



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

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



1-0027465

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 35/00; C12N 15/13; (13) B
C07K 16/46; A61K 39/395; C07K
14/705

-
- (21) 1-2016-00304 (22) 26/02/2014
(86) PCT/CN2014/072574 26/02/2014 (87) WO2014/206107 31/12/2014
(30) 201310258289.2 26/06/2013 CN
(45) 25/02/2021 395 (43) 25/05/2016 338A
(73) 1. SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES INC. (CN)
Room 602, 781 Cailun Road, Zhangjiang Hi-Tech Park Shanghai 201203, China
2. JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD. (CN)
No. 2358 Chang'an Rd, Wujiang Economic-Technological Development Zone,
Suzhou, Jiangsu 215200, China
(72) CHEN, Bo (CN).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG HOẶC MẢNH CHỨC NĂNG CỦA NÓ GẮN KẾT
VỚI PROTEIN GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH 1 (PD-1) VÀ
PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC PHÂN TÁCH ĐƯỢC

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết một cách đặc hiệu với PD-1 với ái lực cao hoặc mảnh chức năng của nó. Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể của sáng chế hoặc mảnh chức năng của nó, vật truyền biểu hiện và tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể của sáng chế hoặc mảnh chức năng của nó, và phương pháp tạo ra kháng thể của sáng chế hoặc mảnh chức năng của nó. Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch và được phẩm chứa kháng thể của sáng chế hoặc mảnh chức năng của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y sinh học và đề cập đến (các) kháng thể gắn kết một cách đặc hiệu với PD-1 hoặc (các) mảnh chức năng của nó với ái lực cao. Sáng chế cũng đề cập đến (các) phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế, (các) vật truyền biểu hiện và (các) tế bào vật chủ để biểu hiện kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế, cũng như (các) phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến (các) thể tiếp hợp miễn dịch và (các) dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự chết tế bào theo lập trình 1, PD-1 là thành viên của họ CD28 và thụ thể ngăn chặn miễn dịch được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T và tế bào B được hoạt hoá (Yao, Zhu et al. Các tiến bộ trong việc tạo đích phân tử tín hiệu bề mặt tế bào để điều biến miễn dịch. *Nat Rev Drug Discov*, 2013,12(2): 130-146). Thụ thể này có thể gắn kết với các phối tử của nó PD-L1 và PD-L2 để làm giảm một cách hữu hiệu đáp ứng miễn dịch có liên quan bởi tế bào T miễn dịch. Tế bào khối u thoát ra khỏi sự giám sát miễn dịch bên trong cơ thể qua sự biểu hiện ở mức cao của PD-L1 (Okazaki và Honjo, các phối tử PD-1 và PD-L1: dựa trên sự phát hiện đối với áp dụng lâm sàng. *International Immunology*, 2007, 19(7): 813-824 2007). Sự tương tác giữa PD1 và PD-L1 có thể được phong bế để cải thiện một cách rõ ràng hoạt tính của tế bào T độc tế bào CD8+ để giết tế bào khối u.

Các PD-1 chủ yếu được biểu hiện ở bề mặt của tế bào CD4+ T, tế bào CD8+ T, tế bào NKT, tế bào B và các bạch cầu đơn nhân được hoạt hoá. Sự biểu hiện của nó chủ yếu do các tín hiệu của thụ thể tế bào T (TCR) hoặc thụ thể tế bào B gây ra (BCR). TNF có thể làm tăng sự biểu hiện của PD-1 trên các bề mặt của các tế bào này (Francisco, Sage et al., Con đường PD-1 trong sự dung nạp và tự miễn dịch.

Immunol Rev, 2010, 236: 219-242). PD-1 của người được mã hoá bởi gen *Pdcd1* mà được định vị ở 2q37.3 với tổng chiều dài bằng 9,6kb. Nó bao gồm năm exon và bốn intron và ngược dòng của nó bao gồm đoạn khởi đầu 663bp. Cấu trúc phân tử của PD-1 bao gồm vùng ngoại bào, vùng chuyển qua màng và vùng nội bào. (Các) trình tự axit amin trong vùng ngoại bào có 24% tương đồng với CTLA-4 và 28% tương đồng với CD28. Gen của nó chủ yếu có bảy vị trí đa hình nucleotit đơn lẻ. Vùng ngoại bào bao gồm một miền cấu trúc của IgV biến đổi globulin miễn dịch. Vùng nội bào bao gồm hai motif truyền tín hiệu dựa trên tyrosin - ITIM (motif ức chế dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch) và ITSM (motif chuyển hoá dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch). Sau khi tế bào T được hoạt hoá, PD-1 sẽ tập hợp tyrosin phosphatase SHP2 chủ yếu qua ITSM motif để dẫn đến sự phosphoryl hoá khử của các phân tử tác quan bao gồm CD3 ζ , PKC θ và ZAP70, v.v..

Có hai phối tử PD-1: PD-L1 và PD-L2. PD-L1 cũng được gọi là B7H1 hoặc CD274 và PD-L2 được gọi là B7DC hoặc CD273. Gen PD-L được định vị ở locut của 9p24.2 của nhiễm sắc thể của người có kích cỡ bằng 42kb. Các phối tử này có khoảng từ 21 đến 27% tương đồng trong trình tự axit amin và tính tương tự cấu trúc với B7-1, B7-2 và ICOSL: tất cả bao gồm một miền cấu trúc của vùng biến đổi tương tự globulin miễn dịch, một miền cấu trúc tương tự vùng cố định, một vùng chuyển qua màng và một đuôi tế bào chất ngắn. Đuôi tế bào chất của PD-L1 là bảo tồn nhiều hơn so với đuôi của PD-L2. PD-L1 và PD-L2 được biểu hiện trên các quần thể tế bào khác nhau (Shimauchi, Kabashima et al., Sự biểu hiện tăng của sự chết theo lập trình-1 trong tế bào CD4⁺ T hình thành khối u và không hình thành khối u ở bệnh bạch cầu/ung thư hạch bạch huyết tế bào T trưởng thành. *Int J Cancer*, 2007, 121(12): 2585-2590). Và các tế bào này bao gồm mô không tạo máu và nhiều loại khối u. PD-L1 chủ yếu được biểu hiện ở tế bào T, tế bào B, tế bào hình cây, đại thực bào, tế bào thân trung mô và tế bào không thu được từ tủy xương. PD-L1 cũng được biểu hiện trên tế bào không thu được từ tủy xương, như tế bào nội mô mạch, tế bào biểu mô, tế bào cơ xương, tế bào gan, tế bào biểu mô ống thận, tế bào đảo tụy, tế bào hình sao não và các loại khối u không lympho khác nhau như khối u ác tính, ung thư gan, bệnh ung thư dạ dày, ung thư biểu mô tế bào thận, cũng như được biểu hiện trên tế bào ở các vị trí đặc quyền về mặt miễn dịch như nhau thai, mắt. Các tác

giả sáng chế đã gợi ý rằng PD-L1 có thể kéo dài đến mức độ nhất định trong việc điều hoà tế bào T, tế bào B tự phản ứng và dung nạp miễn dịch và có thể đóng vai trò trong việc đáp ứng với tế bào T và tế bào B mô ngoại vi. Tuy nhiên, PD-L2 có vùng biểu hiện rất bị giới hạn và chỉ tồn tại trong đại thực bào và tế bào hình cây. Các tác giả sáng chế đã cho rằng nó đóng vai trò chủ yếu trong phép biểu diễn miễn dịch.

