẽ không cần đánh giá DLT nếu các nhóm 2 và 3 có thể dung nạp do sự tiếp xúc ở mức thấp hơn với REGN4659 ở các nhóm 5 và 6. Ngoại trừ nhóm C trong đó 6 bệnh nhân sẽ tham gia, tối thiểu 3 bệnh nhân trong mỗi nhóm dùng liều sẽ được yêu cầu đánh giá về DLT. Để làm tăng tối đa hiệu quả tăng liều dùng của pha 1 trong khi duy trì độ an toàn của bệnh nhân, 4 bệnh nhân sẽ tham gia vào mỗi nhóm dùng liều (ngoại trừ nhóm C), trong trường hợp bệnh nhân ngừng sử dụng trước khi được đánh giá về DLT. Các nhóm 3 và 6 (các nhóm sử dụng kết hợp với cemiplimab liều cao) sẽ không được bắt đầu điều trị cho đến khi cả 6 bệnh nhân ở nhóm C đã hoàn thành giai đoạn DLT. Sự tăng liều sẽ tiếp tục thông qua các nhóm dùng liều cho đến khi liều được dung nạp tối đa (maximum tolerated dose: MTD) của

việc sử dụng kết hợp đạt được hoặc tất cả các nhóm dùng liều đã được thử nghiệm. Tuy nhiên, ngay cả trước khi kết thúc sự tăng liều, (các) nhóm dùng liều có thể được chọn để mở rộng liều khi khả năng dung nạp và hoạt tính dược lực học được đánh giá đối với nhóm bất kỳ.

Độc tính giới hạn liều dùng: Ngoài việc không có khả năng sử dụng (do độc tính của dược chất nghiên cứu) liều dùng #2 trong giai đoạn cửa sổ, DLT sẽ được xem xét khi xuất hiện các độc tính khi nghiên cứu sau đây, ngoại trừ các sự kiện được cho là liên quan rõ ràng đến sự tiến triển của bệnh hoặc bệnh gian phát:

Độc tính không phải huyết học:

- (i) Viêm màng mạch nho mức độ ≥ 2 (được cho là biến cố bất lợi liên quan đến miễn dịch (irAE) tiềm tàng);
- (ii) Nồng độ aspartat aminotransferaza (aspartate aminotransferase: AST) hoặc alanin aminotransferaza (alanine aminotransferase: ALT) >5 lần giới hạn trên của mức bình thường (upper limit of normal: ULN) và/hoặc nồng độ bilirubin toàn phần >3 lần mức ULN. Đối với các bệnh nhân có sự di căn gan, nồng độ AST, ALT và/hoặc bilirubin >2 lần giá trị ban đầu nếu giai đoạn ban đầu ở mức độ 2; và
- (iii) Độc tính không phải huyết học ở mức độ bất kỳ ≥ 3 , bao gồm cả biến cố irAE (như được xác định theo kinh nghiệm với các dược chất điều biến miễn dịch khác, ngoại trừ các dấu hiệu sau đây:
 - (a) Buồn nôn, nôn hoặc tiêu chảy mức độ 3 trừ khi ở mức dai dẳng (khoảng thời gian >72 giờ) mặc dù có các biện pháp chăm sóc hỗ trợ tối đa, theo chỉ định của bác sĩ điều trị; và
 - (b) Các bất thường trong phòng thí nghiệm ở mức độ ≥ 3 được cho là không đáng kể về mặt lâm sàng và không đáp ứng các tiêu chí cho về biến cố bất lợi (adverse event: AE).

Độc tính huyết học:

- (i) Sự giảm bạch cầu trung tính mức độ 4 kéo dài hơn 7 ngày;
- (ii) Sự giảm lượng tiểu cầu mức độ 4;

- (iii) Sự giảm lượng tiểu cầu mức độ 3 kèm theo chảy máu;
- (iv) Sự giảm bạch cầu trung tính do sốt mức độ ≥ 3 (sốt $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ có số lượng bạch cầu trung tính tuyệt đối $< 1,0 \times 10^9/\text{L}$) hoặc sự giảm bạch cầu trung tính mức độ ≥ 3 có bằng chứng về sự nhiễm khuẩn;
- (v) Thiếu máu mức độ 4; và
- (vi) Thiếu máu mức độ 3 kéo dài hơn 7 ngày hoặc cần truyền máu.

Nếu vấn đề về độ an toàn xuất hiện ở nhóm riêng biệt sau khi đánh giá DLT, sự tham gia có thể được ngừng lại sau khi diễn ra bàn luận giữa các nhà nghiên cứu và nhà đầu tư. Các vấn đề về độ an toàn gây ra sự dừng thu nhận có thể bao gồm các sự kiện về độ an toàn sớm hoặc muộn.

Mở rộng liều: (các) nhóm dùng liều có thể được chọn để mở rộng liều khi khả năng dung nạp và hoạt tính được động học (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự gia tăng số lượng tế bào T ICOS+ ngoại vi) được đánh giá đối với nhóm bất kỳ, ngoại trừ nhóm C, sẽ không được mở rộng liều. (Các) nhóm mở rộng liều sẽ thu nhận các bệnh nhân mắc bệnh NSCLC đã được điều trị bằng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-L1 có sự tiến triển trong khi sử dụng liệu pháp kháng PD-1/PD-L1 để xác định khả năng dung nạp và hoạt tính của liệu pháp kết hợp ở quần thể này. Có tối đa 3 chế độ dùng liều riêng biệt sẽ được chọn để mở rộng liều để xác định chế độ kết hợp tối ưu ở các bệnh nhân mắc bệnh NSCLC. (Các) nhóm mở rộng liều này sẽ thu nhận tối đa 27 bệnh nhân, mỗi nhóm dựa trên phương pháp thiết kế 2 giai đoạn của Simon. Nếu có các vấn đề về độ an toàn xuất hiện ở nhóm mở rộng riêng biệt, việc thu nhận có thể bị tạm dừng sau khi diễn ra sự thảo luận giữa các nhà nghiên cứu và nhà tài trợ. Các vấn đề về độ an toàn gây ra sự dừng thu nhận có thể bao gồm các sự kiện về độ an toàn sớm hoặc muộn.

Thời gian nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu là khoảng 102 tuần, không bao gồm thời gian sàng lọc hoặc theo dõi.

Quần thể

Kích thước mẫu: tối đa khoảng 53 bệnh nhân là người trưởng thành được kỳ vọng là sẽ tham gia trong khi tăng liều và tối đa là 3 nhóm mở rộng liều với tối đa là

27 bệnh nhân trong mỗi nhóm được kỳ vọng là sẽ tham gia trong khi mở rộng liều với tối đa khoảng 15 địa điểm ở Mỹ. Tổng số bệnh nhân tham gia sẽ phụ thuộc vào kết quả DLT quan sát được trong khi tăng liều, phân tích PK/độc lực học, số lượng nhóm mở rộng liều được mở rộng, và hiệu quả trong giai đoạn 1 của các nhóm mở rộng liều 2 giai đoạn của Simon.

Quần thể đích: Quần thể đích của nghiên cứu này là nam giới và phụ nữ ≥ 18 tuổi được chẩn đoán là mắc bệnh NSCLC có vảy hoặc không có vảy giai đoạn IIIB hoặc IV không thể cắt bỏ.

Tiêu chí lựa chọn: Bệnh nhân phải đáp ứng các tiêu chí sau để đủ điều kiện để đưa vào nghiên cứu:

1. Nam giới và phụ nữ ≥ 18 tuổi;
2. Các bệnh nhân mắc NSCLC có vảy hoặc không có vảy có dấu hiệu về mặt mô học hoặc tế bào học là bệnh ở giai đoạn IIIB hoặc IV không thể phẫu thuật;
3. Tăng liều (ngoại trừ nhóm C): Các bệnh nhân đã được điều trị được cho sử dụng không quá 3 dòng liệu pháp toàn thân bao gồm không quá 2 dòng hóa trị liệu gây độc tế bào, và các bệnh nhân mà không có liệu pháp nào có thể mang lại lợi ích lâm sàng. Các bệnh nhân đã được điều trị bằng liệu pháp miễn dịch PD-1/PD-L1 trước đó không được ngừng điều trị vĩnh viễn do các biến cố AE liên quan đến việc điều trị. Các bệnh nhân được chấp nhận có sự đột biến có thể hướng đích (bao gồm thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì [(epidermal growth factor receptor: EGFR)], ALK, và ROS1) trong khi tăng liều nhưng phải được cho sử dụng bổ sung ít nhất 1 dòng liệu pháp hướng đích.
 - a. Lưu ý: 1) Liệu pháp hóa trị hoặc liệu pháp miễn dịch hỗ trợ hoặc tiền hỗ trợ (sau khi phẫu thuật và/hoặc sử dụng liệu pháp xạ trị) hoặc 2) liệu pháp hóa trị-xạ trị cuối cùng có hoặc không có liệu pháp miễn dịch sau đó đối với bệnh giai đoạn III được chấp nhận và không được đưa vào thử nghiệm khi đánh giá dòng liệu pháp ở các bệnh nhân có bệnh tái phát hoặc di căn trong thời gian hơn 6 tháng sau khi hoàn thành liệu pháp;
4. Nhóm C có sự tăng liều: các bệnh nhân trước đây chưa từng sử dụng kháng thể kháng PD-1/PD-L1 được cho sử dụng từ 1 đến 2 dòng liệu pháp hóa trị gây độc tế bào trước đó bao gồm cả chế độ chứa platin đỉnh đôi. Các bệnh nhân được chấp nhận

có sự đột biến có thể hướng đích (bao gồm EGFR, ALK, và ROS1) trong khi tăng liều nhưng phải được cho sử dụng bổ sung ít nhất 1 dòng liệu pháp hướng đích.

a. Lưu ý : 1) Liệu pháp hóa trị bổ trợ hoặc tiền bổ trợ hoặc 2) liệu pháp hóa trị-xạ trị cuối cùng đối với bệnh giai đoạn III có thể được chấp nhận và không được đưa vào thử nghiệm khi đánh giá dòng liệu pháp ở các bệnh nhân có bệnh tái phát hoặc di căn trong thời gian hơn 6 tháng sau khi hoàn thành liệu pháp;

5. (Các) nhóm mở rộng liều: Các bệnh nhân đã sử dụng kháng thể kháng PD-1/PD-L1 có tiến triển trong khi sử dụng liệu pháp hoặc trong vòng 6 tháng ngừng sử dụng liệu pháp đối với bệnh giai đoạn III hoặc IV. Các bệnh nhân không được ngừng sử dụng liệu pháp kháng PD-1/PD-L1 vĩnh viễn do biến cố AE liên quan đến việc điều trị. Các bệnh nhân phải được cho sử dụng một dòng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-L1. Các bệnh nhân cũng có thể được cho sử dụng một dòng liệu pháp hóa trị. Có thể sử dụng liệu pháp hóa trị và liệu pháp miễn dịch kết hợp trước đó miễn là không sử dụng (các) dòng bổ sung của một trong hai liệu pháp này, ngoại trừ liệu pháp như được mô tả trong phần lưu ý dưới đây.

a. Lưu ý: 1) Liệu pháp hóa trị hoặc liệu pháp miễn dịch bổ trợ hoặc tiền bổ trợ (sau khi phẫu thuật và/hoặc sử dụng liệu pháp xạ trị) hoặc 2) liệu pháp hóa trị-xạ trị cuối cùng có hoặc không có liệu pháp miễn dịch sau đó đối với bệnh giai đoạn III được chấp nhận và không được đưa vào thử nghiệm khi đánh giá dòng liệu pháp ở các bệnh nhân có bệnh tái phát hoặc di căn trong thời gian hơn 6 tháng sau khi hoàn thành liệu pháp;

6. Mô khối u được cố định bằng formalin lưu trữ hoặc mới thu được mà không được chiếu xạ trước đó;

7. (Các) nhóm mở rộng liều: Ít nhất 1 tổn thương có thể xác định bằng phương pháp chụp X quang bằng cách chụp cắt lớp vi tính (computed tomography: CT) hoặc chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging: MRI) theo tiêu chí RECIST 1.1. Các tổn thương đích có thể nằm ở vùng đã chiếu xạ trước đó nếu có sự tiến triển của bệnh được chứng minh (chụp X quang) ở vị trí đó;

8. Chỉ số thể trạng theo tiêu chí của Nhóm hợp tác về ung thư miền Đông (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ≤ 1 ;

9. Thời gian sống thêm theo dự kiến ít nhất 3 tháng;

10. Chức năng cơ quan và tủy xương thích hợp như được xác định dưới đây:

- Hemoglobin $\geq 9,0$ g/dl (Lưu ý: các bệnh nhân được truyền máu do hemoglobin $< 9,0$ g/dl trong vòng 14 ngày trước khi sàng lọc để đánh giá trong phòng thí nghiệm không đủ điều kiện)
- Số lượng bạch cầu trung tính tuyệt đối $\geq 1,5 \times 10^9/l$
- Số lượng tiểu cầu $\geq 75.000/mm^3$
- Tốc độ lọc cầu thận (glomerular filtration rate: GFR) > 30 ml/phút/1,73m²
- Bilirubin toàn phần $\leq 1,5 \times \text{ULN}$ (nếu có di căn gan $\leq 3 \times \text{ULN}$), ngoại trừ các bệnh nhân được chẩn đoán mắc hội chứng Gilbert đã được xác nhận lâm sàng.
- AST) và ALT $\leq 3 \times \text{ULN}$ hoặc $\leq 5 \times \text{ULN}$, nếu có di căn gan
- Phosphatase kiềm $\leq 2,5 \times \text{ULN}$ (hoặc $\leq 5,0 \times \text{ULN}$, nếu có di căn gan hoặc xương)
- Không đáp ứng tiêu chí theo luật Hy (ALT và/hoặc AST $> 3 \times \text{ULN}$ và bilirubin $> 2 \times \text{ULN}$);

11. Sẵn sàng và có thể tuân thủ các lần khám lâm sàng và thủ tục liên quan đến việc nghiên cứu; và

12. Cung cấp văn bản đồng ý tham gia nghiên cứu có chữ ký của bệnh nhân hoặc người đại diện hợp lệ theo pháp luật.

Tiêu chí loại trừ: Bệnh nhân đáp ứng tiêu chí bất kỳ trong số các tiêu chí sau sẽ bị loại ra khỏi nghiên cứu:

1. Chỉ (các) nhóm mở rộng liều: Các bệnh nhân chưa từng hút thuốc, được xác định là hút ≤ 100 điếu trong cuộc đời;
2. Bị di căn não hoạt động hoặc không được điều trị hoặc sự chèn ép tủy sống. Các bệnh nhân đủ điều kiện nếu sự di căn hệ thần kinh trung ương (central nervous system: CNS) được điều trị thích hợp và bệnh nhân đã hồi phục về thần kinh đến mức ban đầu (ngoại trừ các dấu hiệu hoặc triệu chứng còn lại liên quan đến việc điều trị CNS) trong ít nhất 2 tuần trước khi tham gia. Các bệnh nhân phải ngừng sử dụng liệu pháp corticosteroid (các liều ức chế miễn dịch);
3. Chỉ (các) nhóm mở rộng liều: Các bệnh nhân có khối u được xét nghiệm dương tính với sự đột biến gen EGFR và ALK hoặc sự dung hợp ROS1. Tất cả các bệnh

nhân cần phải được đánh giá khối u về sự đột biến EGFR, sự sắp xếp lại ALK, và sự dung hợp ROS1;