PD-1 và PD-L1 tương tác với nhau để điều hoà và kiểm soát sự hoạt hoá của tế bào T, mà đã được xác nhận nhiều trong khối u và các lây nhiễm virus. PD-L1 được biểu diễn trên bề mặt của các tế bào khối u khác nhau mà bao gồm bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư da, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, u thần kinh đệm, ung thư biểu mô thận, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, ung thư tế bào hình vảy miệng, bệnh ung thư đầu/cổ. Ngoài ra, có lượng lớn tế bào CD8⁺ T biểu hiện PD-L1 được tìm thấy xung quanh các bệnh ung thư này. Các thống kê lâm sàng cho biết rằng: mức biểu hiện cao của PD-L1 đối với tế bào ung thư có liên quan đến sự tiên lượng kém của người bệnh mắc bệnh ung thư (Okazaki và Honjo 2007. Ditto).

Nhiều virus mạn tính và cấp tính cũng thoát khỏi sự giám sát miễn dịch của cơ thể qua các tín hiệu PD-1 và PD-L1. Ví dụ, mức biểu hiện của PD-1 ở người bệnh bị nhiễm HIV có liên quan chặt chẽ đến mức loại hết tế bào T và có thể được sử dụng như một trong số các chỉ thị của sự tiến triển AIDS (Trabattoni, Saresella et al., B7-H1 được điều hoà tăng trong lây nhiễm HIV và là chỉ thị thay thế mới của sự tiến triển bệnh. *Blood*, 2003, 101(7): 2514-2520). Nó là cùng trường hợp đối với người bệnh mắc bệnh viêm gan B mạn tính (Evans, Riva et al., Sự biểu hiện chết được lập trình 1 trong thời gian điều trị kháng virus của bệnh viêm gan B mạn tính: Tác động của sự chuyển hoá huyết thanh kháng nguyên e viêm gan B, *Hepatology*, 2008, 48(3): 759-769). Các thử nghiệm động vật cho biết rằng chuột mà gen PD-1 của nó được làm bất hoạt có thể kiểm soát sự lây nhiễm virus tốt hơn so với chuột thông thường; và bệnh viêm gan có thể bị gây ra nếu tế bào T đặc hiệu HBV được truyền vào trong động vật chuyển gen HBV.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến (các) kháng thể kháng PD-1 và (các) mảnh chức năng của nó mà có thể gắn kết với sự chết tế bào theo lập trình 1 (PD-1).

Một mặt, kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế bao gồm CDR chuỗi nặng được chọn từ trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15 hoặc biến thể bất kỳ của trình tự này, và/hoặc CDR chuỗi nhẹ được chọn từ trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18 hoặc biến thể bất kỳ của trình tự này.

Theo một số phương án được ưu tiên, trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó được chọn từ bất kỳ trong số các nhóm sau đây gồm các trình tự axit amin khác nhau hoặc các biến thể của chúng:

và/hoặc trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 chuỗi nhẹ của nó được chọn từ bất kỳ trong số các nhóm sau đây gồm các trình tự axit amin khác nhau hoặc các biến thể của chúng.

Theo một số phương án được ưu tiên, trình tự axit amin của CDR1, CDR2 và CDR3 chuỗi nặng cũng như CDR1, CDR2 và CDR3 chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh chức năng theo sáng chế được chọn từ bất kỳ trong số các nhóm sau đây gồm các trình tự axit amin khác nhau hoặc các biến thể của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế bao gồm (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ trình tự axit amin SEQ ID NO: 19, 21, 23 hoặc biến thể bất kỳ của trình tự này, và/hoặc (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, 22, 24 hoặc biến thể bất kỳ của trình tự này.

Theo một phương án được ưu tiên, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 19 hoặc biến thể của nó và chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 20 hoặc biến thể của nó.

Theo phương án được ưu tiên khác, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là

SEQ ID NO: 21 hoặc biến thể của nó và (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 22 hoặc biến thể của nó.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 23 hoặc biến thể của nó và (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 24 hoặc biến thể của nó.

Kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế có thể là kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể hoàn toàn của người.

Kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế có thể được làm giống người. (Các) phương pháp tạo ra kháng thể được làm giống người là thường được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, trình tự CDR theo sáng chế có thể được truyền vào trong vùng biến đổi của kháng thể của người để tạo ra kháng thể kháng PD-1 được làm giống người của sáng chế. Kháng thể được làm giống người sẽ không tạo ra đáp ứng kháng kháng thể (AAR) và đáp ứng kháng thể của người kháng chuột (HAMA) và sẽ không được loại bỏ một cách nhanh chóng do sự trung hoà bởi kháng kháng thể và sẽ đóng vai trò tác dụng miễn dịch như tác dụng ADCC và CDC.

Theo một số phương án được ưu tiên, (các) kháng thể PD-1 được làm giống người hoặc (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế bao gồm (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ trình tự axit amin SEQ ID NO: 33, 35, 36 hoặc biến thể bất kỳ của trình tự này, và / hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NO: 34, 37 hoặc biến thể bất kỳ của trình tự này.

Theo một phương án được ưu tiên của (các) kháng thể được làm giống người hoặc (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 33 hoặc biến thể của nó và (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 34 hoặc biến thể của nó.

Theo phương án được ưu tiên khác của (các) kháng thể được làm giống người hoặc (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 35 hoặc biến thể của nó và (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 34 hoặc biến thể của nó.

Theo phương án được ưu tiên khác của (các) kháng thể được làm giống người hoặc (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 36 hoặc biến thể của nó và (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 34 hoặc biến thể của nó.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa của (các) kháng thể được làm giống người hoặc (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế, (các) vùng biến đổi của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 35 hoặc biến thể của nó và (các) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 37 hoặc biến thể của nó.

Sáng chế cũng đề xuất (các) phân tử axit nucleic phân tách được mã hoá kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế. Theo một phương án được ưu tiên, (các) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: từ 25 đến 30, từ 38 đến 42 hoặc tổ hợp của chúng.

Sáng chế cũng đề xuất (các) vật truyền biểu hiện bao gồm (các) phân tử axit nucleic cũng như (các) tế bào vật chủ bao gồm (các) vật truyền biểu hiện.

Sáng chế đề xuất (các) phương pháp tạo ra (các) kháng thể kháng PD-1 hoặc (các) mảnh chức năng của nó, phương pháp này bao gồm bước: nuôi cấy (các) tế bào vật chủ theo sáng chế trong điều kiện cho phép nó tạo ra kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó, cũng như thu gom kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó được tạo ra theo cách này.

Mặt khác, sáng chế đề cập đến (các) thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc mảnh chức năng theo sáng chế mà được kết hợp với (các) chất điều trị. (Các) chất điều trị tốt hơn là độc tố, đồng vị phóng xạ, dược chất hoặc chất gây độc tế bào.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh chức năng theo sáng chế cũng như (các) chất mang dùng trong dược phẩm.