4. Liệu pháp xạ trị trong vòng 2 tuần trước khi tham gia và không khôi phục được về mức ban đầu từ biến cố AE do sự chiếu xạ;
5. Các bệnh nhân đã được điều trị trước đó bằng kháng thể kháng CTLA-4;
6. Mắc bệnh viêm não, viêm màng não, hoặc cơn động kinh không kiểm soát trong năm trước khi đồng ý tham gia;
7. Có tiền sử bệnh phổi mô kẽ (ví dụ, bệnh xơ hóa phổi vô căn, bệnh viêm phổi tổ chức hóa) hoặc bệnh viêm phổi khu trú hoạt động, không lây nhiễm cần liệu glucocorticoid ức chế miễn dịch để hỗ trợ kiểm soát. Có tiền sử viêm phổi do chiếu xạ trong vùng chiếu xạ vẫn được chấp nhận miễn là bệnh viêm phổi đã bình phục trong thời gian ≥ 6 tháng trước khi tham gia;
8. Có bằng chứng đang mắc hoặc gần đây mắc bệnh tự miễn đáng kể cần điều trị bằng phương pháp điều trị ức chế miễn dịch toàn thân, điều này có thể có nguy cơ về các biến cố bất lợi xuất hiện khi điều trị liên quan đến sự miễn dịch (immune-related treatment-emergent adverse event: irTEAE). Các dấu hiệu sau đây không là dấu hiệu loại trừ: bệnh bạch biến, bệnh hen ở trẻ em đã bình phục, bệnh đái tháo đường typ I, chứng suy giảm chức năng tuyến giáp tồn dư chỉ cần thay thế hormon hoặc bệnh vẩy nến không cần điều trị toàn thân;
9. Các bệnh nhân có tình trạng bệnh cần liệu pháp corticosteroid ($>10\text{mg}$ prednison/ngày hoặc tương đương) trong vòng 14 ngày chọn ngẫu nhiên. Các liệu thay thế về mặt sinh lý có thể sử dụng ngay cả khi chúng $>10\text{mg}$ prednison/ngày hoặc tương đương, miễn là chúng không được sử dụng cho mục đích ức chế miễn dịch. Có thể sử dụng steroid dạng hít hoặc khu trú, với điều kiện là chúng không phải dùng để điều trị rối loạn tự miễn;
10. Chỉ (các) nhóm mở rộng liệu: Bệnh ác tính khác đang tiến triển hoặc cần điều trị, ngoại trừ bệnh ung thư da không phải u melanin có thể được điều trị chữa khỏi, hoặc bệnh caxinom cổ tử cung tại chỗ hoặc khối u khác bất kỳ đã được điều trị, và bệnh nhân được cho là thuyên giảm hoàn toàn trong ít nhất 2 năm trước khi tham gia nghiên cứu, và không cần trị liệu bổ sung trong suốt thời gian nghiên cứu;
11. Bệnh nhiễm khuẩn không kiểm soát với virus gây suy giảm miễn dịch ở người,

bệnh nhiễm virus viêm gan B hoặc viêm gan C; hoặc được chẩn đoán là suy giảm miễn dịch;

Lưu ý:

- Các bệnh nhân sẽ được xét nghiệm virus viêm gan C (HCV) và virus viêm gan B (HBV) khi sàng lọc;
- Các bệnh nhân bị nhiễm virus HIV đã biết là bệnh nhiễm khuẩn có kiểm soát (tải lượng virus không phát hiện được (PCR ARN của virus HIV) và số lượng CD4 cao hơn 350 một cách tự nhiên hoặc đối với chế độ kháng virus ổn định) được chấp nhận. Đối với các bệnh nhân nhiễm virus HIV có kiểm soát, việc theo dõi sẽ được thực hiện theo tiêu chuẩn địa phương;
- Các bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B (HepBsAg+) là nhiễm khuẩn có kiểm soát (PCR ADN của virus viêm gan B trong huyết thanh thấp hơn giới hạn phát hiện và được cho sử dụng liệu pháp kháng virus đối với bệnh viêm gan B) được chấp nhận. Các bệnh nhân mắc bệnh nhiễm khuẩn có kiểm soát phải được theo dõi định kỳ về ADN của virus HBV. Các bệnh nhân phải duy trì liệu pháp kháng virus trong ít nhất 6 tháng ngoài liều cuối cùng của được chất nghiên cứu đánh giá;
- Các bệnh nhân dương tính với kháng thể virus viêm gan C (HCV Ab+) là bệnh nhiễm virus có kiểm soát (ARN của HCV không phát hiện được bằng PCR một cách tự nhiên hoặc đáp ứng với quá trình tiến hành liệu pháp kháng virus HCV trước đó thành công) được chấp nhận.

12. Bệnh nhiễm khuẩn hoạt động cần phải sử dụng liệu pháp toàn thân trong vòng 14 ngày trước khi bắt đầu sử dụng được chất nghiên cứu;

13. Các biến cố AE qua trung gian miễn dịch liên quan đến việc điều trị từ chất điều biến miễn dịch (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, liệu pháp kháng PD1/PD-L1, các liệu pháp chất ức chế kiểm soát khác, và chất ức chế PI 3K-δ) không được khôi phục đến mức ban đầu trong ít nhất 3 tháng trước khi bắt đầu điều trị bằng liệu pháp nghiên cứu. Các bệnh nhân bị loại khỏi việc điều trị bằng cemiplimab nếu họ gặp phải các biến cố AE qua trung gian miễn dịch liên quan đến việc điều trị trước đó bằng chất phong bế con đường PD-1/PD-L1 cần phải ngừng sử dụng vĩnh viễn chất điều trị, bất kể thời gian xảy ra. Lưu ý: các bệnh nhân bị suy giảm chức năng tủy giáp hoặc bệnh

đái tháo đường typ I ở giai đoạn bất kỳ được kiểm soát bằng liệu pháp thay thế hormon được chấp nhận;

14. Được điều trị trước đó bằng idelalisib (ZYDELIG®) ở thời điểm bất kỳ;

15. Hiện đang được điều trị theo nghiên cứu khác, hoặc đã tham gia vào nghiên cứu về chất nghiên cứu và được cho sử dụng điều trị, hoặc đã sử dụng thiết bị nghiên cứu trong vòng 4 tuần của liều đầu tiên của liệu pháp nghiên cứu, hoặc được cho sử dụng điều trị bằng liệu pháp toàn thân đã được phê chuẩn trong vòng 3 tuần của liều dùng đầu tiên của liệu pháp nghiên cứu, hoặc đã được cho sử dụng liệu pháp toàn thân trước đó bất kỳ trong vòng 5 lần bán hủy của liều dùng đầu tiên của liệu pháp nghiên cứu, tùy theo thời gian nào dài hơn (ngoại trừ liệu pháp kháng PD-1/PD-L1). Các bệnh nhân đã được điều trị trước đó bằng bevacizumab, cetuximab, rituximab hoặc các kháng thể không điều biến miễn dịch khác có thời gian bán hủy dài hơn 7 ngày được chấp nhận sau khi bàn luận với nhà tài trợ nếu đã qua ít nhất 28 ngày kể từ lần điều trị cuối cùng. Đối với các bệnh nhân đã được sử dụng liệu pháp kháng PD-1/PD-L1, không thể sử dụng liệu pháp kháng PD-1/PD-L1 trước đó trong vòng 3 tuần của liều dùng đầu tiên của liệu pháp nghiên cứu, bất kể thời gian bán hủy hoặc tình trạng được phê chuẩn của dược chất;

16. Đơn thuốc của vacxin sống trong vòng 30 ngày kể từ ngày bắt đầu sử dụng thuốc nghiên cứu theo dự kiến;

17. Phẫu thuật lớn hoặc tổn thương do chấn thương đáng kể trong vòng 4 tuần trước khi sử dụng liều đầu tiên;

18. Tính miễn cảm đã biết với doxyxycyclin hoặc các hợp chất tương tự (nghĩa là tetraxycyclin);

19. Đáp ứng dị ứng hoặc tăng miễn cảm có bằng chứng với chất điều trị protein bất kỳ (ví dụ, các protein tái tổ hợp, vacxin, các globulin miễn dịch qua đường trong tĩnh mạch, các kháng thể đơn dòng, bất thụ thể);

20. Rối loạn lạm dụng chất hoặc rối loạn tâm thần đã biết là sẽ cản trở sự tham gia với các yêu cầu của nghiên cứu, bao gồm cả việc sử dụng các dược chất bị cấm hiện nay;

21. Cấy ghép tế bào gốc khác alen cùng loài trước đó;

22. Tình trạng bệnh bất kỳ mà theo ý kiến của nhà nghiên cứu sẽ làm cho sự tham

gia nghiên cứu không là lợi ích tốt nhất của bệnh nhân;

23. Phụ nữ có thai hoặc cho con bú;

24. Xét nghiệm mang thai có hCG trong huyết thanh dương tính khi thăm khám lần đầu (chu kỳ 1 ngày 1, trước khi dùng liều);

25. Nam giới và phụ nữ có hoạt động tình dục có khả năng sinh con* không sẵn sàng thực hiện biện pháp tránh thai có hiệu quả cao trước khi dùng liều ban đầu/bắt đầu lần điều trị đầu tiên trong khi nghiên cứu, và trong ít nhất 6 tháng sau khi dùng liều cuối cùng. Các biện pháp tránh thai có hiệu quả cao bao gồm:

- sử dụng ổn định biện pháp tránh thai nội tiết kết hợp (chứa estrogen và progestogen) (qua đường miệng, trong âm đạo, qua chân bì) hoặc biện pháp tránh thai nội tiết chỉ chứa progestogen (qua đường miệng, tiêm, cấy) có liên quan đến việc ức chế sự rụng trứng bắt đầu từ 2 hoặc nhiều chu kỳ kinh nguyệt trước khi sàng lọc;
- dụng cụ đặt trong tử cung (intrauterine device: IUD); hệ giải phóng hormon trong tử cung (intrauterine hormone-releasing system: IUS);
- thắt ống dẫn trứng hai bên;
- đối tác thắt ống dẫn tinh;
- và hoặc kiêng quan hệ tình dục†, ‡.

*Phụ nữ sau kỳ mãn kinh phải vô kinh trong ít nhất 12 tháng để không bị cho là có khả năng sinh con. Không cần xét nghiệm mang thai và sử dụng biện pháp tránh thai đối với phụ nữ đã cắt bỏ tử cung hoặc thắt ống dẫn trứng.

†Kiêng quan hệ tình dục được cho là phương pháp có hiệu quả cao chỉ khi được xác định là kiềm chế quan hệ tình dục khác giới trong toàn bộ thời gian có nguy cơ liên quan đến các phương pháp điều trị nghiên cứu. ‡Kiêng quan hệ theo chu kỳ (phương pháp theo dõi lịch, phương pháp nhiệt-chứng, phương pháp sau khi rụng trứng), xuất tinh ngoài (giao hợp xuất tinh ra ngoài), chỉ sử dụng chất diệt tinh trùng, và phương pháp vô kinh thời kỳ cho con bú (lactational amenorrhoea method: LAM) là các phương pháp tránh thai không chấp nhận được. Bao cao su dùng cho nữ và bao cao su dùng cho nam không được sử dụng cùng nhau;

26. Thành viên của nhóm nghiên cứu ở vị trí lâm sàng và/hoặc vợ/chồng của thành viên đó.

Điều trị

REGN4659: 3 mức liều dùng (liều cố định, qua đường IV, 25, 75, và 250mg) sẽ được đánh giá với các liệu trình khác nhau (Q3W, Q6W, Q12W).

Cemiplimab: 2 mức liều dùng (liều cố định, qua đường IV, 350 và 1050mg) được sử dụng Q3W.

Tiêu chí đánh giá chính

Trong pha tăng liều: tỷ lệ DLT, các biến cố xuất hiện trong khi điều trị (treatment emergent adverse event: TEAE), irAE, các biến cố nghiêm trọng (serious adverse event: SAE), tử vong, các bất thường trong phòng thí nghiệm (mức độ 3 hoặc cao hơn theo Tiêu chuẩn thuật ngữ chung cho các biến cố (Common Terminology Criteria for Adverse Event: [CTCAE])).

Trong pha mở rộng liều dùng: Tỷ lệ đáp ứng khách quan (Objective response rate: ORR) dựa trên Tiêu chuẩn đánh giá sự đáp ứng đối với khối u dạng rắn (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor: RECIST) 1.1, và tỷ lệ TEAE, irAE, SAE, tử vong, các bất thường trong phòng thí nghiệm (mức độ 3 hoặc cao hơn theo tiêu chuẩn CTCAE).

Tiêu chí đánh giá phụ

Các phép đo khối u dựa trên nhiều tiêu chuẩn đáp ứng bao gồm: (i) ORR dựa trên tiêu chuẩn RECIST 1.1 (tăng liều), (ii) ORR dựa trên Tiêu chuẩn đánh giá sự đáp ứng với liệu pháp trên cơ sở miễn dịch (immune-based therapy Response Evaluation Criteria: iRECIST), (iii) mức độ đáp ứng chung tốt nhất (best overall response: BOR), khoảng thời gian đáp ứng (duration of response: DOR), tỷ lệ kiểm soát bệnh, và thời gian sống không có sự tiến triển của bệnh (progression-free survival: PFS) dựa trên tiêu chuẩn RECIST 1.1, iRECIST, và (iv) tổng thời gian sống (overall survival: OS).

Định lượng tỷ lệ % thay đổi về số lượng tế bào T CD4 ICOS+ tuyệt đối và các dấu hiệu khác của sự hoạt hóa bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng trong mỗi nhóm dùng liều.

Quy trình và đánh giá

Độ an toàn và khả năng dung nạp của REGN4659 và cemiplimab sẽ được theo dõi bằng các đánh giá trong lâm sàng về AE và bằng các phép đo lặp lại của sự đánh giá lâm sàng bao gồm các dấu hiệu của sự sống (nhiệt độ, huyết áp, mạch, và sự hô hấp), khám thể chất (toàn bộ và giới hạn), điện tâm đồ (electrocardiogram: ECG) 12 đạo trình, và các đánh giá trong phòng thí nghiệm bao gồm huyết học tiêu chuẩn, hóa học và xét nghiệm nước tiểu.

Hoạt tính kháng u sẽ được đánh giá bằng phương pháp CT/MRI.

Lấy các mẫu máu để xác định nồng độ REGN4659 chức năng và cemiplimab chức năng trong huyết thanh và các kháng thể kháng dược chất (kháng REGN4659 hoặc kháng cemiplimab).

Lấy mẫu huyết thanh, huyết tương, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell: PBMC), và mẫu sinh thiết khối u để phân tích các dấu ấn sinh học. Lấy mẫu ADN hệ gen. Các dấu ấn sinh học về dược động học, dự đoán và chẩn đoán để nghiên cứu liên quan đến REGN4659 và sự tiếp xúc khi điều trị với cemiplimab, hoạt động lâm sàng, hoặc bệnh sẵn từ trước sẽ được đánh giá trong huyết thanh, huyết tương, PBMC, và mô khối u.

Kế hoạch thống kê

Pha tăng liều: Không có giả thuyết thống kê chính thức đối với pha tăng liều của nghiên cứu; các phân tích của pha này sẽ được mô tả và khám phá tự nhiên. Khoảng 35 bệnh nhân có thể đánh giá DLT được dự kiến dựa trên mô hình 3+3 được cải biến (“4+3”) đối với mỗi nhóm tăng liều dừng (nhóm 1*, 2*, 2, 3 và 4*). Mười hai bệnh nhân được dự kiến cho nhóm 5 và 6 (6 bệnh nhân/nhóm). Kích thước mẫu thực tế của các nhóm tăng liều này sẽ phụ thuộc vào DLT có bằng chứng, kích thước nhóm tạo thành, và số lượng mức liều được thực hiện.

Pha mở rộng liều: Đối với mỗi nhóm mở rộng liều ở các bệnh nhân mắc bệnh NSCLC đã được cho sử dụng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-L1 và có bệnh tiến triển trong khi sử dụng liệu pháp kháng PD-1/PD-L1, do có ít số liệu hữu hiệu có thể sử dụng ở các bệnh nhân này, nhà tài trợ tin rằng ORR có thể xác định bất kỳ tốt hơn 5% là hiệu quả điều trị có ý nghĩa lâm sàng. Kích thước mẫu của 27 bệnh nhân đối với mỗi nhóm mở rộng được xác định bằng cách sử dụng mô hình Minimax 2 giai đoạn

của Simon với mức độ có ý nghĩa ở một phía là 5% và hiệu quả 80%.

Phân tích hiệu quả chính: Mức độ đáp ứng chung tốt nhất được xác định theo tiêu chuẩn RECIST 1.1 đối với nhóm mở rộng liều sẽ được tóm tắt bằng cách sử dụng phương pháp thống kê mô tả, cùng với khoảng tin cậy 95% ở hai phía.

Giá trị ORR sẽ được tóm tắt bằng phương pháp thống kê mô tả, cùng với khoảng tin cậy 95%. Các bệnh nhân không đánh giá được về BOR sẽ được cho là người không đáp ứng.

Đối với nhóm mở rộng liều, nếu số lượng người đáp ứng lớn hơn hoặc bằng số lượng người đáp ứng tối thiểu được xác định trong mô hình 2 giai đoạn của Simon, việc điều trị được cho là có hiệu quả và xứng đáng để nghiên cứu thêm.

Phân tích hiệu quả phụ bao gồm ORR khi được xác định theo tiêu chuẩn iRECIST, DOR, tỷ lệ phòng trừ bệnh và PFS. Các mục tiêu hiệu quả phụ sẽ được tóm tắt bằng phương pháp mô tả theo nhóm tăng liều và nhóm mở rộng liều.

Quan sát về độ an toàn và các phép đo bao gồm sự tiếp xúc với dược chất, AE, số liệu trong phòng thí nghiệm, và các dấu hiệu về sự sống sẽ được tóm tắt và thể hiện trong các bảng và danh sách.

Đối với pha tăng liều: quan sát được DLT trong khoảng thời gian đánh giá DLT sẽ được tóm tắt theo nhóm dùng liều.