Mặt khác, sáng chế đề xuất (các) phương pháp được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh thông qua việc loại bỏ, ức chế hoặc làm giảm hoạt tính của PD-1, phương pháp bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị này dùng liệu điều trị hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng

chế, axit nucleic, vật truyền biểu hiện, tế bào vật chủ, thể tiếp hợp miễn dịch hoặc được phẩm, trong đó: bệnh hoặc tình trạng bệnh được chọn từ các bệnh ung thư, các bệnh lây nhiễm hoặc các bệnh viêm, các bệnh ung thư này tốt hơn là được chọn từ khối u ác tính, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, khối u ác tính ở da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư ống dẫn trứng, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư âm đạo, bệnh ung thư âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư hạch bạch huyết không Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, xacôm mô mềm, bệnh ung thư đường niệu, bệnh ung thư dương vật, bệnh bạch cầu mạn tính hoặc cấp tính mà bao gồm bệnh bạch cầu tuỷ cấp tính, bệnh bạch cầu tuỷ mạn tính, bệnh bạch cầu nguyên bào bạch huyết cấp tính, bệnh bạch cầu tế bào bạch huyết mạn tính, khối u rắn trong thời kỳ thơ ấu, ung thư hạch bạch huyết tế bào bạch huyết, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, bệnh ung thư khung chậu thận, sùi hệ thần kinh trung ương, ung thư hạch bạch huyết hệ thần kinh trung ương sơ cấp, sự hình thành mạch khối u, khối u trực tuỷ sống, u thần kinh đệm thân não, u tuyến yên, xacôm Kaposi, ung thư biểu mô biểu bì, ung thư tế bào hình vảy, ung thư hạch bạch huyết tế bào T, các bệnh ung thư do môi trường gây ra mà bao gồm các bệnh ung thư do amiăng gây ra và tổ hợp của các bệnh ung thư này, các bệnh lây nhiễm tốt hơn là được chọn từ HIV, bệnh cúm, bệnh mụn giộp, bệnh nhiễm khuẩn giardia, bệnh sốt rét, bệnh do nhiễm leishmania gây ra, các lây nhiễm mầm bệnh do các virus sau đây gây ra: virus viêm gan (viêm gan A, B và C), virus gây bệnh mụn giộp (như VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, và CMV, Epstein Barr virus), adenovirus, virus cúm, flavivirus, echovirus, rhinovirus, coxsackie virus, coronaviruses, virus hỗn bào hô hấp, virus quai bị, rotavirus, virus sởi, virus rubella, parvovirus, virus gây bệnh đậu mùa, HTLV virus, virus sốt xuất huyết, virus u nhú, virus u mềm, virus bại liệt, virus bệnh dại, JC virus và virus viêm não do arbovirus, các lây nhiễm mầm bệnh do các vi khuẩn sau đây

gây ra: chlamydia, trùng rận, vi khuẩn lao, tụ cầu khuẩn, khuẩn liên cầu, khuẩn cầu phổi, khuẩn cầu màng não và conococci, klebsiella, amip, serratia, pseudomonas, bệnh bạch hầu, bệnh bạch hầu, salmonella, bệnh lao, bệnh dịch tả, bệnh uốn ván, chứng ngộ độc thịt, bệnh than, bệnh dịch, bệnh trùng xoắn và vi khuẩn gây bệnh Lyme, các lây nhiễm nấm bệnh do các nấm sau đây gây ra: Candida (Candida albicans, Candida krusei, Candida glabrata, Candida tropicalis, v.v), Cryptococcus neoformans, aspergillus (fumigatus, aspergillus niger, v.v), chi Mucor (mucor, absidia, rhizopus), sporothrix schenckii, chồi nấm men gây bệnh viêm da, paracoccidioides brasiliensis, coccidioides immitis và histoplasma capsulatum, các lây nhiễm mầm bệnh do các ký sinh trùng sau đây gây ra: entamoeba histolytica, balantidium ruột kết, giun fernando, gai amip, Giardia thổi mút, cryptosporidium, pneumocystis carinii, P. vivax, voles Babesia, trypanosoma brucei, cruz trypanosoma, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii và Nippostrongylus brasiliensis, các bệnh viêm tủy hơn là được chọn từ bệnh viêm não và dây cột sống xơ cứng lan toả cấp tính, bệnh Addison, viêm cứng khớp đốt sống, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, chứng thiếu máu tan huyết tự miễn dịch, viêm gan tự miễn dịch, chứng viêm khớp, bệnh Behcet, chứng đau ban ngày bóng nước bóng rộp, bệnh tiêu chảy phân mỡ, bệnh Chagas, bệnh Crohn, bệnh viêm bì cơ, bệnh sỏi thận đường typ 1, chứng xuất huyết phổi - hội chứng thận, bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, bệnh Graves, hội chứng Guillain - Barre, bệnh Hashimoto, hội chứng globulin E miễn dịch quá mức, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, luput ban đỏ, đa xơ cứng, bệnh nhược cơ, bệnh pemphigut, bệnh thiếu máu nguy hại, viêm đa cơ, bệnh viêm gan mật xơ cấp, bệnh vẩy nến, chứng viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren, bệnh viêm động mạch thái dương, bệnh viêm mạch và bệnh u hạt Wegener.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo sáng chế, axit nucleic, vật truyền biểu hiện, tế bào vật chủ, thể tiếp hợp miễn dịch hoặc được phẩm trong bào chế được chất để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kích cỡ protein của vùng cấu trúc ngoại bào của PD-1 có nguồn gốc từ người (hu) và khỉ đuôi dài (Macaca fascicularis) (cyno) như được biểu

thị bởi SDS-PAGE.

Fig.2 thể hiện tổ hợp của rh-PD-L1 đánh dấu biotin và tế bào T của người được đo bằng phép đo dòng tế bào.

Fig.3 thể hiện rằng PD-L1 đối chứng, dòng 1, 10, 11, 55 và 64 phong bế tổ hợp giữa PD-1 trên bề mặt tế bào với phối tử PD-L1 như được đo bằng phép đo dòng tế bào.

Fig.4 thể hiện tổ hợp của kháng thể đối chứng, dòng 1, 10, 11, 55 và 64 với PD-1 cũng như các thành viên của họ CD28 khác (ICOS, CTLA-4 và CD28).

Fig.5 thể hiện thử nghiệm kích thích độc tố bệnh uốn ván để đo sự kích thích *in vitro* của kháng thể kháng đối với tế bào T.

Fig.6 thể hiện mức tiết của IL2 bởi các dòng 38, 39, 41 và 48 ((conIgG4) đối chứng) của kháng thể được làm giống người được đo bằng kit thử nghiệm CD8+ xytokin.

Fig.7 thể hiện trị số huỳnh quang GFP thu được sau khi tế bào hình cây và tế bào MD-MAB-453 cải biến được nuôi cấy cùng với nhau trong 3 ngày và sau đó bổ sung với tế bào T chiết và đơn dòng 38, 39, 41 và 48 ((conIgG4) đối chứng) của kháng thể kháng PD-1 được làm giống người theo sáng chế để nuôi cấy cùng với nhau trong 3 ngày.

Fig.8 thể hiện tổ hợp giữa kháng thể được làm giống người theo sáng chế với protein PD-1 có nguồn gốc từ người, khi đuôi dài và chuột.

Fig.9 thể hiện phép so sánh giữa các trình tự PD-1 của người, khi đuôi dài (Cyno) và chuột, trong đó: các diện tích khác nhau chính giữa protein PD-1 của chuột và protein PD-1 của người/ khi đuôi dài được đánh dấu bằng hộp.

Fig.10 thể hiện kết quả thử nghiệm của sự tăng sinh tế bào T được kích thích *in vitro* bởi kháng thể được làm giống người - thử nghiệm đáp ứng nhớ kháng nguyên uốn ván.