Kết quả

Trong pha tăng liều, REGN4659 và cemiplimab sẽ được dung nạp tốt khi sử dụng một mình và khi kết hợp ở các bệnh nhân mắc NSCLC đã được điều trị. Trong pha mở rộng liều, REGN4659 sẽ được dung nạp tốt khi kết hợp với cemiplimab và sẽ có sự đáp ứng kháng u có thể xác định ở các bệnh nhân mắc bệnh NSCLC đã được cho sử dụng liệu pháp miễn dịch kháng PD-1/PD-1.

Các phương án làm ví dụ

Sáng chế còn đề cập đến các mục sau đây:

Mục 1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein liên quan đến tế bào lympho T gây độc tế bào 4 (CTLA-4) của người và phong bế sự tương tác giữa hCTLA-4 và phối tử B7-1 và/hoặc phối tử B7-2.

Mục 2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục 1 gây ra sự hoạt

hóa tế bào T.

Mục 3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục 2, trong đó tế bào T là tế bào T gây độc tế bào.

Mục 4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục 2 hoặc 3, trong đó tế bào T là tế bào lymphô thâm nhiễm khối u.

Mục 5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này gắn kết với CTLA-4 của khi.

Mục 6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này gắn kết với các tế bào biểu hiện CTLA-4 với nồng độ EC50 nhỏ hơn 5nM.

Mục 7. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này gắn kết với các tế bào biểu hiện CTLA-4 với nồng độ EC50 nhỏ hơn 1nM.

Mục 8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 7, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này gắn kết với các tế bào biểu hiện CTLA-4 của người với nồng độ EC50 nhỏ hơn 0,5nM.

Mục 9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 8 gắn kết với các tế bào biểu hiện CTLA-4 của khi với nồng độ EC50 nhỏ hơn 0,5nM.

Mục 10. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 9 là kháng thể của người có chiều dài đầy đủ.

Mục 11. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 10, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cạnh tranh gắn kết với CTLA-4 của người với kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 2 và 10, (b) SEQ ID NO: 18 và 26, (c) SEQ ID NO: 34 và 42, (d) SEQ ID NO: 50 và 58, (e) SEQ ID NO: 66 và 74, (f) SEQ ID NO: 82 và 90, (g) SEQ ID NO: 98 và 106, (h) SEQ ID NO: 114 và 122, (i) SEQ ID NO: 130 và 138, (j) SEQ ID NO: 146 và 154, (k) SEQ ID NO: 162 và 170, (l) SEQ ID NO: 178 và 186, (m) SEQ ID NO: 194 và 202, (n) SEQ ID NO: 210 và 218, (o) SEQ ID NO: 226 và 234, (p) SEQ ID NO: 242 và

250, (q) SEQ ID NO: 258 và 266, (r) SEQ ID NO: 274 và 282, (s) SEQ ID NO: 290 và 298, (t) SEQ ID NO: 306 và 298, (u) SEQ ID NO: 314 và 322, (v) SEQ ID NO: 330 và 338, (w) SEQ ID NO: 346 và 354, (x) SEQ ID NO: 362 và 370, (y) SEQ ID NO: 378 và 386, (z) SEQ ID NO: 394 và 402, (a') SEQ ID NO: 410 và 418, (b') SEQ ID NO: 426 và 434, (c') SEQ ID NO: 442 và 450, (d') SEQ ID NO: 458 và 466, (e') SEQ ID NO: 474 và 482, và (f') SEQ ID NO: 490 và 498.

Mục 12. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với cùng epitop trên CTLA-4 của người dưới dạng kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 2 và 10, (b) SEQ ID NO: 18 và 26, (c) SEQ ID NO: 34 và 42, (d) SEQ ID NO: 50 và 58, (e) SEQ ID NO: 66 và 74, (f) SEQ ID NO: 82 và 90, (g) SEQ ID NO: 98 và 106, (h) SEQ ID NO: 114 và 122, (i) SEQ ID NO: 130 và 138, (j) SEQ ID NO: 146 và 154, (k) SEQ ID NO: 162 và 170, (l) SEQ ID NO: 178 và 186, (m) SEQ ID NO: 194 và 202, (n) SEQ ID NO: 210 và 218, (o) SEQ ID NO: 226 và 234, (p) SEQ ID NO: 242 và 250, (q) SEQ ID NO: 258 và 266, (r) SEQ ID NO: 274 và 282, (s) SEQ ID NO: 290 và 298, (t) SEQ ID NO: 306 và 298, (u) SEQ ID NO: 314 và 322, (v) SEQ ID NO: 330 và 338, (w) SEQ ID NO: 346 và 354, (x) SEQ ID NO: 362 và 370, (y) SEQ ID NO: 378 và 386, (z) SEQ ID NO: 394 và 402, (a') SEQ ID NO: 410 và 418, (b') SEQ ID NO: 426 và 434, (c') SEQ ID NO: 442 và 450, (d') SEQ ID NO: 458 và 466, (e') SEQ ID NO: 474 và 482, và (f') SEQ ID NO: 490 và 498.

Mục 13. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 12, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa: (a) các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474, và 490; và (b) vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482, và 498.

Mục 14. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số

các mục từ 1 đến 13, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa các vùng CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 2 và 10, (b) SEQ ID NO: 18 và 26, (c) SEQ ID NO: 34 và 42, (d) SEQ ID NO: 50 và 58, (e) SEQ ID NO: 66 và 74, (f) SEQ ID NO: 82 và 90, (g) SEQ ID NO: 98 và 106, (h) SEQ ID NO: 114 và 122, (i) SEQ ID NO: 130 và 138, (j) SEQ ID NO: 146 và 154, (k) SEQ ID NO: 162 và 170, (l) SEQ ID NO: 178 và 186, (m) SEQ ID NO: 194 và 202, (n) SEQ ID NO: 210 và 218, (o) SEQ ID NO: 226 và 234, (p) SEQ ID NO: 242 và 250, (q) SEQ ID NO: 258 và 266, (r) SEQ ID NO: 274 và 282, (s) SEQ ID NO: 290 và 298, (t) SEQ ID NO: 306 và 298, (u) SEQ ID NO: 314 và 322, (v) SEQ ID NO: 330 và 338, (w) SEQ ID NO: 346 và 354, (x) SEQ ID NO: 362 và 370, (y) SEQ ID NO: 378 và 386, (z) SEQ ID NO: 394 và 402, (a') SEQ ID NO: 410 và 418, (b') SEQ ID NO: 426 và 434, (c') SEQ ID NO: 442 và 450, (d') SEQ ID NO: 458 và 466, (e') SEQ ID NO: 474 và 482, và (f') SEQ ID NO: 490 và 498.

Mục 15. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa các miền HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 và 16 tương ứng; (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30 và 32 tương ứng; (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 và 48 tương ứng; (d) SEQ ID NO: 52, 54, 56, 60, 62 và 64 tương ứng; (e) SEQ ID NO: 68, 70, 72, 76, 78 và 80 tương ứng; (f) SEQ ID NO: 84, 86, 88, 92, 94 và 96 tương ứng; (g) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110 và 112 tương ứng; (h) SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126 và 128 tương ứng; (i) SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142 và 144 tương ứng; (j) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 156, 158 và 160 tương ứng; (k) SEQ ID NO: 164, 166, 168, 172, 174 và 176 tương ứng; (l) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190 và 192 tương ứng; (m) SEQ ID NO: 196, 198, 200, 204, 206 và 208 tương ứng; (n) SEQ ID NO: 212, 214, 216, 220, 222 và 224 tương ứng; (o) SEQ ID NO: 228, 230, 232, 236, 238 và 240 tương ứng; (p) SEQ ID NO: 244, 246, 248, 252, 254 và 256 tương ứng; (q) SEQ ID NO: 260, 262, 264, 268, 270 và 272 tương ứng; (r) SEQ ID NO: 276, 278, 280, 284, 286 và 288 tương ứng; (s) SEQ ID NO: 292, 294, 296, 300, 302 và 304 tương ứng; (t) SEQ ID NO: 308, 310, 312, 300, 302 và 304 tương ứng; (u) SEQ ID NO: 316, 318,

320, 324, 326 và 328 tương ứng; (v) SEQ ID NO: 332, 334, 336, 340, 342 và 344 tương ứng; (w) SEQ ID NO: 348, 350, 352, 356, 358 và 360 tương ứng; (x) SEQ ID NO: 364, 366, 368, 372, 374 và 376 tương ứng; (y) SEQ ID NO: 380, 382, 384, 388, 390 và 392 tương ứng; (z) SEQ ID NO: 396, 398, 400, 404, 406 và 408 tương ứng; (a') SEQ ID NO: 412, 414, 416, 420, 422 và 424 tương ứng; (b') SEQ ID NO: 428, 430, 432, 436, 438 và 440 tương ứng; (c') SEQ ID NO: 444, 446, 448, 452, 454 và 456 tương ứng; (d') SEQ ID NO: 460, 462, 464, 468, 470 và 472 tương ứng; (e') SEQ ID NO: 476, 478, 480, 484, 486 và 488 tương ứng; và (f') SEQ ID NO: 492, 494, 496, 500, 502 và 504 tương ứng.

Mục 16. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 15, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 2 và 10, (b) SEQ ID NO: 18 và 26, (c) SEQ ID NO: 34 và 42, (d) SEQ ID NO: 50 và 58, (e) SEQ ID NO: 66 và 74, (f) SEQ ID NO: 82 và 90, (g) SEQ ID NO: 98 và 106, (h) SEQ ID NO: 114 và 122, (i) SEQ ID NO: 130 và 138, (j) SEQ ID NO: 146 và 154, (k) SEQ ID NO: 162 và 170, (l) SEQ ID NO: 178 và 186, (m) SEQ ID NO: 194 và 202, (n) SEQ ID NO: 210 và 218, (o) SEQ ID NO: 226 và 234, (p) SEQ ID NO: 242 và 250, (q) SEQ ID NO: 258 và 266, (r) SEQ ID NO: 274 và 282, (s) SEQ ID NO: 290 và 298, (t) SEQ ID NO: 306 và 298, (u) SEQ ID NO: 314 và 322, (v) SEQ ID NO: 330 và 338, (w) SEQ ID NO: 346 và 354, (x) SEQ ID NO: 362 và 370, (y) SEQ ID NO: 378 và 386, (z) SEQ ID NO: 394 và 402, (a') SEQ ID NO: 410 và 418, (b') SEQ ID NO: 426 và 434, (c') SEQ ID NO: 442 và 450, (d') SEQ ID NO: 458 và 466, (e') SEQ ID NO: 474 và 482, và (f') SEQ ID NO: 490 và 498.

Mục 17. Kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa: (a) các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 314, 330, 346, 362, 378, 394, 410, 426, 442, 458, 474, và 490; và (b) các vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 322, 338, 354, 370, 386, 402, 418, 434, 450, 466, 482,

và 498.

Mục 18. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục 17, trong đó kháng thể này chứa các vùng CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 2 và 10, (b) SEQ ID NO: 18 và 26, (c) SEQ ID NO: 34 và 42, (d) SEQ ID NO: 50 và 58, (e) SEQ ID NO: 66 và 74, (f) SEQ ID NO: 82 và 90, (g) SEQ ID NO: 98 và 106, (h) SEQ ID NO: 114 và 122, (i) SEQ ID NO: 130 và 138, (j) SEQ ID NO: 146 và 154, (k) SEQ ID NO: 162 và 170, (l) SEQ ID NO: 178 và 186, (m) SEQ ID NO: 194 và 202, (n) SEQ ID NO: 210 và 218, (o) SEQ ID NO: 226 và 234, (p) SEQ ID NO: 242 và 250, (q) SEQ ID NO: 258 và 266, (r) SEQ ID NO: 274 và 282, (s) SEQ ID NO: 290 và 298, (t) SEQ ID NO: 306 và 298, (u) SEQ ID NO: 314 và 322, (v) SEQ ID NO: 330 và 338, (w) SEQ ID NO: 346 và 354, (x) SEQ ID NO: 362 và 370, (y) SEQ ID NO: 378 và 386, (z) SEQ ID NO: 394 và 402, (a') SEQ ID NO: 410 và 418, (b') SEQ ID NO: 426 và 434, (c') SEQ ID NO: 442 và 450, (d') SEQ ID NO: 458 và 466, (e') SEQ ID NO: 474 và 482, và (f') SEQ ID NO: 490 và 498.

Mục 19. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục 17 hoặc 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa các miền HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 và 16 tương ứng; (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30 và 32 tương ứng; (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46 và 48 tương ứng; (d) SEQ ID NO: 52, 54, 56, 60, 62 và 64 tương ứng; (e) SEQ ID NO: 68, 70, 72, 76, 78 và 80 tương ứng; (f) SEQ ID NO: 84, 86, 88, 92, 94 và 96 tương ứng; (g) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110 và 112 tương ứng; (h) SEQ ID NO: 116, 118, 120, 124, 126 và 128 tương ứng; (i) SEQ ID NO: 132, 134, 136, 140, 142 và 144 tương ứng; (j) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 156, 158 và 160 tương ứng; (k) SEQ ID NO: 164, 166, 168, 172, 174 và 176 tương ứng; (l) SEQ ID NO: 180, 182, 184, 188, 190 và 192 tương ứng; (m) SEQ ID NO: 196, 198, 200, 204, 206 và 208 tương ứng; (n) SEQ ID NO: 212, 214, 216, 220, 222 và 224 tương ứng; (o) SEQ ID NO: 228, 230, 232, 236, 238 và 240 tương ứng; (p) SEQ ID NO: 244, 246, 248, 252, 254 và 256 tương ứng; (q) SEQ ID NO: 260, 262, 264, 268, 270 và 272 tương ứng; (r) SEQ ID NO: 276, 278, 280, 284, 286 và 288 tương ứng; (s) SEQ ID NO: 292, 294, 296, 300, 302 và 304 tương ứng; (t) SEQ ID

NO: 308, 310, 312, 300, 302 và 304 tương ứng; (u) SEQ ID NO: 316, 318, 320, 324, 326 và 328 tương ứng; (v) SEQ ID NO: 332, 334, 336, 340, 342 và 344 tương ứng; (w) SEQ ID NO: 348, 350, 352, 356, 358 và 360 tương ứng; (x) SEQ ID NO: 364, 366, 368, 372, 374 và 376 tương ứng; (y) SEQ ID NO: 380, 382, 384, 388, 390 và 392 tương ứng; (z) SEQ ID NO: 396, 398, 400, 404, 406 và 408 tương ứng; (a') SEQ ID NO: 412, 414, 416, 420, 422 và 424 tương ứng; (b') SEQ ID NO: 428, 430, 432, 436, 438 và 440 tương ứng; (c') SEQ ID NO: 444, 446, 448, 452, 454 và 456 tương ứng; (d') SEQ ID NO: 460, 462, 464, 468, 470 và 472 tương ứng; (e') SEQ ID NO: 476, 478, 480, 484, 486 và 488 tương ứng; và (f') SEQ ID NO: 492, 494, 496, 500, 502 và 504 tương ứng.

Mục 20. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 17 đến 19, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa cặp trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: (a) SEQ ID NO: 2 và 10, (b) SEQ ID NO: 18 và 26, (c) SEQ ID NO: 34 và 42, (d) SEQ ID NO: 50 và 58, (e) SEQ ID NO: 66 và 74, (f) SEQ ID NO: 82 và 90, (g) SEQ ID NO: 98 và 106, (h) SEQ ID NO: 114 và 122, (i) SEQ ID NO: 130 và 138, (j) SEQ ID NO: 146 và 154, (k) SEQ ID NO: 162 và 170, (l) SEQ ID NO: 178 và 186, (m) SEQ ID NO: 194 và 202, (n) SEQ ID NO: 210 và 218, (o) SEQ ID NO: 226 và 234, (p) SEQ ID NO: 242 và 250, (q) SEQ ID NO: 258 và 266, (r) SEQ ID NO: 274 và 282, (s) SEQ ID NO: 290 và 298, (t) SEQ ID NO: 306 và 298, (u) SEQ ID NO: 314 và 322, (v) SEQ ID NO: 330 và 338, (w) SEQ ID NO: 346 và 354, (x) SEQ ID NO: 362 và 370, (y) SEQ ID NO: 378 và 386, (z) SEQ ID NO: 394 và 402, (a') SEQ ID NO: 410 và 418, (b') SEQ ID NO: 426 và 434, (c') SEQ ID NO: 442 và 450, (d') SEQ ID NO: 458 và 466, (e') SEQ ID NO: 474 và 482, và (f') SEQ ID NO: 490 và 498.

Mục 21. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ 17 đến 20, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 509 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 510.

Mục 22. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21 và chất mang hoặc chất pha loãng được dùng.

Mục 23. Phân tử polynucleotit được phân lập chứa trình tự polynucleotit mã hóa vùng HCVR của kháng thể như được nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21.

Mục 24. Phân tử polynucleotit được phân lập chứa trình tự polynucleotit mã hóa vùng LCVR của kháng thể như được nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21.

Mục 25. Vector chứa polynucleotit theo mục 23 và/hoặc polynucleotit theo mục 24.