Fig.11 thể hiện kết quả thử nghiệm của sự tăng sinh tế bào T được kích thích *in vitro* bởi kháng thể được làm giống người - thử nghiệm đáp ứng nhớ kháng

nguyên polypeptit virut.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ phi được xác định khác, tất cả các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa có thể hiểu được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như đối với các định nghĩa và thuật ngữ trong lĩnh vực này, người có hiểu biết trung bình có thể đề cập một cách cụ thể đến các quy trình hiện tại trong sinh học phân tử (Ausubel). Sự viết tắt của các gốc axit amin dùng dạng mã tiêu chuẩn 3 chữ cái và/hoặc 1 chữ cái được sử dụng trong lĩnh vực đối với mỗi trong số 20 axit L-amin thường được sử dụng.

Sáng chế đề xuất (các) kháng thể kháng PD-1 và (các) mảnh chức năng của nó, mà có thể gắn kết với sự chết tế bào theo lập trình 1 (PD-1). (Các) kháng thể và (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế có ít nhất một trong số các dấu hiệu sau đây: có thể phong bế sự tương tác giữa PD-1 và PD-L1 qua ái lực cao hoặc có thể gắn kết với PD-1 với tính đặc hiệu cao nhưng không gắn kết với các thành viên của họ CD28 khác (như ICOS, CTLA-4 và CD28), hoặc hoạt hoá tế bào T đặc hiệu khối u để giết tế bào khối u và thúc đẩy CD8+ đi vào mô của khối u rắn để làm tăng hàm lượng lớn nhất của tác quan miễn dịch như IFN γ .

Sáng chế cũng đề xuất (các) kháng thể kháng PD-1 được làm giống người và (các) mảnh chức năng của nó. (Các) kháng thể được làm giống người này thu được bằng mô hình mô phỏng máy tính của kháng thể có nguồn gốc từ chuột được tạo ra bởi chuột được gây miễn dịch trong tổ hợp với kỹ thuật thể hiện thể thực khuẩn. Epitop gắn kết của nó cũng được nhận dạng một cách tương ứng dựa trên các đặc điểm gắn kết của nó với protein PD-1 của các loài khác nhau. Ngoại trừ các đặc điểm có lợi của (các) kháng thể kháng PD-1 và (các) mảnh chức năng của nó được mô tả trên đây, (các) kháng thể kháng PD-1 được làm giống người và (các) mảnh chức năng của nó theo sáng chế cũng gắn kết với protein PD-1 của người hoặc khi đuôi dài qua ái lực cao, nhưng không tương tác với protein PD-1 có nguồn gốc từ chuột.

Đối với giả thuyết về hầu như không tác động đến hoạt tính của kháng thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thay thế, bổ sung

và/hoặc loại bỏ một hoặc nhiều (như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 hoặc 10 hoặc nhiều hơn) axit amin của trình tự theo sáng chế để tạo ra (các) biến thể của trình tự của kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó. Chúng dường như tất cả được bao gồm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ví dụ, (các) axit amin trong vùng biến đổi có thể được thay thế bằng axit amin có đặc tính tương tự. Trình tự của biến thể này theo sáng chế có thể có sự giống nhau ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nguồn của nó. Sự giống nhau trình tự này được mô tả trong sáng chế có thể được đo bằng phần mềm phân tích trình tự, ví dụ, chương trình máy tính BLAST bằng cách sử dụng tham số mặc định, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN.

Kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc chỉ bao gồm phần gắn kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv) hoặc được cải biến để tác động đến chức năng. Sáng chế bao gồm (các) kháng thể kháng PD-1 bao gồm mẫu glycosyl hoá cải biến. Trong một vài ứng dụng, nó là hữu ích để thực hiện việc cải biến để loại bỏ (các) vị trí glycosyl hoá không mong muốn hoặc ngăn ngừa phân fucoza trên chuỗi oligosacarit để, ví dụ, làm tăng cường kháng thể có chức năng độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Trong một vài ứng dụng khác, việc cải biến galactosyl hoá có thể được thực hiện để làm thay đổi tính độc tế bào phụ thuộc phân bù (CDC).

Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này - "mảnh chức năng" đề cập đến đặc biệt là (các) mảnh kháng thể như Fv, scFv (sc đề cập đến sợi đơn), Fab, F(ab')₂, Fab', mảnh scFv-Fc hoặc diabody, hoặc mảnh bất kỳ mà chu kỳ nửa phân rã của chúng sẽ được tăng đến mức có thể thực hiện bằng các phương tiện cải biến hoá học hoặc hợp nhất vào trong liposom, cải biến hoá học này là, ví dụ, bổ sung polyalkylen glycol như polyetylen glycol ("pegyl hoá, PEGyl hoá") (được dùng để chỉ mảnh được pegyl hoá như Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG hoặc Fab'-PEG) ("PEG" là polyalkylen glycol) và mảnh này có hoạt tính gắn kết EGFR. Tốt hơn là, (các) mảnh chức năng bao gồm trình tự một phần của chuỗi biến đổi nặng hoặc nhẹ của (các) kháng thể nguồn của chúng. Trình tự một phần này là thích hợp để duy trì tính đặc hiệu gắn kết và ái lực đủ giống như kháng thể nguồn của nó. Như đối với PD-1, ái lực tốt hơn là ít nhất 1/100 kháng thể nguồn của nó và tốt hơn nữa là ít nhất 1/10. Loại (các) mảnh chức năng bao gồm ít nhất 5 axit amin và tốt

hơn là 10, 15, 25, 50 và 100 axit amin liên tiếp của trình tự kháng thể nguồn của nó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo dòng (các) phân tử ADN mã hoá kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế thành vật truyền và sau đó biến nạp vào tế bào vật chủ. Theo cách này, sáng chế cũng đề xuất loại vật truyền ADN tái tổ hợp, mà bao gồm (các) phân tử ADN mã hoá (các) kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế.

Tốt hơn là, vật truyền ADN tái tổ hợp là loại vật truyền biểu hiện. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo dòng (các) phân tử ADN của kháng thể thành vật truyền biểu hiện và biến nạp nó vào trong tế bào vật chủ để thu được kháng thể bằng các phương tiện biểu hiện cảm ứng. Vật truyền biểu hiện theo sáng chế bao gồm (các) trình tự ADN mã hoá của vùng biến đổi của chuỗi nặng, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc vùng cố định của (các) kháng thể kháng PD-1. Tuy nhiên, hai loại vật truyền biểu hiện cũng có thể được cấu trúc một cách riêng biệt. Một loại bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng cố định và loại còn lại bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng cố định. Chúng lây truyền cùng với động vật có vú. Theo một phương án được ưu tiên, vật truyền biểu hiện còn bao gồm đoạn khởi đầu và (các) trình tự ADN mã hoá peptit tín hiệu tiết cũng như ít nhất một loại gen kháng được chất được sử dụng để sàng lọc.

(Các) tế bào vật chủ theo sáng chế có thể là tế bào vật chủ nhân sơ, tế bào vật chủ có nhân chuẩn hoặc thể thực khuẩn. Tế bào vật chủ nhân sơ có thể là *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* hoặc *amip mirabilis*, v.v. Tế bào vật chủ có nhân chuẩn có thể là nấm như *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, nấm men phân đôi và *Trichoderma*, tế bào côn trùng như *Spodoptera frugiperda*, tế bào thực vật như thuốc lá, tế bào động vật có vú như tế bào BHK, tế bào CHO, COS và tế bào u tủy. Theo một số phương án, tế bào vật chủ theo sáng chế tốt hơn là tế bào động vật có vú, tốt hơn nữa là tế bào BHK, tế bào CHO, tế bào NSO hoặc tế bào COS.

Thuật ngữ "dược phẩm" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến tổ hợp của ít nhất một loại dược chất và chất mang dùng trong dược phẩm được lựa chọn một cách ngẫu nhiên hoặc tá dược đối với mục đích cụ thể. Theo một số phương án,

(các) dược phẩm bao gồm các tổ hợp, mà được tách biệt về thời gian và/hoặc không gian với điều kiện rằng chúng có thể thực hiện chức năng một cách hiệp đồng để thực hiện mục đích của sáng chế. Ví dụ, các thành phần được chứa trong dược phẩm (ví dụ, kháng thể, phân tử axit nucleic, tổ hợp và/hoặc thể tiếp hợp của phân tử axit nucleic) có thể được dùng cho đối tượng như là toàn bộ hoặc riêng biệt. Trong trường hợp mà các thành phần được chứa trong dược phẩm được dùng theo cách riêng biệt cho đối tượng, chúng có thể được sử dụng theo cách đồng thời hoặc lần lượt. Tốt hơn là, (các) chất mang dùng trong dược phẩm là nước, dung dịch đệm trong nước, dung dịch nước muối đẳng trương như PBS (chất đệm phosphat), glucoza, manitol, dextroza, lactoza, tinh bột, magie stearat, xenluloza, magie carbonat, 0,3% glyxerol, axit hyaluronic, etanol hoặc polyalkylen glycol như polypropylen glycol, triglyxerit và các chất khác. Loại chất mang dùng trong dược phẩm được sử dụng phụ thuộc vào nếu dược phẩm theo sáng chế được bào chế sẽ được dùng qua đường miệng, trong mũi, trong da, dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch. Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm (các) chất làm ướt, (các) chất nhũ tương hoặc (các) dung dịch đệm làm chất phụ gia.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường thích hợp bất kỳ, ví dụ đường miệng, trong mũi, trong da, dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch.

Theo một khía cạnh thích hợp, sáng chế đề xuất dược phẩm được tổ hợp bởi kháng thể kháng PD-1 và chất điều trị thứ hai. Theo một phương án, chất điều trị thứ hai là chất bất kỳ có lợi để tổ hợp với kháng thể kháng PD-1. Ví dụ về chất có lợi để tổ hợp với kháng thể kháng PD-1 bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các chất khác ức chế hoạt tính của PD-1 (bao gồm (các) mảnh, chất ức chế peptit, chất đối kháng phân tử nhỏ, v.v, gắn kết với (các) kháng thể hoặc (các) kháng nguyên khác) và/hoặc các chất cản trở việc truyền tín hiệu ngược dòng hoặc xuôi dòng của PD-1.

Các thuật ngữ "ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh thông qua việc loại bỏ, ức chế hoặc làm giảm hoạt tính của PD-1" nhằm mục đích chỉ định bệnh hoặc tình trạng bệnh do sự biểu hiện của PD-1 gây ra hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh với các triệu chứng/dấu hiệu của sự biểu hiện PD-1. Theo một số

phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh được chọn từ các bệnh ung thư hoặc các bệnh lây nhiễm. Các bệnh ung thư này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư da, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, glioma, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thực quản, ung thư biểu mô tế bào hình vảy của miệng, bệnh ung thư đầu/cổ. Các bệnh lây nhiễm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở lây nhiễm HIV và lây nhiễm virus viêm gan B.

Thuật ngữ "liều điều trị hữu hiệu" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến liều đủ để thể hiện lợi ích cho đích áp dụng. Liều được dùng trong thực tế, tỷ lệ dùng và khoảng thời gian dùng có thể phụ thuộc vào các tình trạng bệnh và mức trầm trọng của đích để điều trị. Đơn thuốc điều trị (ví dụ, việc xác định liều) là trách nhiệm của bác sĩ đa khoa và các bác sĩ khác và được quyết định bởi những người này. Thông thường, các yếu tố như bệnh sẽ điều trị, tình trạng bệnh của người riêng rẽ, vị trí dùng, phương pháp dùng và các yếu tố khác đã biết bởi bác sĩ là được xét đến.

Thuật ngữ "đối tượng" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến động vật có vú như người hoặc các động vật khác, ví dụ, động vật hoang dại (diệc, cò, sếu, v.v), vật nuôi (vịt, ngỗng, v.v) hoặc động vật phòng thí nghiệm (đười ươi, khỉ, chuột đồng, chuột nhà, thỏ và chuột lang, v.v).

Các phương án sau đây được đề xuất để chứng minh và giải thích hơn nữa một vài dạng thực thi được ưu tiên và các yếu tố theo sáng chế. Tuy nhiên, chúng không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo dòng vùng cấu trúc ngoại bào PD1 của người vào trong plasmit biểu hiện sinh vật nhân chuẩn

Chiết tổng ARN từ tế bào máu ngoại vi của người (Beijing Red Cross Blood Center) bằng kit chiết Trizol ARN (Invitrogen) và thu được ADN bổ trợ với kit phiên mã ngược bởi Invitrogen. Với ADN bổ trợ này làm khuôn mẫu, đoạn mã ngược là 5'-GTACGCTAGCCACCATGCAGATCCCCACAGGC-3 (SEQ ID NO.31)

và đoạn mỗi thuận là 5'-GATCCTCGAGCCACCAGGGTTTGGAACTG-3 (SEQ ID NO.32), khuếch đại mảnh ngoại bào PD1 bằng PCR. Sau đó, tiêu hoá sản phẩm được khuếch đại bằng Nhe I và Xho I, chúng được tạo dòng thành hệ plasmit biểu hiện sinh vật nhân chuẩn pCDNA3.1. Lây truyền tế bào 293T (ATCC) với plasmit này trong 3 ngày, sau đó gom và nuôi cấy dịch nổi để tinh chế h-PD1. Theo cách tương tự, các tác giả sàng chế cũng chiết tổng ARN từ tế bào máu ngoại vi của khỉ đuôi dài và tạo dòng ADN bổ trợ được tạo ra vào trong hệ biểu hiện sinh vật nhân chuẩn.

Như được thể hiện trên Fig.1, do lý do cải biến như glycosyl hoá, kích cỡ protein của các vùng cấu trúc ngoại bào PD-1 của PD-1 có nguồn gốc từ người (hu) và thu được từ khỉ đuôi dài bằng khoảng 50K Dalton sau khi nhuộm xanh phổ.

Ví dụ 2: Thử nghiệm tổ hợp của PD-1 đối với tế bào và phối tử PD-L1

1. Tách biệt tế bào T với tế bào máu ngoại vi của người

Khi huyền phù chứa tế bào máu ngoại vi (Beijing Blood Institute) chảy qua cột sợi ni lông (Beijing Hede Biotechnology Company), tế bào B, tế bào huyết tương, tế bào đơn nhân và một số tế bào phụ thuộc sẽ dính bám một cách chọn lọc vào sợi ni lông mặc dù hầu hết tế bào T đi qua cột sợi ni lông và do đó thu được quần thể tế bào T được làm giàu. Việc vận hành được mô tả đơn giản như sau: thu được ống tiêm bằng thủy tinh 50-ml, rút lõi ống tiêm ra và lắp ống vòi cao su với kẹp vào trong vòi ống tiêm. Phong toả một số sợi ni lông và lồng chúng vào trong ống tiêm. Cố định ống tiêm lên giá đỡ và rót dịch lỏng nuôi cấy tế bào RPMI ở 37°C vào để xử lý sơ bộ sợi ni lông. Đóng van, mở van sau 0,5 giờ để giải phóng dịch lỏng nuôi cấy tế bào. Pha loãng dịch lỏng tế bào sẽ được tách biệt bằng dịch lỏng nuôi cấy RPMI được gia nhiệt sơ bộ đến nồng độ thích hợp khoảng $5,00 \times 10^7$ tế bào/ml. Rót dịch lỏng tế bào vào trong ống tiêm và nhấn chìm cột sợi ni lông. Phủ ống tiêm và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Mở phần mở phía dưới, giải phóng dịch lỏng một cách từ từ (1 giọt/phút) và gom vào ống ly tâm. Ly tâm ở 1000xg trong 10 phút để thu được tế bào bạch huyết T mong muốn.