Mục 26. Tế bào chủ biểu hiện vector theo mục 25.

Mục 27. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21, hoặc được phẩm theo mục 22, dùng để ức chế sự phát triển của khối u hoặc tế bào khối u ở đối tượng cần điều trị.

Mục 28. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, để sử dụng theo mục 27, trong đó khối u là khối u nguyên phát hoặc tái phát.

Mục 29. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, để sử dụng theo mục 27, trong đó khối u là khối u đã tạo thành.

Mục 30. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 27 đến 29, trong đó khối u xuất hiện ở đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư da, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, u lymphô tế bào B, u tủy, và u melanin.

Mục 31. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 27 đến 30, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm được sử dụng cho đối tượng dưới dạng liều ban đầu, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai, trong đó mỗi liều thứ hai được sử dụng sau liều ngay trước đó từ 1 đến 12 tuần.

Mục 32. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm,

để sử dụng theo mục 31, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm được sử dụng cho đối tượng với liều nằm trong khoảng từ 25 đến 600mg.

Mục 33. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 27 đến 32, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng cho đối tượng kết hợp với chất điều trị thứ hai.

Mục 34. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục 33, trong đó chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế LAG3, kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu khối u, kháng thể với kháng nguyên tế bào đã nhiễm virus, chất ức chế PD-1, chất ức chế PD-L1, chất ức chế CD20, kháng thể đặc hiệu kép với CD20 và CD3, thực phẩm chức năng như chất chống oxy hóa, chất đối kháng VEGF, vắc xin bệnh ung thư, chất hóa trị liệu, chất gây độc tế bào, xạ trị, phẫu thuật, và liệu pháp khác bất kỳ hữu ích để cải thiện ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc rối loạn.

Mục 35. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục 33 hoặc 34, trong đó chất điều trị thứ hai là chất ức chế PD-1.

Mục 36. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 33 đến 35, trong đó chất ức chế PD-1 là cemiplimab, nivolumab hoặc pembrolizumab.

Mục 37. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục 36, trong đó chất ức chế PD-1 được sử dụng với liều 1, 3 hoặc 10 mg/kg thể trọng của đối tượng.

Mục 38. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 33 đến 35, trong đó chất ức chế PD-1 được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ 50 đến 1200mg.

Mục 39. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm, để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 27 đến 38, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm được sử dụng qua đường dưới da, trong tĩnh mạch, trong khối u, quanh khối u, trong chân bì, trong màng bụng, qua đường miệng, trong cơ hoặc trong sọ.

Mục 40. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21, hoặc được phẩm theo mục 22, để sử dụng trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị bằng cách tạo đối kháng CTLA-4 ở đối tượng cần điều trị.

Mục 41. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, để sử dụng theo mục 40, trong đó bệnh hoặc rối loạn là bệnh nhiễm virus mạn tính do virus được chọn từ nhóm bao gồm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus: HIV), virus viêm gan C (hepatitis C virus: HCV), virus viêm gan B (hepatitis B virus: HBV), virus gây u nhú ở người (human papilloma virus: HPV), virus gây viêm màng não đám rối màng mạch tế bào lymphô (lymphocytic choriomeningitis virus: LCMV) và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (simian immunodeficiency virus: SIV) gây ra.

Mục 42. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm, để sử dụng theo mục 40, trong đó bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư máu, bệnh ung thư não, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư da, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, caxinom tế bào có vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư kết trực tràng, u trung biểu mô, u lymphô tế bào B, và u melanin.

Mục 43. Phương pháp tạo ra kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước cho tế bào chủ theo mục 26 sinh trưởng trong điều kiện cho phép tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được tạo ra này.

Mục 44. Phương pháp theo mục 43, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bào chế kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó dưới dạng được phẩm chứa chất mang được dụng.

Mục 45. Kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng kết hợp với kháng thể kháng PD-1 trong việc điều trị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ ở đối tượng cần điều trị.

Mục 46. Kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để

sử dụng theo mục 45, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như nêu trong mục bất kỳ trong số các mục từ 1 đến 21.

Mục 47. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục 45 hoặc 46, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 chứa các vùng CDR của HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194 và các vùng CDR của LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202.

Mục 48. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 47, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 chứa vùng HCDR1 có trình tự SEQ ID NO: 196, vùng CDR2 có trình tự SEQ ID NO: 198, vùng HCDR3 có trình tự SEQ ID NO: 200, vùng LCDR1 có trình tự SEQ ID NO: 204, vùng LCDR2 có trình tự SEQ ID NO: 206, và vùng LCDR3 có trình tự SEQ ID NO: 208.

Mục 49. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 48, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 chứa vùng HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194, và vùng LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202.

Mục 50. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 49, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 chứa vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người.

Mục 51. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 50, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 509 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 510.

Mục 52. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 51, trong đó kháng thể kháng PD-1 là cemiplimab.

Mục 53. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 52, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ 25 đến 600mg.

Mục 54. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 53, trong đó kháng thể kháng PD-1 được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ 50 đến 1200mg.

Mục 55. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 54, trong đó kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng dưới dạng liều ban đầu, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai, trong đó mỗi liều thứ hai được sử dụng sau liều ngay trước đó từ 1 đến 12 tuần.

Mục 56. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục từ 45 đến 55, trong đó bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) là bệnh NSCLC tiến triển hoặc di căn.

Mục 57. Dược phẩm theo mục 22 để sử dụng kết hợp với kháng thể kháng PD-1 trong việc điều trị bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ ở đối tượng cần điều trị.

Sáng chế không bị giới hạn phạm vi bởi các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Thật vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các cải biến đã được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này từ phần mô tả trên đây. Các cải biến này được dự định là vẫn nằm trong phạm vi của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với protein liên quan đến tế bào lymphô T gây độc tế bào 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4: CTLA-4), trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region: HCVR) bao gồm ba vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR) chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 196, 198 và 200, tương ứng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region: LCVR) bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) bao gồm các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 204, 206 và 208.
2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm HCVR bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 194 và LCVR bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 202.
3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng.
4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể hoàn toàn của người.
5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng cố định chuỗi nặng IgG1 của người.
6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 mà là kháng thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 509.
7. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 mà là kháng thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 510.
8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 mà là kháng thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm

trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 509 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 510.

9. Dược phẩm bao gồm kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

10. Phân tử polynucleotit đã phân lập bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa HCVR của kháng thể như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

11. Phân tử polynucleotit đã phân lập bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa LCVR của kháng thể như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

12. Vector bao gồm phân tử polynucleotit theo điểm 10 và/hoặc phân tử polynucleotit theo điểm 11.

13. Tế bào chủ đã phân lập biểu hiện vector theo điểm 12.

14. Cặp phân tử polynucleotit đã phân lập, trong đó cặp này bao gồm: phân tử polynucleotit thứ nhất bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa HCVR của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8; và phân tử polynucleotit thứ hai bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa LCVR của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

15. Cặp vector bao gồm các phân tử polynucleotit tương ứng của cặp phân tử polynucleotit đã phân lập theo điểm 14.

16. Tế bào chủ biểu hiện cặp vector theo điểm 15.

17. Phương pháp tạo ra kháng thể kháng CTLA-4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước cho tế bào chủ theo điểm 13 hoặc 16 sinh trưởng trong các điều kiện cho phép tạo ra kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và thu hồi kháng thể hoặc mảnh kháng thể được tạo ra này.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bào chế kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó dưới dạng dược phẩm bao gồm chất mang được dụng.

1/14

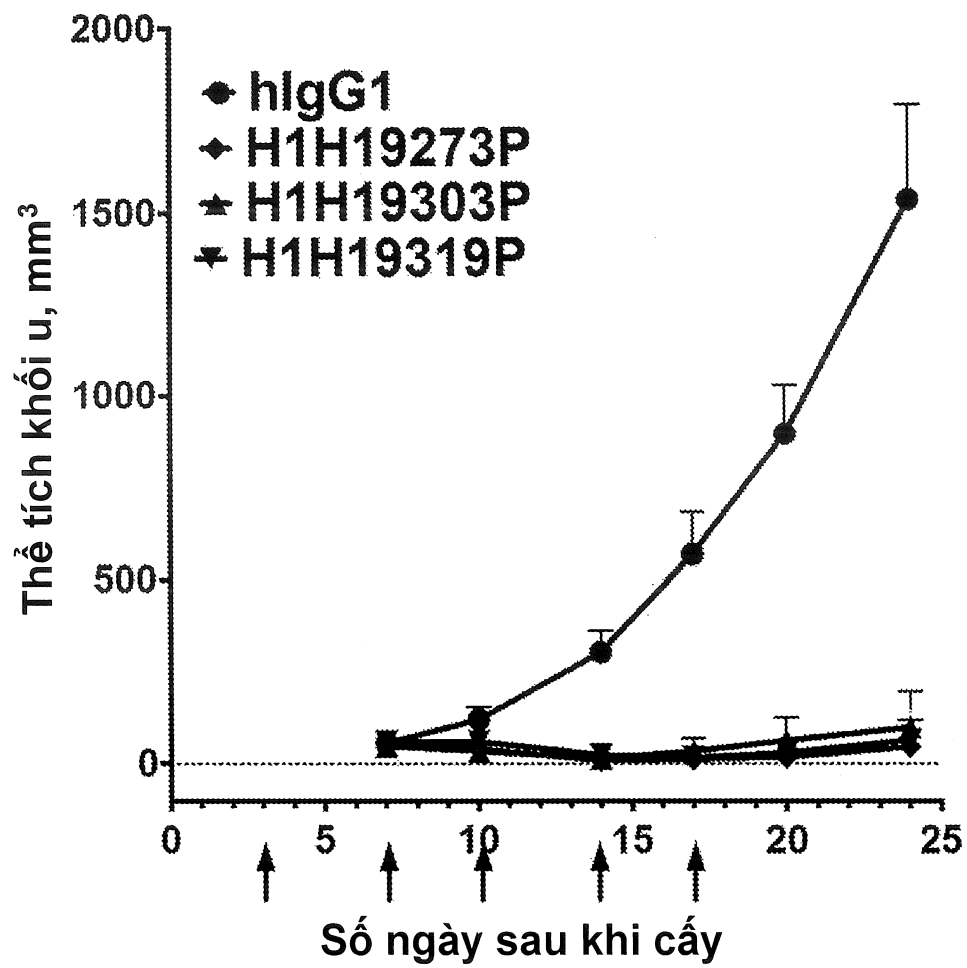
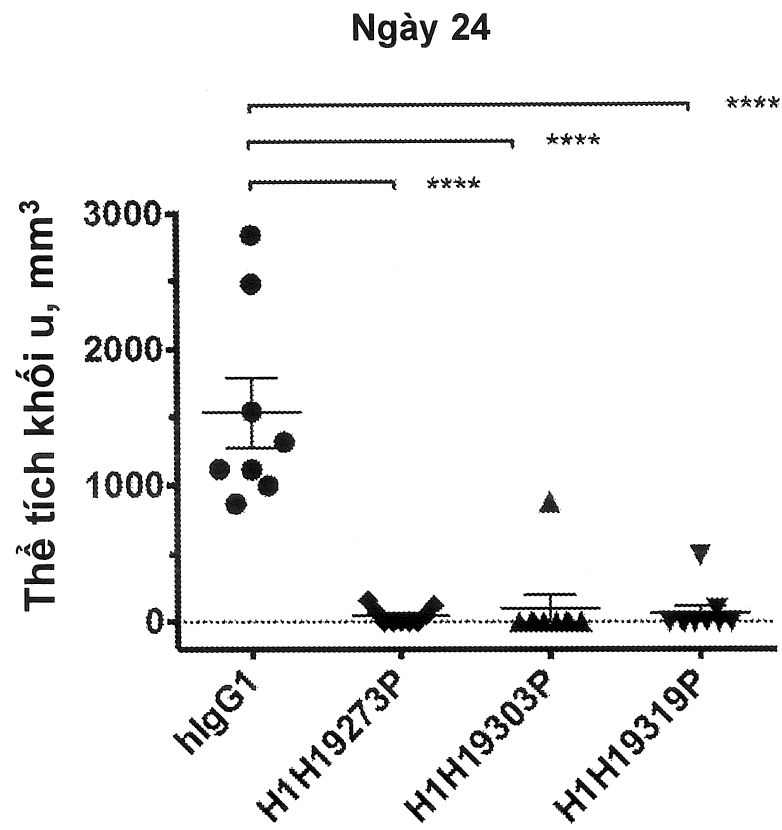


Fig.1

2/14



Phân tích phương sai (ANOVA) một chiều với kiểm định
nhiều so sánh của Tukey,
**** $p < 0,0001$

Fig.2

3/14

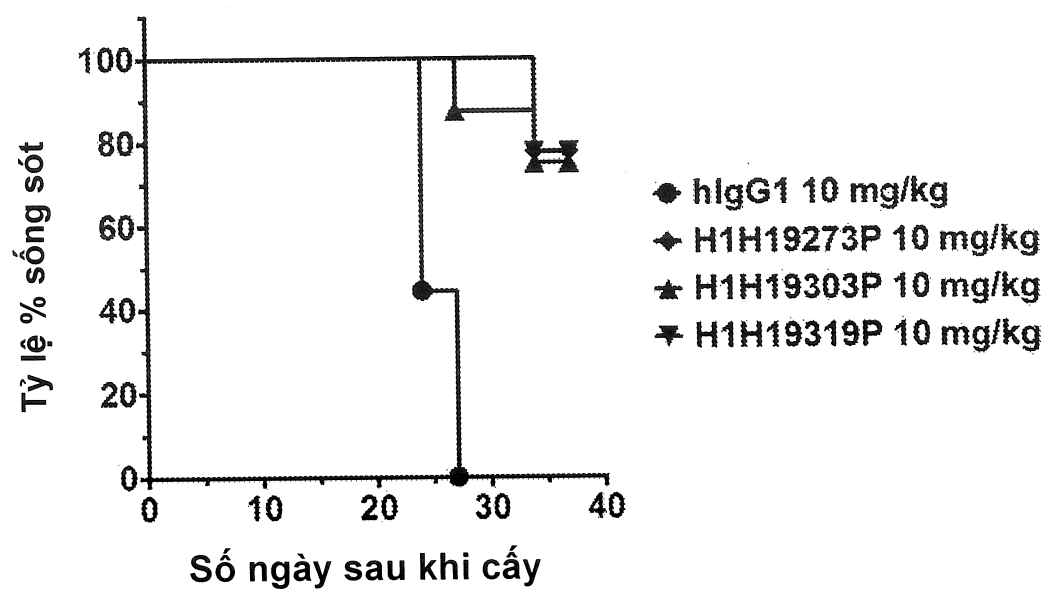


Fig.3

4/14

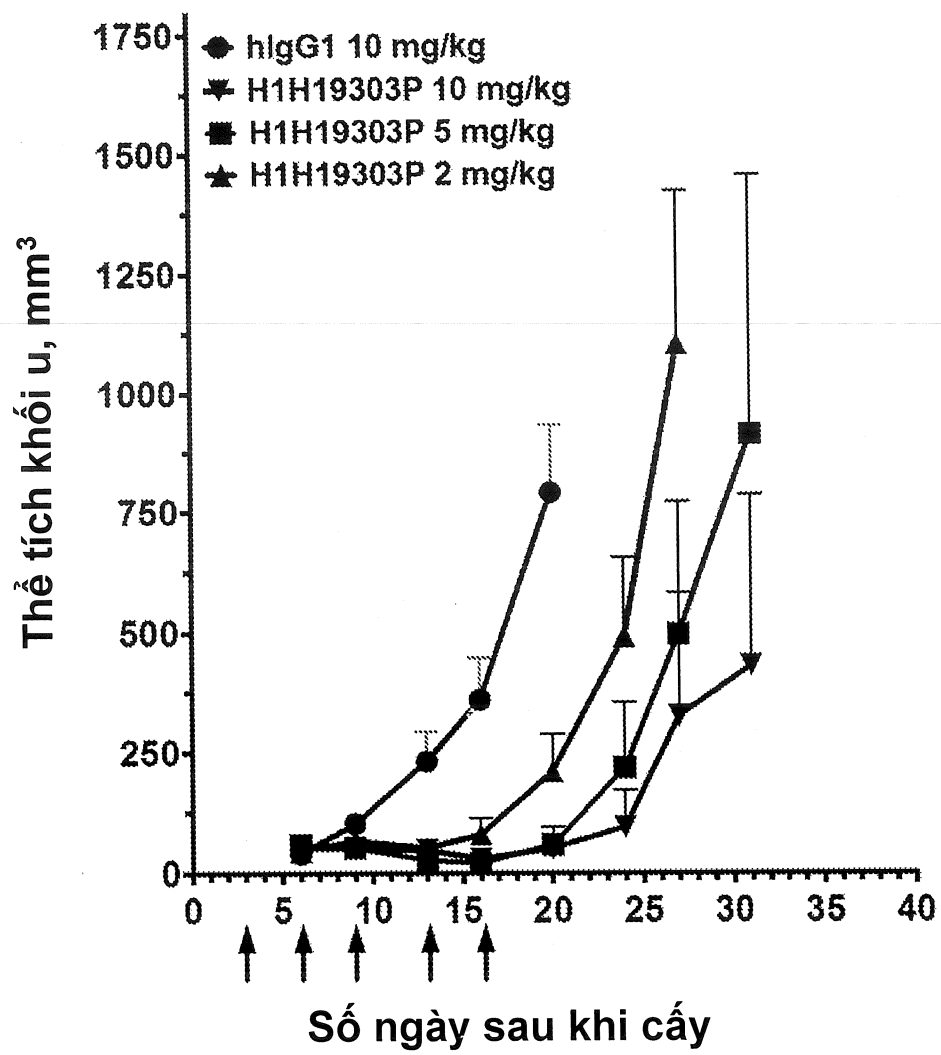


Fig.4

5/14

Ngày 20

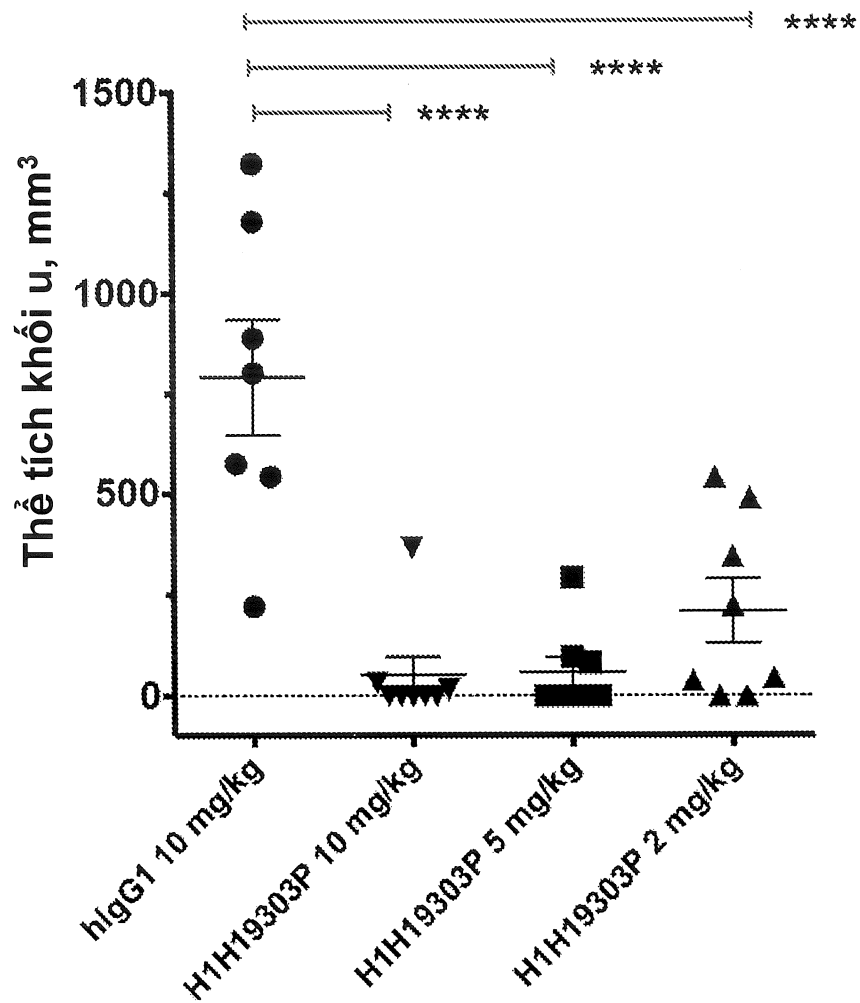


Fig.5

6/14

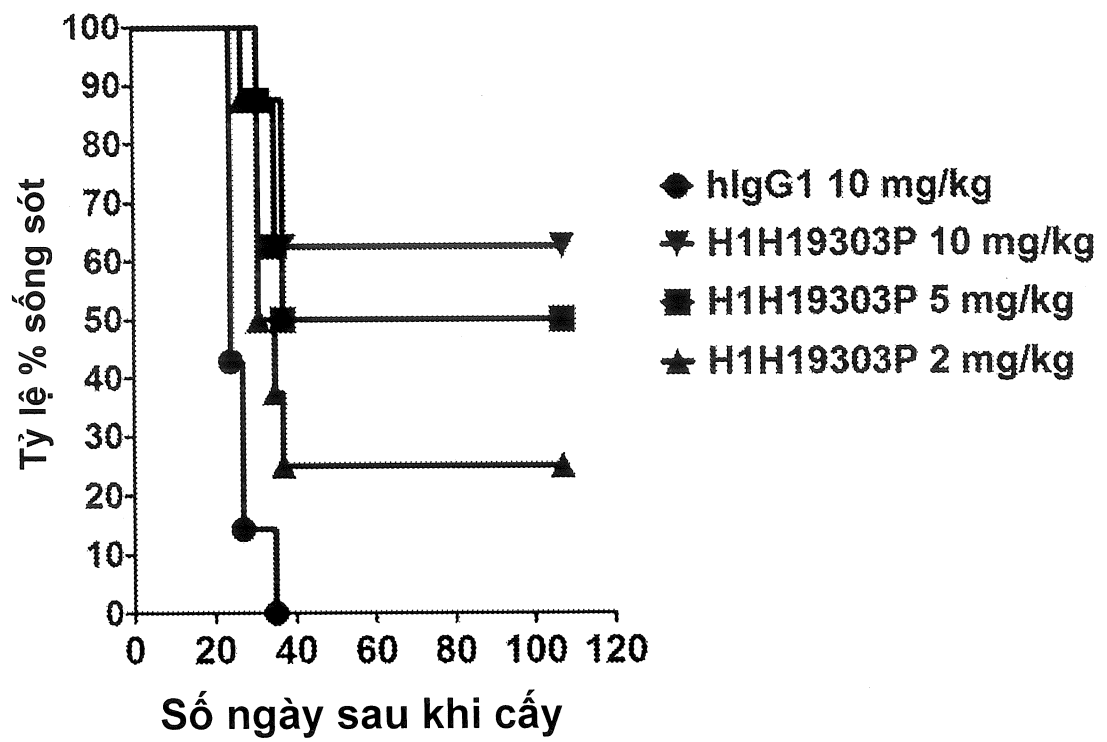


Fig.6

7/14

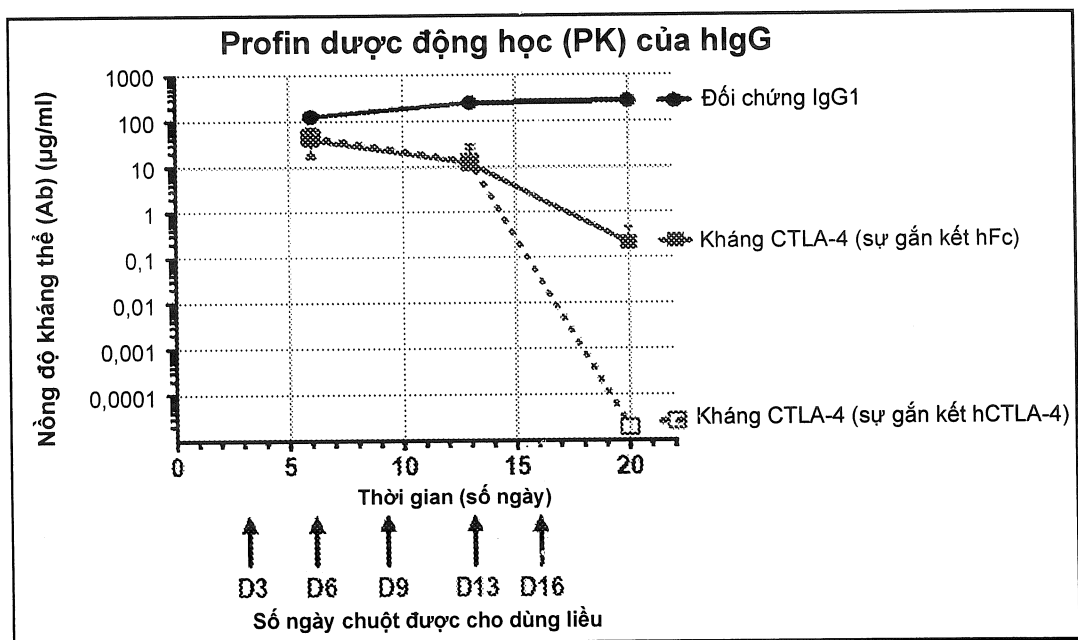
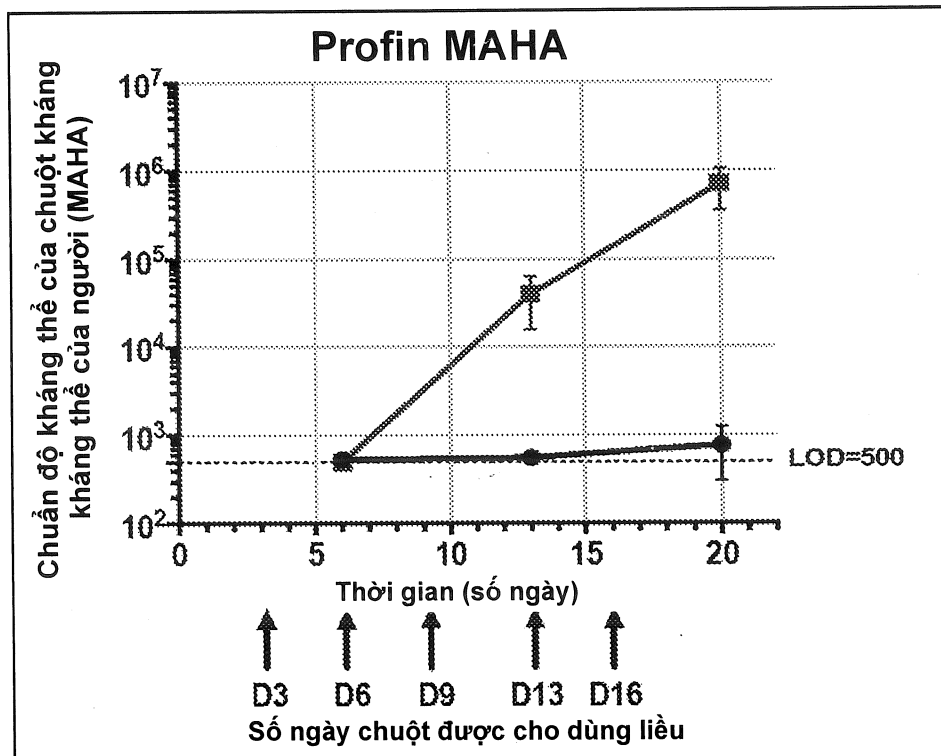


Fig.7

8/14

**Fig.8**

9/14

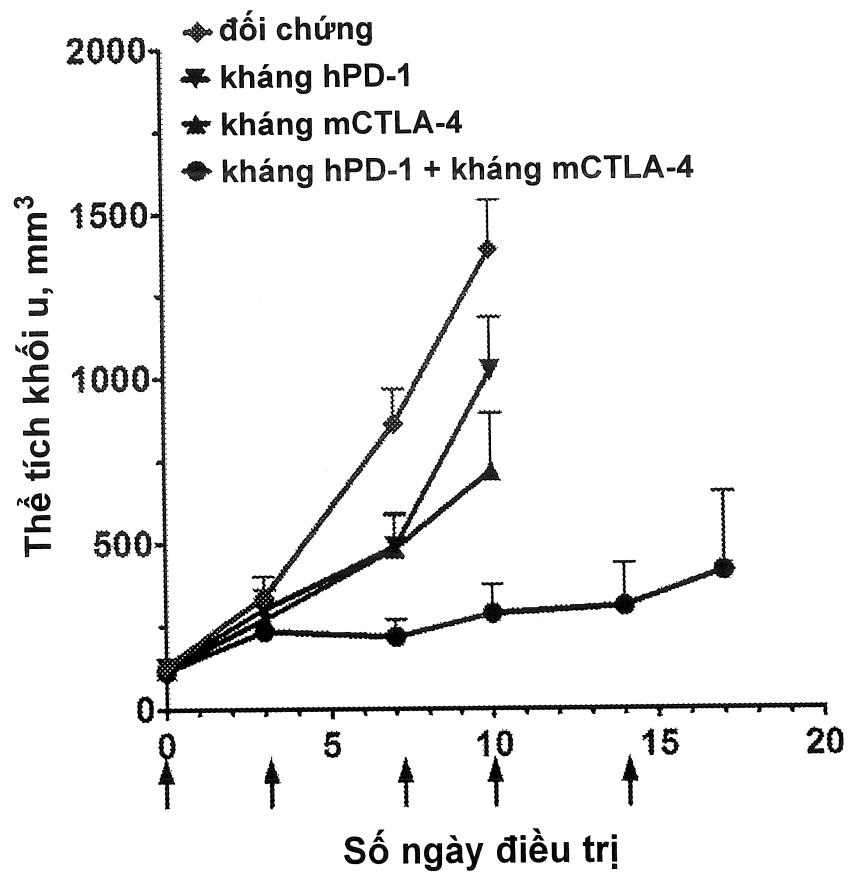
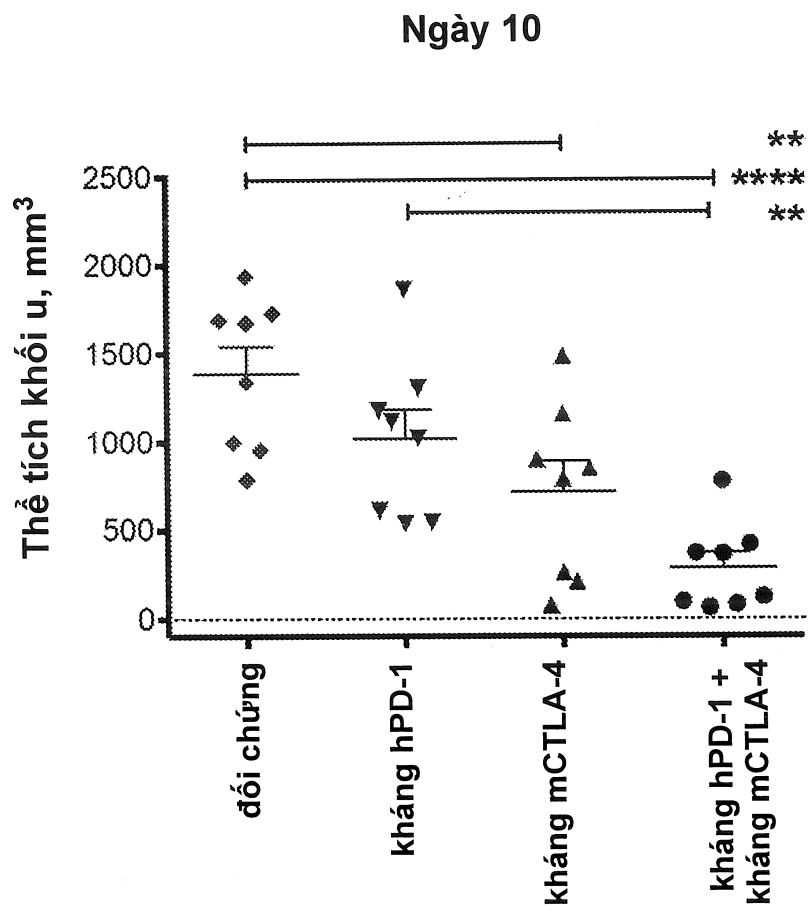