2. Đánh dấu protein tái tổ hợp rh-PD-L1 bằng biotin

Trộn 100ug protein tái tổ hợp rh-PD-L1 được mua từ (Beijing Sino Biological Inc.) với biotin-amino-axit caproic-NHS (Thermo) được hoà tan trong DMSO theo tỷ lệ 1:4 mol và duy trì nó ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, chuyển hỗn hợp phản ứng qua cột gel G25 (Thermo) để tách biotin-rh-PD-L1 được đánh dấu và biotin tự do.

3. Tổ hợp biotin-rh-PD-L1 được đánh dấu với tế bào T của người

Trộn protein tái tổ hợp rh-PD-L1 được đánh dấu bằng các nồng độ khác nhau của biotin và 10^5 tế bào T tách biệt, sau đó ủ nó ở 4°C trong 15 phút. Rửa nó ba lần bằng PBS và bổ sung streptavidin - allophycocyanin (Thermo) (SA-APC) vào 0,2ug/ml và ủ nó ở 4°C trong 20 phút. Rửa ba lần bằng PBS và đặt vào phép đo dòng tế bào của Beckman Dickson Calibur và đo ở 660nm. Như được thể hiện trên Fig.2, kết quả thể hiện rằng PD-L1 protein được đánh dấu bằng biotin có thể gắn kết tế bào T.

Ví dụ 3: Tạo ra kháng thể kháng rh-PD-1

1. Gây miễn dịch động vật

Trộn 10ug protein tái tổ hợp rh-PD-1 chứa 1mg/ml làm kháng thể và chất phụ trợ miễn dịch tương đương (chất phụ trợ Freund (Sigma - Aldrich)) và lựa chọn ba chuột FVB giống cái 6 tuần tuổi để thực hiện việc gây miễn dịch dưới da. Sau lần gây miễn dịch thứ nhất, cùng liều được dùng một lần mỗi tuần để làm tăng việc gây miễn dịch.

2. Dung hợp tế bào

Sau lần bắn sau cùng gây miễn dịch tăng cường, chọn hạch bạch huyết ở gốc bắp đùi của chuột và nghiền chúng trong nước muối thông thường. Sau đó, thu được huyền phù được làm giàu với tế bào B và dung hợp tế bào SP2/0 bằng phương pháp chuyển điện di thông thường (xem BTX electroporator manual). Đặt tế bào dung hợp vào môi trường nuôi cấy toàn bộ RPMI-1640 chứa HAT (Sigma) để nuôi cấy ở điều kiện 5% CO_2 và 37°C .

Ví dụ 4: Thử nghiệm phong bế phối tử và thụ thể

Từ 20000 loại tế bào lai đơn dòng, dùng phản ứng đánh dấu enzym (Elisa) để sàng lọc các dòng trong số 1220 loại kháng thể được tiết, mà có thể gắn kết với protein PD-1. Trong 1220 loại kháng thể này, có năm loại, mà có thể ức chế theo các mức độ khác nhau tổ hợp giữa PD-L1 được đánh dấu biotin và thụ thể PD-1 đối với tế bào T.

Ủ hỗn hợp gồm năm kháng thể (1 μ g/ml) như trên đây và 312ng/ml rh-PD-L1 được đánh dấu biotin (cô đặc) ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, ủ hỗn hợp và tách biệt tế bào T ở 4°C trong 15 phút. Sau đó, rửa ba lần bằng nước muối thông thường và bổ sung 0,2 μ g/ml SA-APC để ủ ở 4°C trong 15 phút. Sau khi rửa ba lần bằng nước muối thông thường, đo mẫu bằng dụng cụ đo dòng tế bào BD để xác nhận nếu nó có thể ức chế tổ hợp của rh-PD-L1 và thụ thể PD-1 trên bề mặt của tế bào T.

Như được thể hiện trên Fig.3, Dòng 1, 10 và 11 có thể phong bế tổ hợp của PD-1 với phối tử PD-L1 trên bề mặt của tế bào. Nhưng dòng 55 và 64 chỉ có thể đóng vai trò ức chế yếu.

Ví dụ 5: Tổ hợp với các thành viên của họ CD28 khác

Để thử nghiệm hơn nữa tính đặc hiệu gắn kết của của các dòng 1, 10, 11, 55 và 64 với các ứng viên kháng thể, đặt 1 μ g/ml rh-PD-1 hoặc protein ICOS, CTLA-4 và CD28 (R&D System) của các thành viên của họ CD28 khác vào trong dung dịch đệm được phủ 0,05M PH9 carbonat vào trong đĩa đánh dấu enzym 96 giếng và duy trì ở 4°C qua đêm. Vào ngày tiếp theo, giải phóng dung dịch vào giếng và rửa sản phẩm ba lần bằng chất đệm rửa (PBS + 0,5% TWEEN). Sau đó, bổ sung dung dịch PBS chứa 3% BSA và phong bế nó trong 20 phút. Rửa ba lần bằng chất đệm rửa và sau đó bổ sung 100 μ l chứa 1 μ g/ml ứng viên kháng thể, ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó rửa ba lần bằng chất đệm rửa. Sau đó, pha loãng kháng thể để kháng chuột liên kết ngang HRP (Jscckson Immunoresearch) đến 1: 10000 bằng chất đệm rửa và ủ nó ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng chất đệm rửa, bổ sung 50 μ l dung dịch nền TMB (tetrametyl benzidin) để tạo ra màu. Sau khi phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, kết thúc phản ứng bằng 25 μ l 0,5M dung dịch axit sulfuric và đọc độ hấp thụ ở 450nm.

Như được thể hiện trên Fig.4, tất cả các ứng viên kháng thể được thử nghiệm có thể nhận biết và gắn kết với rh-PD-1 nhưng không nhận biết thành viên của họ CD28 khác.

Ví dụ 6: Trình tự vùng biến đổi của ứng viên kháng thể

Nuôi cấy tế bào lai ứng viên đến tổng số lượng 10^7 , ly tâm nó ở 1000 vòng/phút trong 10 phút để gom tế bào và chiết tổng ARN bằng kit thuốc thử Trizol (Invitrogen). Sử dụng ARN này làm khuôn mẫu để tổng hợp ADN bổ trợ sợi thứ nhất (Qiagen), sau đó sử dụng ADN sợi thứ nhất làm khuôn mẫu tiếp theo để khuếch đại trình tự ADN của vùng biến đổi tương ứng với tế bào lai. Trình tự đoạn môi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại là phần bù với vùng khung thứ nhất và vùng cố định của vùng biến đổi của kháng thể (Larrick, J.W., et al., (1990) Scand. J. Immunol., 32, 121-128 và Coloma, J. J. et al., (1991) BioTechniques, 11,152-156 et al.). Trong 50µl hệ phản ứng, bổ sung một cách riêng biệt 1µl ADN bổ trợ, 5µl 10 x dung dịch đệm PCR, mỗi 1µl (25pmol) đoạn môi ngược dòng và xuôi dòng, 1µl dNTP, 1µl 25mmolPL MgCl₂, 39µl H₂O, tiến hành làm biến tính ban đầu ở 95°C trong 10 phút. Bổ sung 1µl Taq enzym (Invitrogen) và chu kỳ nhiệt độ khởi đầu để thực hiện việc khuếch đại PCR. Các điều kiện phản ứng là như sau: biến tính ở 94°C trong 1 phút, nung ở 58°C trong 1 phút và kéo dài ở 72°C trong 115 phút. Lặp lại chu kỳ này 30 phút và sau đó duy trì 72°C trong 10 phút.