Fig.9

10/14

**Fig.10**

11/14

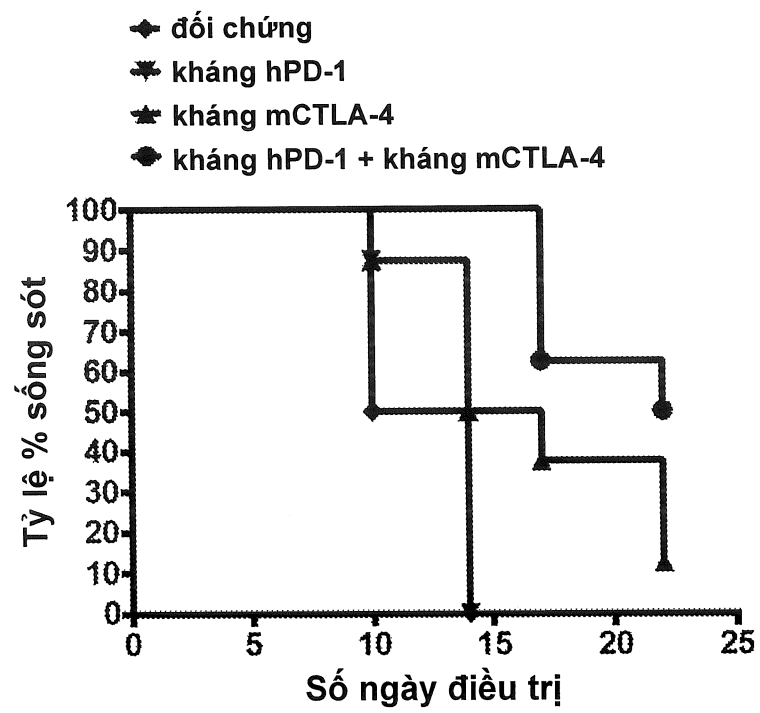


Fig.11

12/14

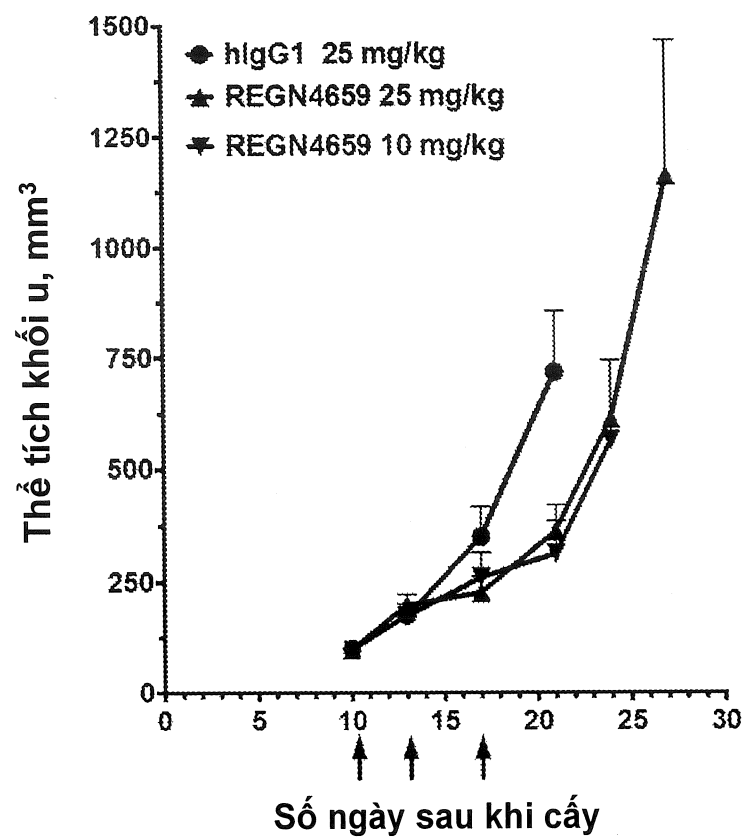
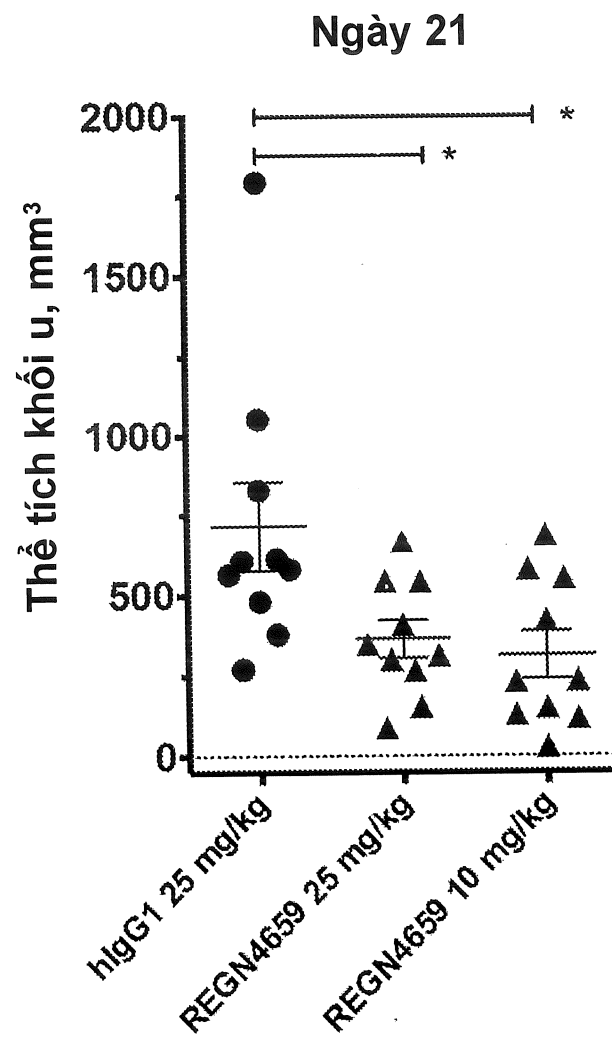


Fig.12

13/14

**Fig.13**

14/14

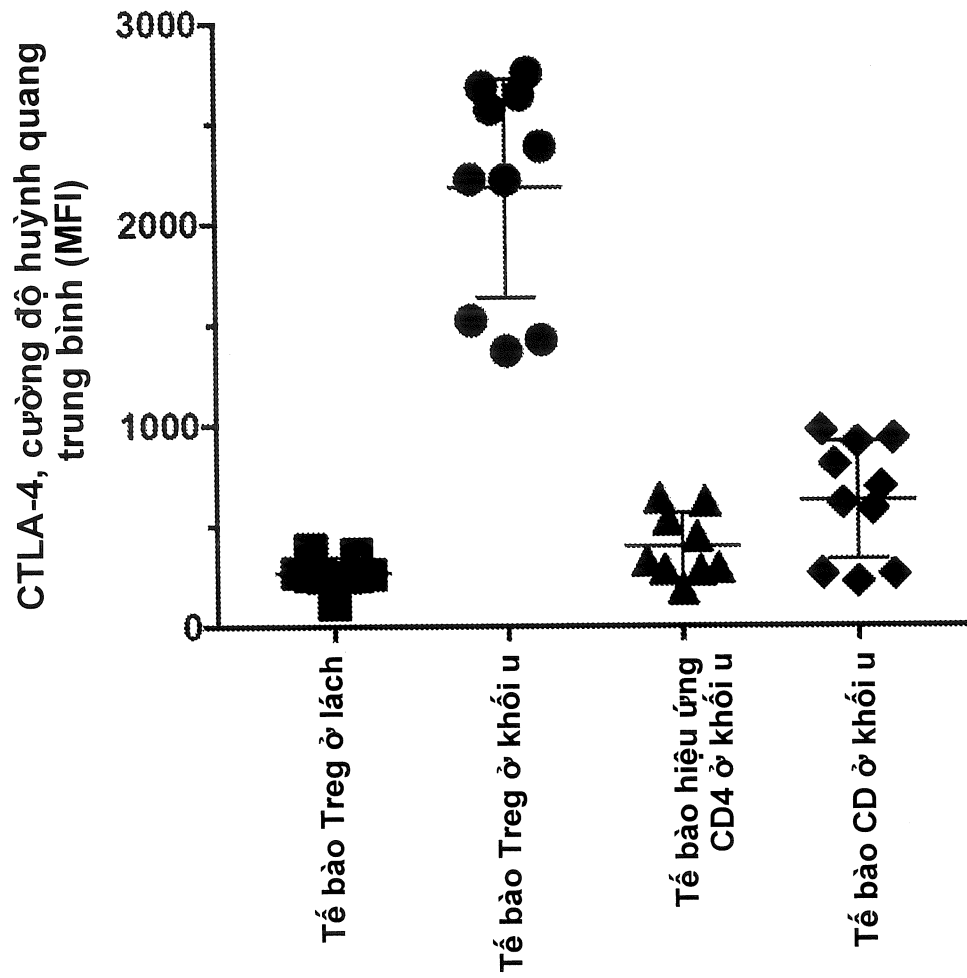


Fig.14

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Kháng thể gắn kết đặc hiệu với CTLA-4, dược phẩm và phương pháp tạo ra kháng thể này

<130> 10360WO01

<150> 62/537,753

<151> 2017-07-27

<150> 62/588,853

<151> 2017-11-20

<150> 62/645,284

<151> 2018-03-20

<150> 62/685,599

<151> 2018-06-15

<160> 510

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

```
cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctgatta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggctgg atcagcgttt acaatggtaa tataaactat 180
gcacagaagt tcaagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cactgcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac atggccgtgt attactgtgc gagagtgacc 300
caattcggta tggacgtctg gggccaagg accacggtca ccgtctcctc a 351
```

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
```


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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 3
 gattacacct ttaccagcta tggc

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 5
 atcagcgttt acaatggtaa tata

24

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 6

Ile Ser Val Tyr Asn Gly Asn Ile

1

5

<210> 7

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 7

gcgagagtgga cccaattcgg tatggacgtc

30

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 8

Ala Arg Val Thr Gln Phe Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagt agtaatttaa attggtatca gcagaatcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact acatccagtt tgcaaggtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctacaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtttcagga cccattcac tttcggccct 300
gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 10

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

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 11

cagagcatta gtagtaat

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 12

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn
1				5	

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 13

actacatcc

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 14
 Thr Thr Ser
 1

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 15
 caacagagtt tcaggacccc attcact

27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 16
 Gln Gln Ser Phe Arg Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 17
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggggt caccttcagt ggctctgcta tgcaactgggt ccgccaggct 120
 tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaggca aagctaataag tttcgcgaca 180
 gcatattctg cgctcggtgaa aggcagggtc accatctcca gagatgactc aaagaacacg 240
 gcgctctctgc aaatgaacag cctgagaacc gaagacacgg ccgtgtattt ttgtactaga 300
 gaggatcagc agttggtacg tccatactac taccactacg gtatggacgt ctgggggcca 360
 ggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 18
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 19
 gggttcacct tcagtggctc tgct

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Ala
 1 5

<210> 21
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 21
 attagaggca aagctaataag tttcgcgaca

30

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 22
 Ile Arg Gly Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 23
 actagagagg atcagcagtt ggtacgtcca tactactacc actacggtat ggacgtc

57

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 24
 Thr Arg Glu Asp Gln Gln Leu Val Arg Pro Tyr Tyr Tyr His Tyr Gly
 1 5 10 15
 Met Asp Val

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 25

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gagcattacc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct acagccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgagacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa 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 Thr Ser Gln Ser Ile Thr 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 Thr Ala Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Glu 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 Leu
85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105
```

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 27

cagagcatta ccaactat

18

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 28
Gln Ser Ile Thr Asn Tyr
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 29
gctacagcc

9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 30
Ala Thr Ala
1

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 31
caacagagtt acagtacccc gctcact

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 32
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 33

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 33
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
 acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtggag tgggtgtggg ctggatccgt 120
 cagtccccag gaagggccct ggagtggctg gcaactcattt attggaatga tcatgagcgc 180
 tatagtccat ctctgaagag caggctcacc attaccaagg acacctcaa aaacctgggt 240
 gtctctgcaa tggccaacat ggaccccgctg gacacagcca catatttctg tgcacacaga 300
 aacatcgaat atagaaggtc gtacttcttt gactactggg gtcagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 34
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp His Glu Arg Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Leu Val
 65 70 75 80
 Val Leu Ala Met Ala Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95
 Cys Ala His Arg Asn Ile Glu Tyr Arg Arg Ser Tyr Phe Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 35
 ggggtctcac tcagcactag tggagtgggt

30

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly
 1 5 10

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 37
 atttattgga atgatcatga g

21

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 38
 Ile Tyr Trp Asn Asp His Glu
 1 5

<210> 39
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 39
 gcacacagaa acatcgaata tagaagggtcg tacttctttg actac

45

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 40

Ala	His	Arg	Asn	Ile	Glu	Tyr	Arg	Arg	Ser	Tyr	Phe	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15

<210> 41

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 41

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctgtaagaga	cagagtcacc	60
gtcacttgtc	ggcgagtc	ggatattaac	aactggtag	cctgggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaaactcct	gatctatgct	gcatccagtt	tacaaagtgg	ggccccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttacta	ttgtcaacag	gctaacactt	tcccattcac	tttcggccct	300
gggaccaaag	tgatatcaa	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	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	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	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	Ala	Asn	Thr	Phe	Pro	Phe
			85				90						95		
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 43

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 43

caggatatta acaactgg

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 44

Gln Asp Ile Asn Asn Trp

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

caacaggcta acactttccc attcact

27

<210> 48

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 48
 Gln Gln Ala Asn Thr Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 49
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcaat agttattact ggacctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattggatat gtctattaca gtgggagcac cacctacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcttcctg 240
 aacctgaact ctgtgaccgc tgcggaaacg gccgtgtatt actgtgagag agggacactg 300
 gggactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 50
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 51
 ggtggctcca tcaatagtta ttac

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 53
 gtctattaca gtgggagcac c

21

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 54
 Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 55

gcgagaggga cactggggta ctacggatatg gacgtc

36

<210> 56

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 56

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

<210> 57

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 57

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtttttagc aacaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca tcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcgccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttattgtcag cagtatggta ggtcacctct cactttcggc 300
 ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 58

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 Ser Asn 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 Thr Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Arg	Ser	Pro
				85					90					95	
Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 59
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 59
 cagagtttta gcaacaacta c

21

<210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 60
 Gln Ser Phe Ser Asn Asn Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 61
 ggtacatcc

9

<210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 62
 Gly Thr Ser
 1

<210> 63
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 63
 cagcagtatg gtaggtcacc tctcact

27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 64
 Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 65
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt acatgggatg atggaagtaa taaacattat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaattgt acagcctgag agccgaggac acggctatgt attattgtgt gagagggggg 300
 cacctcggcg cttttgatat ctgggggcaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 67
 ggattcacct tcagtagtta tggc

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 69
 acatggatatg atggaagtaa taaa

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 70

Thr Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 71

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 71

gtgagagggg ggcacctcgg cgcttttgat atc

33

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 72

Val Arg Gly Gly His Leu Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 73

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 73

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccagca gggccactgg catcccagac 180
aggttcagtg gcggtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 240
gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag tatggtagct caccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 74

```

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

```

<210> 75

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 75

cagagtgtta gcagctac

18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 76

```

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1           5

```

<210> 77

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 77

ggtgcatcc

9

<210> 78

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 78
 Gly Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 79
 cagcagtatg gtagctcacc attcact

27

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

<210> 81
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 81
 caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactata tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacagg ggcttgagtg gatggggtgg atcaacccta acaatgggtgt ctcaaattat 180
 gcacagaagt ttcagggccg ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggacctga tcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagagg 300
 gctagctggg actacaacgg tgtggacgctc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 82

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 82
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 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 Asn Gly Val Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Ala Ser Trp Asp Tyr Asn Gly Val Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 83
 ggatacacct tcaccgacta ctat

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 84
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 85

atcaacccta acaatgggtgt ctca

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 86

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Ser

1

5

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 87

gcgagagaga gggctagctg ggactacaac ggtgtggacg tc

42

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 88

Ala Arg Glu Arg Ala Ser Trp Asp Tyr Asn Gly Val Asp Val

1

5

10

<210> 89

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 89

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

```

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacagcta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtct acaacctccg 300
aacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

```

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

<210> 91
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 91
 cagagcctcc tgcatagtaa tggatacagc tat 33

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 92
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Ser Tyr
 1 5 10

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 93
 ttgggttct

9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 94
 Leu Gly Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 95
 atgcaaggctc tacaacctcc gaacact

27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 96
 Met Gln Gly Leu Gln Pro Pro Asn Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 97

```

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctagtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgtattg tctctgggtg ctccaccagc agtaacactt actactgggg ctggatccgt 120
cagccccagc ggaaggggtct ggaatggatt gggactatcc attatagtgg gaaccctac 180
tacgaccctg ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccacttc 240
tccctgaagc tgaactctgt gaccgccgca gacacggctg tttattactg tacgagacag 300
tacattaact tctttgactt ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 98

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 98

```

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

```

<210> 99

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 99

```

ggtggctcca ccagcagtaa cacttactac

```

30

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 100

Gly Gly Ser Thr Ser Ser Asn Thr Tyr Tyr
1 5 10

<210> 101

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 101

atccattata gtgggaaccc c

21

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 102

Ile His Tyr Ser Gly Asn Pro
1 5

<210> 103

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 103

acgagacagt acattaactt ctttgacttc

30

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 104

Thr Arg Gln Tyr Ile Asn Phe Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 105
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcact 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agatacttag cctgggtatca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccagggtcct catttatgat gcatccaaca gggccactga catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag tctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaatt ggcctatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

18

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

<220>
<223> tổng hợp

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

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 109
gatgcatcc

9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 110
Asp Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 111
cagcagcgta gcaattggcc tatcacc

27

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 112

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
1 5

<210> 113

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 113

```
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggact caccttcagt tactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatattat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac gcggctgtgt attactgtgc gaaagatttg 300
ggggggggacg actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca
```

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 114

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

<210> 115

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 115

ggactcacct tcagttacta tggc

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 116

Gly Leu Thr Phe Ser Tyr Tyr Gly
1 5

<210> 117

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 117

atatcatatg atggaagtaa taaa

24

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 118

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 119

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 119

gcgaaagatt tgggggggga cgactactac ggtatggacg tc

42

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 120

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

<210> 121

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 121

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agaacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 122

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 122

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

<210> 123
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 123
 cagagtgtta gcagaacctt c

21

<210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 124
 Gln Ser Val Ser Arg Thr Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 125
 ggtgcattc

9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 126
 Gly Ala Phe
 1

<210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 127

cagcagtatg gtagctcacc gtacact

27

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 128

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr

1

5

<210> 129

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 129

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgacctggat ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtggtaa catattctac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatac acagcctgag aggcgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggtctg 300
 gaaccctacc actactatta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 130

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 130

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 131
 ggattcacct tcagtgacta ctac

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

<210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 133
 attagtagta gtggtggtaa cata

24

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 134

Ile Ser Ser Ser Gly Gly Asn Ile
1 5

<210> 135
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 135
gcgagaggtc tggaacccta ccactactat tacggtatgg acgtc 45

<210> 136
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 136
Ala Arg Gly Leu Glu Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 137
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 137
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc aggcgagtca ggacattagt aattatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
agggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatattg caacatattt ctgtcaacac tatgataatc tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 138
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 138
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 139
 caggacatta gtaattat

18

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 141
 gatgcatcc

9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 142
Asp Ala Ser
1

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 143
caacactatg ataatctccc attcact

27

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 144
Gln His Tyr Asp Asn Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 145
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 145
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttgagt aattatgtca tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gaggtggtaa ttcataattat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcagcatt tccagggacc attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagccgaa 300
cgtggataca gttatggctt caactgggtc gacccctggg gccagggaa cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 146
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 146

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

<210> 147

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 147

ggattcacct tgagtaatta tgtc

24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 148

Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Val
1				5			

<210> 149

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 149
attagtggta gaggtggtaa ttca

24

<210> 150
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 150
Ile Ser Gly Arg Gly Gly Asn Ser
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 151
gcgaaagccg aacgtggata cagttatggc ttcaactggg tcgacccc

48

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

<220>
<223> tổng hợp

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

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 153
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgcaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatttttg catcttacta ttgtcaacag ggtaacaatt tcccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 154
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala 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 Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Asn Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 155
 cagggtatta gcagctgg 18

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 156
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 157
 <211> 9

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 157
gctgcatcc

9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 158
Ala Ala Ser
1

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 159
caacagggta acaatttccc gctcact

27

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 160
Gln Gln Gly Asn Asn Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 161
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

```

<400> 161
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt cgcagggt 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacagtt atatggtatg atggaaataa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataa acaacctgag agccgaggat acggctttat actactgtgc gagaggaggt 300
gggaggttat cgtactatca tgactactgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca 360

```

```

<210> 162
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 162
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Thr Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn 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 Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Gly Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Tyr His Asp Tyr Trp Gly Gln
100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

```

<210> 163
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 163
ggattcacct tcagtaccta tggc

```

24

```

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

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

<400> 164
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 165
 atatggtatg atggaaataa taaa 24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 166
 Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
 1 5

<210> 167
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 167
 gcgagaggag gtgggaggtt atcggtactat catgactac 39

<210> 168
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 168
 Ala Arg Gly Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Tyr His Asp Tyr
 1 5 10

<210> 169
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 169
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acctttttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatggc acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg cagcttacta ctgtcaacag acttacagta cccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 170
 <211> 107
 <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 Thr Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Thr 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 Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 171
 cagagcatta gcaccttt

18

<210> 172
 <211> 6

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 172
Gln Ser Ile Ser Thr Phe
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 173
ggtacatcc

9

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 174
Gly Thr Ser
1

<210> 175
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 175
caacagactt acagtacccc attcact

27

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 176

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 177

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 177

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagatgt ctggggcctc agtgagggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta ttagctggat gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaccgctt acaatggtaa ctcaaactat 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacggg cacagcctac 240
 atggagttga ggagcctgac atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggggg 300
 gactaccttg gggtttttcc ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 178

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 178

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

<210> 179

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 179

ggttacacct ttaccagcta tgggt

24

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 180

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly

1

5

<210> 181

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 181

atcaccgctt acaatggtaa ctca

24

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 182

Ile Thr Ala Tyr Asn Gly Asn Ser

1

5

<210> 183

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 183

gcgagaaggg gggactacct tggggttttt ccctac

36

<210> 184

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 184
 Ala Arg Arg Gly Asp Tyr Leu Gly Val Phe Pro Tyr
 1 5 10

<210> 185
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 185
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagt agctatttaa attggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtt cccccctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 186
 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 Asn Leu 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 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 Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 187

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 187
 cagagcatta gtagctat

18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 188
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 189
 actgcatcc

9

<210> 190
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 190
 Thr Ala Ser
 1

<210> 191
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 191
caacagagtt acagttcccc cctcact

27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 192
Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 193
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 193
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggaggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aattatgaga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatcc attagaacta gtggtactac caaatactac 180
gcagactcta tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gggaggggggt 300
acgttcctcc actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 194
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 194
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 Asn Tyr
20 25 30
Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Arg Thr Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
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 Gly Gly Gly Thr Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 195
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 195
 ggattcacct tcagtaatta tgag

24

<210> 196
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 196
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Glu
 1 5

<210> 197
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 197
 attagaacta gtggtactac caaa

24

<210> 198
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 198
 Ile Arg Thr Ser Gly Thr Thr Lys
 1 5

<210> 199
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 199
 gcgggagggg gtacgttcct ccactac

27

<210> 200
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 200
 Ala Gly Gly Gly Thr Phe Leu His Tyr
 1 5

<210> 201
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 201
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggatttgcc agctatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatttatgct gcatccagtt tgcaaactgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggata tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaagagtt tccccatgta cacttttggc 300
 caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 202
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 202
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ala Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

55

<400> 206
Ala Ala Ser
1

<210> 207
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 207
caacaggcta agagtttccc catgtacact 30

<210> 208
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 208
Gln Gln Ala Lys Ser Phe Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 209
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 209
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcacc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatct ttacagtgg gatcaccaac 180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaaac tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgacgtat 300
aacagcctcc gactctacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
tcctca 366

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 210

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

<210> 211

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 211

gggtggctcca tcaccagtgg tgggttactac

30

<210> 212

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 212

Gly	Gly	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Tyr	Tyr
1				5				10	

<210> 213

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 213

atctttttaca gtgggatcac c

21

<210> 214
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 214
 Ile Phe Tyr Ser Gly Ile Thr
 1 5

<210> 215
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 215
 gcgacgtata acagcctccg actctactac ggtatggacg tc 42

<210> 216
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 216
 Ala Thr Tyr Asn Ser Leu Arg Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 217
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 217
 gatgttgtga tgacccagtc tccactctcc ctgcccgtca tccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacggtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgactaattt ataaggtttc taaccgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggctcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tggtgggggtt tattactgca tgcaaagtac aactgggccg 300
 ctcaactttcg gcggaggggac caaggtggag atcaaaa 336

<210> 218

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 218
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ile Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Gly
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 219
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 219
 caaagcctcg tatacgggtga tggaaacacc tac

33

<210> 220
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 220
 Gln Ser Leu Val Tyr Gly Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 221
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 221
aaggtttct

9

<210> 222
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 222
Lys Val Ser
1

<210> 223
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 223
atgcaaagta cacactggcc gctcact

27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 224
Met Gln Ser Thr His Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 225
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 225
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctggaggggc cctgagactc 60
gcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactattaca tggactgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggagtg gggtggccgt tctagagaca aagctaacag tttcaccaca 180

gaatacgtcg cgtctgtgaa aggtagattc accatctcac gagaagattc aaagaactca 240
 gtgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaagacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 300
 acaaattacg atttttcctt ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 226
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 226
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ser Arg Asp Lys Ala Asn Ser Phe Thr Thr Glu Tyr Val Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Thr Asn Tyr Asp Phe Ser Leu Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 227
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 227
 ggattcacct tcagtgacta ttac

24

<210> 228
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 228
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 229
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 229
 tctagagaca aagctaacag tttcaccaca

30

<210> 230
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 230
 Ser Arg Asp Lys Ala Asn Ser Phe Thr Thr
 1 5 10

<210> 231
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 231
 gctagaacaa attacgattt ttccttggac gtc

33

<210> 232
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 232
 Ala Arg Thr Asn Tyr Asp Phe Ser Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 233
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 233

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattaac aattatttag cctgggtttca gcagaaacca 120
gggaacgccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacaa tatagtactt acccgatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a                                     321

```

<210> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 234

```

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

```

<210> 235

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 235

caggacatta acaattat

18

<210> 236

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 236

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
1 5

<210> 237

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 237

gctgcatcc

9

<210> 238

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 238

Ala Ala Ser

1

<210> 239

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 239

caacaatata gtacttaccc gatcacc

27

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 240

Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile Thr

1

5

<210> 241
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 241
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgtactg tctctggtgg ctccatcagt agttaccact ggagctggat ccggcagcct 120
 ctagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caattacaac 180
 ccctccctca agagtcgggt caccatatca gtagacacgt ccaaaaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggatacg gccgtgtatt actgtgcgag agggggtagc 300
 agcatctggc cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 242
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 242
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Ser Ser Ile Trp Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 243
 ggtggctcca tcagtagtta ccac

24

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 244
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr His
 1 5

<210> 245
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 245
 atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 246
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 246
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 247
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 247
 gcgagagggg gtagcagcat ctggcccttt gactac

36

<210> 248
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 248

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

<210> 249

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 249

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggccagtc gagtattagt agctggttg cctggtatca gcagaaatca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctctaag gcgtctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactctca ccatacagcag cctgcagcct 240
 gatgatatttg caacttatta ctgccaacag tataatatatt attcgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 250

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 250

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

<210> 251

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 251

cagagtatta gtagctgg

18

<210> 252

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 252

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 253

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 253

aaggcgtct

9

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 254

Lys Ala Ser
1

<210> 255

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 255

caacagtata atatttattc gtggacg

27

<210> 256
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 256
 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Ser Trp Thr
 1 5

<210> 257
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 257
 cagatcacct tgaaggagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
 acctgcacct tctccgggtt ctcactcagc actagtggag tgggtgtggg ctggatccgt 120
 cagcccccag gagtggccct ggagtggctt gcactcattt attggaatga tgataaacgc 180
 ttcagcccat ctctgaagag tgggtcacc atcaccaaag acacctcaa aaaccagggtg 240
 gtccttacaa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca catattactg tgcacacagg 300
 agacttggac tatactactt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 258
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 258
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Val Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Phe Ser Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala His Arg Arg Leu Gly Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 259
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 259
 gggttctcac tcagcactag tggagtgggt

30

<210> 260
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 260
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 261
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 261
 atttattgga atgatgataa a

21

<210> 262
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 262
 Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys
 1 5

<210> 263
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 263

gcacacagga gacttggact atactacttt gactac

36

<210> 264

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 264

Ala His Arg Arg Leu Gly Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 265

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 265

gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggccagtc gggcattagc agttatttag cctggatatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag gttcatattt acccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 266

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 266

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys 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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val His Ile Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 267
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 267
 cagggcatta gcagttat

18

<210> 268
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 268
 Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 269
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 269
 gctgcatcc

9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 270
 Ala Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 271
 caacaggttc atatttaccc attcact

27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 272
 Gln Gln Val His Ile Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 273
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 273
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta caccctaagc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gacttgagtg gatggggtgg atcagcgctt acaatggaaa cacaaactat 180
 gctcagaagc tccagggtag actcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtat attattgttc gagagacggg 300
 ccctttaaga tacccttttt cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 274
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 274
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

<210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 275
 ggttacaccc taagcagcta tgggt

24

<210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 276
 Gly Tyr Thr Leu Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 277
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 277
 atcagcgctt acaatggaaa caca

24

<210> 278
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 278

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 279

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 279

tcgagagacg ggccctttaa gatatccttt ttcggtatgg acgtc

45

<210> 280

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 280

Ser Arg Asp Gly Pro Phe Lys Ile Ser Phe Phe Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 281

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 281

gacatccaga tgacccagtc 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> 282

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 282

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> 283

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 283

cagagcatta gcagctat

18

<210> 284

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 284

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
1				5	

<210> 285

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 285

gctgcatcc

9

<210> 286

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 286

Ala Ala Ser

1

<210> 287

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 287

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 288

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 288

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1

5

10

<210> 289

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 289

cagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gaggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatgggatg	atggaaggaa	taaacactat	180
gtagattccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacggtgtat	240
ctgcaaata	acagcctgag	agccgaggac	tcggctgtgt	attattgtgt	gagagggggg	300
cagctcggcg	cttttgatta	ctggggccag	gggaccctgg	tcaccgtctc	ctca	354

<210> 290
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 290
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Glu 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
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys His Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Gly Gln Leu Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 291
 ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 292
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 293
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 293
 atatggtatg atggaaggaa taaa

24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 294
 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 295
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 295
 gtgagagggg ggcagctcgg cgcttttgat tac

33

<210> 296
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 296
 Val Arg Gly Gly Gln Leu Gly Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 297
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 297
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gtcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 298
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 298
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 299
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 299
 cagagtgtta gcagcagcta c 21

<210> 300
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 300
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1

5

<210> 301
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 301
 ggtgcatcc

9

<210> 302
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 302
 Gly Ala Ser
 1

<210> 303
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 303
 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 304
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 305
 <211> 354
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 305

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt cacctccagt agctatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggg 300
ccgtgggggtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354
```

<210> 306

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 306

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

<210> 307

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 307

ggattcacct ccagtagcta tggc

24

<210> 308

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 308

Gly Phe Thr Ser Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 309

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 309

atatggtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 310

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 311

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 311

gcgagagggg gtccgtgggg tgcttttgat atc

33

<210> 312

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 312

Ala Arg Gly Gly Pro Trp Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 313
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 313
 caggtacagt tgcattgagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcagtg tctctggtgg ctccatcagt aatggtggtt actactggag ttggatccgc 120
 cagcaccacag ggcagggcct ggagtggatt ggatacatct attatatattg gaacacatac 180
 tacaatccgt cccttgagag tcgagttacc atgtcaattg acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctaaaac tgagctctgt gactgccgcg gacacggcca tatactactg tgcgcgacag 300
 gagttcgtcc cgggcgctga atatttccta cactggggcc agggcatcct ggtcaccgtc 360
 tcctca

<210> 314
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 314
 Gln Val Gln Leu His Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Gln Glu Phe Val Pro Gly Ala Glu Tyr Phe Leu His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 315
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 315

ggtggctcca tcagtaatgg tggttactac

30

<210> 316

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 316

Gly Gly Ser Ile Ser Asn Gly Gly Tyr Tyr
1 5 10

<210> 317

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 317

atctattata ttgggaacac a

21

<210> 318

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 318

Ile Tyr Tyr Ile Gly Asn Thr
1 5

<210> 319

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 319

gcgcgacagg agttcgtccc gggcgctgaa tatttcctac ac

42

<210> 320

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 320
 Ala Arg Gln Glu Phe Val Pro Gly Ala Glu Tyr Phe Leu His
 1 5 10

<210> 321
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 321
 gacatccgga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctggttgaga cagagtcacc 60
 atcacctgcc gggcaagtca gaccgttaac acctttttaa attggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatcttttgt gcgccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcgg tctacagcct 240
 gaagactttg caatttatta ctgtcagcag agttacagtg tccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat tgaa 324

<210> 322
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 322
 Asp Ile Arg 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 Val Asn Thr Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Gly 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 Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Val Pro Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Glu
 100 105

<210> 323

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 323
 cagaccgtta acaccttt

18

<210> 324
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 324
 Gln Thr Val Asn Thr Phe
 1 5

<210> 325
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 325
 ggtgcgtcc

9

<210> 326
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 326
 Gly Ala Ser
 1

<210> 327
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 327
cagcagagtt acagtgtccc tccgatcacc

30

<210> 328
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 328
Gln Gln Ser Tyr Ser Val Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 329
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 329
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag gcactggatt catctttgat gactatgcc tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga acagtaatag tttaggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa atccctgtat 240
ttgcaaatga gcagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagatgta 300
actagactgg aactacgagg atttcttgac tattggggcc aggggaaccca ggtcaccgctc 366
tcttca

<210> 330
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 330
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 Gly Thr Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
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 Asn Ser Asn Ser Leu 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 Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

				85					90					95			
Val	Lys	Asp	Val	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Phe	Leu	Asp	Tyr	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120										

<210> 331
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 331
 ggattcatct ttgatgacta tgcc

24

<210> 332
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 332
 Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 333
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 333
 attagttgga acagtaatag ttta

24

<210> 334
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 334
 Ile Ser Trp Asn Ser Asn Ser Leu
 1 5

<210> 335
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 335
 gtaaaagatg taactagact ggaactacga ggatttcttg actat 45

<210> 336
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 336
 Val Lys Asp Val Thr Arg Leu Glu Leu Arg Gly Phe Leu Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 337
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 337
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggacattaga aatgatttag gctggcatca gcagaaatca 120
 gggaaagccc ctaagagcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggccccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattctg caacttatta ctgtctacag caaaatagtt accctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 338
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 338
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

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

<210> 339
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 339
 caggacatta gaaatgat

18

<210> 340
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 340
 Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 341
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 341
 gctgcatcc

9

<210> 342
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 342
Ala Ala Ser
1

<210> 343
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 343
ctacagcaaa atagttaccc tccgacg

27

<210> 344
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 344
Leu Gln Gln Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 345
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 345
gatagacaga tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtatag cgtctggatt catcatcagt agatatggca tgcattgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaaaactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttatat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgg gagagttcac 300
caatttgggg cttttgatat ctgggggcaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 346
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 346