Sau đó, tạo trình tự sản phẩm khuếch đại, trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng 1, 10 và 11 của thể lai là như sau:

Dòng 1:

Chuỗi nặng

```

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLQQSGAELVRPGASVTLTCKASGYTFTDYEMHWVKQTPINHGLEWIGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <----FR4---->
KAKLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGCTGTTVTVSS

```

Trình tự axit nucleic

CAGGGTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGACCTGCAA
 GGCTTCGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTATACATGGCCTGGAA
 TGGATTGGAGTTATTGAATCTGAAACTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAA
 CTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCG
 TCTATTACTGTACAAGAGAGGGTATTACTACGGTAGCAACTACGTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
 CACAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCA

Chuỗi nhẹ

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPELLIYKVYNRFS
 <-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPFTFGSGTKLEIK

Trình tự axit nucleic

GATGTTTTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAG
 ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAG
 TCTCCAGAGCTCCTGATCTACAAAGTTTACAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTG
 GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
 TTCAAGGTTACATGTTCCATTACGTTGCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

Dòng 10:

Chuỗi nặng

<-----FR1-----> CDR1<-----FR2-----> CDR2
 QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGAAYNQKFKG
 <-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 KAILTADKSSSTAYMELRSLTSED³AVVYCTREGITTSVVTTYWYFDVNGTGTTVTVSS

Trình tự axit nucleic

CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCCTGCAAGGC
 TTCGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGA
 TTGGAGCTATTGATCCTGAAACTGGTGGTCTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATACTGACT
 GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA
 CTGTACAAGAGAGGGTATTACTACGTCAGTGGTTACGTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGA
 CCACGGTCACCGTCTCCTCA

Chuỗi nhẹ

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVLMTCPTPLSLFVSLGDOASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 <-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPRDFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDLGVIYCTQGSHVPLTFGSGTKLEIK

Trình tự axit nucleic

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAG
 ATCTAGTCAGAGCATTTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGT
 CTCCAPAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTCCA
 TCAGGGACAGATTTCACTCTCAGGATCAGCAGAGTGGAGCCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCA
 AGGTTCACTGTTCCACTCACGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

Dòng 11:

Chuỗi nặng

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLSTTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYNPALKS
 <-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 RLTISSKNTSKNQVFLKIANVDTEDTATYYCARIEERFRWYFDVWGTTVTVSS

Trình tự axit nucleic

CAGGTTACTCTGAAPGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTT
 CTCTGGGGTTTTCACTGAGCACTTTTGGTATGGGTGTCCGGCTGGATTCTGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGG
 AGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAATCCCGCCCTGAAGAGTCCGGCTCACAAATC
 TCCAAGAATACCTCCAAAPACCAGGTATTCCTCAAGATCGCCAATGTGGACACTGAAGATACTGCCACATA
 CTACTGTGCTCGAATAGAGGAGAGGTTCCGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCG
 TCTCCTCA

Chuỗi nhẹ

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 RAGWTQESALTTSPGETVTLTCTRSSTGAITTSNYANWVQEKPDHLEFGTGLIGGTNNRAP
 <-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEALYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

Trình tự axit nucleic

AGGGCTGGTTGGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCGCT
 CAAGTACTGGGGCTATTACAACCTAGTAAGTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTAC
 TGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGA
 GACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGT
 ACAGCAACCACTGGGTGTTCTGGTGGAGGAACCAAACCTGACTGTCCTA

Ví dụ 7: Cấu trúc vật truyền biểu hiện của kháng thể khảm

Tạo dòng mảnh Fc của vùng cố định của chuỗi nặng và vùng cố định k/ε của chuỗi nhẹ từ tế bào máu của người (Beijing Blood Institute) và kết nối chúng vào trong plasmit pCDNA3.1 (xem ấn phẩm: Walls MA, Hsiao H and Harris LJ (1993), Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 12 2921 -2929) để cải biến. Các mảnh trình tự này của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong Ví dụ 6 được tổng hợp bởi công ty Genscript. Sau đó, chuỗi nặng được tiêu hoá bằng enzym Xho I và Age I và chuỗi nhẹ được tiêu hoá bằng các enzym Sma I và Dra III, chúng được kết nối vào trong plasmit pCDNA3.1 được cải biến một cách tương ứng và tạo trình tự để xác nhận trình tự của ADN tạo dòng. Tất cả các vật liệu thử nghiệm tiếp theo được tạo ra thông qua việc lây truyền tế bào với dây plasmit này và sau đó tính chế.

Ví dụ 8: Thử nghiệm chức năng *in vitro* kích thích tế bào T bởi kháng thể khảm – thử nghiệm kích thích độc tố bệnh uốn ván

Tạo tấm lát PBMC mới được tạo ra vào trong đĩa đáy phẳng 96 giếng. Sau khi ủ qua đêm, bổ sung các nồng độ khác nhau của kháng thể và 100ng/ml độc tố bệnh uốn ván (TT) (List Biological Laboratories). Ba ngày sau, gom dịch nổi. Sử dụng kit INFN γ bởi R&D System Company để đo hàm lượng của IFN γ trong dịch nổi qua thử nghiệm Elisa. Như được thể hiện trên Fig.5, sau khi tín hiệu PD-1 được phong bế, xytokin được tiết bởi tế bào miễn dịch được hoạt hoá bởi sự kích thích TT là được gia tăng rất lớn. Ngoài ra, độ chuẩn của kháng thể ứng viên là cao hơn so với EH12.2H7 được mua từ Biolegend Company trong đơn yêu cầu cấp patent số 200980147059.0.

Ví dụ 9: Sự tương tác của các kháng thể khác nhau với PD-1 sau khi trao đổi cả chuỗi nặng và nhẹ của trước

Tái tổ hợp các chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 1 và 10 theo cách thuận

ngịch để thu được H1L10 (chuỗi nặng 1, chuỗi nhẹ 10) và H10L1 (chuỗi nặng 10, chuỗi nhẹ 1). Tương tự với nội dung được mô tả trong Ví dụ 7, các tác giả sáng chế thu được các kháng thể tái tổ hợp. Các kháng thể này, kháng thể ban đầu 1 (chuỗi nặng 1, chuỗi nhẹ 1) và kháng thể ban đầu 10 (chuỗi nặng 10, chuỗi nhẹ 10) được thử nghiệm với các kết quả EC50 theo thử nghiệm Elisa như sau:

Mẫu				

Kết quả thể hiện rằng các kháng thể được tạo ra sau khi tái tổ hợp vẫn có thể gắn kết với protein PD-1 một cách hữu hiệu.