```

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

```

<210> 347

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 347

ggattcatca tcagtagata tggc

24

<210> 348

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 348

```

Gly Phe Ile Ile Ser Arg Tyr Gly
 1           5

```

<210> 349

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 349

atatggtatg atggaagaaa taaa

24

<210> 350
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 350
 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 351
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 351
 gggagaggttc accaatttgg ggcttttgat atc 33

<210> 352
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 352
 Gly Arg Val His Gln Phe Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 353
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 353
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag caatatggta gggtcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggcaat caaa 324

<210> 354

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 354
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys
 100 105

<210> 355
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 355
 cagagtgtta gcagcagctt c

21

<210> 356
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 356
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe
 1 5

<210> 357
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 357

ggtgcatcc

9

<210> 358

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 358

Gly Ala Ser

1

<210> 359

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 359

cagcaatatg gtaggtcacc ttggacg

27

<210> 360

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 360

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 361

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 361

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tttccggtgg ctccatcaac aatggtgggc actactggac ctggatccgg 120
caacaccag ggaagggcct agaatggatt ggggtacattt attatattgg gaccacttat 180

tacaatccgt ccctcgagag tgcactttcc ctatcagtg acacgtctaa gaatcagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggcca ttattactg tgcgagaagc 300
 agtttatcag tgtctgaggc ttttgatgtc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 362
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 362
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Asn Gly
 20 25 30
 Gly His Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ile Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Ser Leu Ser Val Ser Glu Ala Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 363
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 363
 ggtggctcca tcaacaatgg tggtcactac 30

<210> 364
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 364
 Gly Gly Ser Ile Asn Asn Gly Gly His Tyr
 1 5 10

<210> 365
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 365
 atttattata ttgggaccac t

21

<210> 366
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 366
 Ile Tyr Tyr Ile Gly Thr Thr
 1 5

<210> 367
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 367
 gcgagaagca gtttatcagt gtctgaggct tttgatgtc

39

<210> 368
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 368
 Ala Arg Ser Ser Leu Ser Val Ser Glu Ala Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 369
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 369

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60
atcacttgcc gggggagtc gaacattggc agcttttttaa gttgggtatca acagagacca 120
gggaaggccc ctaaactcct aatctttggg gcatacaatt tgcaagggtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagat ttactctca ccatcagtag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttactt ctgtcagcag agttatagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

```

<210> 370

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 370

```

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

```

<210> 371

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 371

cagaacattg gcagcttt

18

<210> 372

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 372

Gln Asn Ile Gly Ser Phe
1 5

<210> 373

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 373

ggtgcatac

9

<210> 374

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 374

Gly Ala Tyr

1

<210> 375

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 375

cagcagagtt atagtacccc tccgatcacc

30

<210> 376

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 376

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

<210> 377
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 377
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaggc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc aatggtggtt actattggac ctggatccgc 120
 caaaacccag ggaagggcct agaatggatt ggatacatct attacattgg gaccacctac 180
 tacaacccgt ccctcgagag tcgactttcc ctatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tttattactg tgcgagaagc 300
 agtttagcag tgtctgaggc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca

<210> 378
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 378
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Asn Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ile Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Ser Leu Ala Val Ser Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 379
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 379

ggtggctcca tcagcaatgg tggttactat

30

<210> 380

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 380

Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Asn	Gly	Gly	Tyr	Tyr
1				5					10

<210> 381

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 381

atctattaca ttgggaccac c

21

<210> 382

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 382

Ile	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Thr	Thr
1				5		

<210> 383

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 383

gcgagaagca gtttagcagt gtctgaggct tttgatatc

39

<210> 384

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 384

Ala	Arg	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Glu	Ala	Phe	Asp	Ile
1				5						10		

<210> 385

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 385

gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggcga	cagattcacc	60
atcacttgcc	ggcgagtca	gagcattggc	agctttttaa	gttggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacaata	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

<210> 386

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 386

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Ser	Phe
			20					25					30		
Leu	Ser	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	Asn	Thr	Pro	Pro
			85					90						95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 387

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 387
cagagcattg gcagcttt

18

<210> 388
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 388
Gln Ser Ile Gly Ser Phe
1 5

<210> 389
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 389
gctgcatcc

9

<210> 390
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 390
Ala Ala Ser
1

<210> 391
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 391
caacagagtt acaataccccc tccgatcacc

30

<210> 392
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 392
 Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 393
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 393
 caggtgcagc tgggtgcaatc tgggactgag gtgaagaggc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
 tcctgcaagg cttctggatt caccttcacc ggctattata tatactgggt gcgacaggcc 120
 cctggagagg ggcttgagtg gatgggggtg atcaaccctc acagtgggtg cacaaaatac 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgtccatcaa tacagcctac 240
 ctggacctga tcagtctgcg atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagaatcggg 300
 ggtgggggct actcttccta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 394
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 394
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Asp Leu Ile Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile Gly Gly Gly Tyr Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 395
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 395
ggattcacct tcaccggcta ttat

24

<210> 396
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 396
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 397
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 397
atcaaccctc acagtgggtgg caca

24

<210> 398
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 398
Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 399
<211> 42

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 399
gcgagaatcg ggggtggggg ctactcttcc tactttgact ac 42

<210> 400
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 400
Ala Arg Ile Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 401
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 401
gacatccaac tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gactattagt acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaatgcc ctaaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagaggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctccaacct 240
gaagattttg ccacttacta ctgtcaacag ggttacacta ccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 402
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 402
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn 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												
Arg	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	Gly	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	
				85					90					95		
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105								

<210> 403
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 403
 cagactatta gtacctat

18

<210> 404
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 404
 Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 405
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 405
 gctgcatcc

9

<210> 406
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 406
 Ala Ala Ser

1

<210> 407
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 407
 caacaggggtt acactacccc tccgatcacc 30

<210> 408
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 408
 Gln Gln Gly Tyr Thr Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 409
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 409
 gaggtgcagc tggttgaatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagat attagtggta gtggtcttag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcgccatc tccagagaca attccaagaa catgttgtat 240
 ctgcaaataga acaggctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gaaagagccc 300
 tctcactgga acggtgaagc gtttgatatt tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 410
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 410
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 411
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 411
 ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 412
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 412
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 413
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 413
 attagtggta gtggtcttag caca

24

<210> 414
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 414
 Ile Ser Gly Ser Gly Leu Ser Thr
 1 5

<210> 415
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 415
 gcgaaagagc cctctcactg gaacggtgaa gcgtttgata tt 42

<210> 416
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 416
 Ala Lys Glu Pro Ser His Trp Asn Gly Glu Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 417
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 417
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc agttggttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatact acagccaatt tacaaagtgg ggtcccatcc 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggctct 300
 gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 418
 <211> 107
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 418

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

<210> 419

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 419

caggatatta gcagttgg

18

<210> 420

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 420

Gln	Asp	Ile	Ser	Ser	Trp
1				5	

<210> 421

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 421
actacagcc

9

<210> 422
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 422
Thr Thr Ala
1

<210> 423
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 423
caacaggcta acagtttccc attcact

27

<210> 424
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 424
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 425
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 425
cagctgcaac tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccttc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagt agtaattatt actactgggg ctgggtccgc 120
cagtccccgg ggaagggact ggagtggatc gggagtatct atcacactgg gaacgcctac 180
gacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc atttccgtag acacgtccaa gaatcagttc 240
tcctgaacc tgaactctgt gaccgccgca gacacggcta tttattattg tgcgagacat 300

catagcagtt cgtcctgggtg gtacttcgat gtctggggcc gtggcaccct ggtcattgtc 360
tcctca 366

<210> 426
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 426
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Phe Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Tyr Tyr Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr His Thr Gly Asn Ala Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg His His Ser Ser Ser Ser Trp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110
Gly Arg Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 427
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 427
ggtggctcca tcagtagtaa ttattactac 30

<210> 428
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 428
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Tyr Tyr
1 5 10

<210> 429
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 429
 atctatcaca ctgggaacgc c

21

<210> 430
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 430
 Ile Tyr His Thr Gly Asn Ala
 1 5

<210> 431
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 431
 gcgagacatc atagcagttc gtcctggtgg tacttcgatg tc

42

<210> 432
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 432
 Ala Arg His His Ser Ser Ser Ser Trp Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 433
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 433

```
gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gactgttagc aacagccact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggacc gacttctctc tcaccatcat cagactggag 240
cctgacgatt ttgcagtata tttctgtcag cagcatgaaa gttcacctcc cacttttggc 300
cagggggcca agctcgagat caaa 324
```

<210> 434

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 434

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

<210> 435

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 435

cagactgtta gcaacagcca c

21

<210> 436

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 436

Gln Thr Val Ser Asn Ser His
1 5

<210> 437

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 437

ggtacatcc

9

<210> 438

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 438

Gly Thr Ser
1

<210> 439

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 439

cagcagcatg aaagttcacc tcccact

27

<210> 440

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 440

Gln Gln His Glu Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 441

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 441
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggaat caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactc acatcatatg atggaagtaa aaaatactat 180
 tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagtctgag acctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagataaa 300
 gggggagacg actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 442
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 442
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Lys Gly Gly Asp Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 443
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 443
 ggaatcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 444
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 444
 Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 445
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 445
 acatcatatg atggaagtaa aaaa

24

<210> 446
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 446
 Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Lys
 1 5

<210> 447
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 447
 gcgaaagata aagggggaga cgactactac ggtatggacg tc

42

<210> 448
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 448

Ala Lys Asp Lys Gly Gly Asp Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 449

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 449

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gtggattagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgctttca gcagggcccc tggcatccca 180
ggcaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gttcaccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caat 324

<210> 450

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 450

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

<210> 451

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 451

cagtggatta gcagcagcta c

21

<210> 452

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 452

Gln Trp Ile Ser Ser Ser Tyr

1

5

<210> 453

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 453

ggtgctttc

9

<210> 454

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 454

Gly Ala Phe

1

<210> 455

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 455

cagcagtatg gtagttcacc gtacact

27

<210> 456

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 456
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 457
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 457
 caggttcaac tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgtaaga cttctgggta cacctttacc aacaatggta tcagctgggt gcgacaggtc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagccctt ataatggtaa tacaaagtat 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accacagaca catcgacgac tacagtctac 240
 atggacgtga ggagcctgag atctgacgac acggccgttt atttctgtgc gagagatggg 300
 cccattacga tctcctactt cggtatggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 458
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 458
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asn
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Val Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Pro Ile Thr Ile Ser Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 459
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 459
 ggttacacct ttaccaacaa tgggt

24

<210> 460
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 460
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Asn Gly
 1 5

<210> 461
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 461
 atcagccctt ataatggtaa taca

24

<210> 462
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 462
 Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 463
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 463

gcgagagatg ggcccattac gatctcctac ttcggtatgg acgtc

45

<210> 464

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 464

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

<210> 465

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 465

gacatccaga	tgacccagtc	tccgtcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagtattagc	acctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaaactcct	gatctatgct	gcatccactt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcggtg	gcagtggatc	tgggacagac	ttcactctca	ccgtcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taat				324

<210> 466

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 466

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	Thr	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	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Gly	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Val	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	Asn				
			100					105							

<210> 467
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 467
 cagagtatta gcacctat 18

<210> 468
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 468
 Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 469
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 469
 gctgcatcc 9

<210> 470
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 470
 Ala Ala Ser
 1

<210> 471
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 471
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 472
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 472
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 473
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 473
 caggtacaac tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccgtcaat agatatggca tacactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt acatggtatg atggaagaaa taaatacttt 180
 gccgactccg tgaagggccg attctccttc tccagagaca gttccacgaa cacgttgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gaggggggga 300
 ttgtttggat actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 474
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 474
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Asn Arg Tyr
 20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Thr Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ser Phe Ser Arg Asp Ser Ser Thr 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 Gly Leu Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 475
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 475
 ggattcacccg tcaatagata tggc

24

<210> 476
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 476
 Gly Phe Thr Val Asn Arg Tyr Gly
 1 5

<210> 477
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 477
 acatggatatg atggaagaaa taaa

24

<210> 478
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 478

Thr Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 479

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 479

gcgagggggg gattgtttgg atactttgac tac

33

<210> 480

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 480

Ala Arg Gly Gly Leu Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 481

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 481

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtggtgcc ggcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta cctcaccttg gacgttcggc 300
 caggggacca aggtggaaat caca 324

<210> 482

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 482

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

<210> 483

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 483

cagagtgttg ccggcagcta c

21

<210> 484

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 484

Gln	Ser	Val	Ala	Gly	Ser	Tyr
1				5		

<210> 485

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 485

ggtgcatcc

9

<210> 486
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 486
 Gly Ala Ser
 1

<210> 487
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 487
 cagcagtatg gtacctcacc ttggacg

27

<210> 488
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 488
 Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 489
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 489
 caggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tacactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg gtggaaataa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctttat atcactgtgc gagaagtggg 300
 aacttcggtg cttttgatat ctgggggcca gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 490

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 490
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Gly Gly Asn 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 Leu Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Asn Phe Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 491
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 491
 ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 492
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 492
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 493
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 493

atatggtatg gtggaaataa taaa

24

<210> 494

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 494

Ile Trp Tyr Gly Gly Asn Asn Lys

1

5

<210> 495

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 495

gcgagaagtg ggaacttcgg tgcttttgat atc

33

<210> 496

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 496

Ala Arg Ser Gly Asn Phe Gly Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 497

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 497

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

```

ctctcctgca gggccagtca gagtggttagc agctacttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccagca gggccactgg catcccagac 180
aggttcagtg gcagtggggtc tgggacagac ttcattctca ccatcaacag actgggagcct 240
gaagattttg cagtctatta ctgtcagcac tatggtaact caccttggac gttcgggcaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

```

<210> 498

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 498

```

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

```

<210> 499

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 499

cagagtgtta gcagctac

18

<210> 500

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 500

```

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1           5

```

<210> 501
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 501
 ggtgcatcc

9

<210> 502
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 502
 Gly Ala Ser
 1

<210> 503
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 503
 cagcactatg gtaactcacc ttggacg

27

<210> 504
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 504
 Gln His Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 505
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hCTLA-4 NP_005205.2

<400> 505

```

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1          5          10          15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
          20          25          30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
          35          40          45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
          50          55          60
Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65          70          75          80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
          85          90          95
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
          100          105          110
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
          115          120          125
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
          130          135          140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
          145          150          155          160
Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
          165          170          175
Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
          180          185          190
Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
          195          200          205
Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
          210          215          220

```

<210> 506

<211> 154

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hCTLA-4-mmH (axit amin K36-D161 của NP_005205.2 có đuôi myc-myc-hexahistidin ở đầu tận cùng C)

<400> 506

```

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

```

```

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
      85          90          95
Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
      100          105          110
Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Gln
      115          120          125
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser
      130          135          140
Glu Glu Asp Leu His His His His His His
145          150

```

<210> 507

<211> 154

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MfCTLA-4-mmH (axit amin K36-D161 của XP_005574071.1 có đuôi myc-myc-hexahistidin ở đầu tận cùng C)

<400> 507

```

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

```

<210> 508

<211> 359

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hCTLA-4-mFc

miền ngoại bào hCTLA-4 dime (axit amin K36-D161 của NP_005205.2) có miền Fcγ của chuột ở đầu tận cùng C (axit amin E98-K330 của P01863)

<400> 508

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
 20 25 30
 Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 35 40 45
 Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 50 55 60
 Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 85 90 95
 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 100 105 110
 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Glu Pro
 115 120 125
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
 130 135 140
 Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
 145 150 155 160
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
 180 185 190
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 210 215 220
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
 245 250 255
 Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 260 265 270
 Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 275 280 285
 Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 290 295 300
 Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 305 310 315 320
 Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 325 330 335
 Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 340 345 350
 Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 355

<210> 509

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> R4659: HC

<400> 509

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 Asn Tyr
 20 25 30
 Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Arg Thr Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
 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 Gly Gly Gly Thr Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

```
<210> 510
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> R4659: LC

139