Ví dụ 10: Cải biến việc làm giống người của kháng thể

Việc cải biến làm giống người được thực hiện theo trình tự của vùng biến đổi của kháng thể được tiết bởi tế bào lai thu được như trên đây. Tóm lại, quy trình cải biến làm giống người bao gồm các bước sau đây: A – so sánh trình tự gen của các kháng thể được tiết bởi các tế bào lai khác nhau với trình tự gen của kháng thể phôi người để tìm trình tự tương đồng ở mức cao; B – phân tích và thử nghiệm ái lực của HLA-DR để lựa chọn trình tự khung của phôi người với ái lực thấp; C – sử dụng kỹ thuật tương tự máy tính để áp dụng phân tử cắt bớt để phân tích trình tự của axit amin khung trong vùng biến đổi và bao quanh và thử nghiệm phương thức gắn kết lập thể trong không gian của nó. Tính toán lực tĩnh điện, lực Van der Waals, tính kỵ nước-tính ưa nước và trị số entropy để phân tích (các) axit amin riêng rẽ then chốt trong trình tự gen của kháng thể được tiết bởi tế bào lai khác nhau mà có thể hoạt động với PD-1 và duy trì cấu hình khoảng trống, ghép nó trở lại vào khung gen được chọn của phôi người và sau đó đặt lên nó để đánh dấu các vị trí axit amin trong vùng khung mà phải được bảo tồn, tổng hợp các đoạn mỗi ngẫu nhiên, làm cho thư viện thể thực khuẩn bởi chính nó, sàng lọc thư viện kháng thể được làm giống người (Pini, A. et al., (1998). Thiết kế và sử dụng thư viện thể hiện thể thực khuẩn: Kháng thể của người có ái lực dưới nanomol kháng chỉ thị sự hình thành mạch được tách rửa từ gel hai chiều, *Journal of Biological Chemistry*, 273(34): 21769-21776). Trên cơ sở này, các tác giả sáng chế đã thu được các kháng thể được

làm giống người khác nhau như sau. Các kháng thể bao gồm các dòng sau đây, trong đó trình tự chuỗi nhẹ của dòng 38, 39 và 41 là giống nhau và trình tự chuỗi nặng của dòng 39 và 48 là giống nhau.

Chuỗi nặng của dòng 38

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYEMHWVRQAPIHGLEWIGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREEGITTVATTYYWYFDVWGQGTITVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCATCCACGGCCTGG
AGTGGATCGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGAGTG
ACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACAC
CGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCATCACACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACGTG
TGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

Chuỗi nhẹ của dòng 38

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
DVVMTQSPLSLPVTLGQPAISISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT
TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTAAA

Chuỗi nặng của dòng 39

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
RAKITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREEGITTVATTYYWYFDVWGQGTITVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
GAGTGGATGGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGAG
CCAAGATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGGGCATCACACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACG
TGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

Chuỗi nhẹ của dòng 39

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS~~HVPLT~~FGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
 CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
 CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
 AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT
 TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTTAA

Chuỗi nặng của dòng 41

<-----FR1-----> CDR1<-----FR2-----> CDR2
 QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETG~~GTAYNQKFG~~

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 RVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGTITVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGACAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCA
 AAGCGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATGAAATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG
 AATGGATGGGCGTGATTGAAAGCGAAACCGGCGGCACCGCGTATAACCAGAAATTCAGGGCCGCGTG
 ACCCTGACCGCGGATAAAAGCAGCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACC
 GCGGTGTATTATGCACCCGCGAAGGCATTACCACCGTGGCGACCACCTATTATTGGTATTTTATGTGT
 GGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

Chuỗi nhẹ của dòng 41

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS~~HVPLT~~FGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
 CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
 CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
 AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT
 TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTTAA

Chuỗi nặng của dòng 48

<-----FR1-----> CDR1<-----FR2-----> CDR2
 QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETG~~GTAYNQKFKG~~

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
 RAKITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGTITVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGACAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
 AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
 GAGTGGATGGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAATTCAGGGCAGAG
 CCAAGATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGAC
 ACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGGGCATCACACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACG
 TGTGGGGCCAGGGCACACCGTGACCGTGAGCAGC

Chuỗi nhẹ của dòng 48

```

<-----FR1----->      CDR1      <-----FR2----->      CDR2
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS

<-----FR3----->      CDR3      <---FR4--->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSSHVPLTTFGQGTKLEIK

```

```

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
CAGAGCCCGCGCCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
AGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGATTAT
TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATTTAA

```

Ví dụ 11: Sự kích thích *in vitro* bởi kháng thể được làm giống người với tế bào T

Tạo tấm lát PBMC mới được tạo ra (Beijing Blood Institute) vào trong đĩa đáy phẳng 96 giếng. Sau khi ủ qua đêm, bổ sung 10ug/ml kháng thể và 100ng/ml độc tố bệnh uốn ván (TT). Sau khi nuôi cấy nó trong 3 ngày, gom dịch nổi và đo mức độ tiết của IL2 của dòng 38, 39, 41 và 48 ((conIgG4) đối chứng) của các kháng thể được làm giống người bằng Luminex bởi công ty Life Technology và kit phát hiện thử nghiệm CD8+ xytokin bởi công ty EMD. Kết quả (xem Fig.6) thể hiện rằng tất cả các kháng thể được làm giống người có thể kích thích chức năng của tế bào T.

Ví dụ 12: Kháng thể được làm giống người có thể kích thích *in vitro* tế bào T giết tế bào khối u

Sử dụng lentivirut (Qiagen) biểu hiện PD-L1 protein để lây nhiễm tế bào MD-MAB-453 để thu được dòng tế bào MD-MAB-453 biểu hiện một cách ổn định PD-L1. Sau đó, cảm ứng gen GFP để cho phép nó biểu hiện GFP protein một cách ổn định. Chiết tế bào hình cây (DC) từ tế bào máu ngoại vi của người mới tạo ra. Nuôi cấy nó trong 300 tế bào/giếng và tế bào MD-MAB-453 được cải biến (300 tế bào/giếng) trong đĩa 96 giếng cùng với nhau trong ba ngày. Sau đó, bổ sung tế bào T được tiết (1000 tế bào/giếng) và 10ug/ml dòng 38, 39, 41 và 48 ((conIgG4) đối chứng) của kháng thể kháng PD-1 được làm giống người trước khi nuôi cấy tiếp chúng cùng với nhau trong 3 ngày để đọc trị số huỳnh quang GFP. Kết quả (xem Fig.7) thể hiện rằng tất cả các kháng thể được làm giống người có thể kích thích tế bào T giết tế bào khối u.

Ví dụ 13: Tổ hợp các kháng thể được làm giống người với protein PD-1 của các loài khác nhau

Pha loãng một cách tương ứng 1 μ g/ml PD-1 có nguồn gốc từ người, PD-1 của khi đuôi dài và PD-1 có nguồn gốc từ chuột (được mua từ Sinobiological) vào trong dung dịch chất đệm được phủ 0,05M PH9 carbonat và duy trì 4°C qua đêm. Vào ngày tiếp theo, giải phóng dung dịch vào các giếng và rửa ba lần bằng chất đệm rửa. Sau đó, bổ sung dung dịch PBS chứa 3% BSA và phong bế nó trong 20 phút. Sau đó, rửa ba lần bằng chất đệm rửa trước khi bổ sung 100 μ l nồng độ khác nhau của các kháng thể ứng viên sau khi pha loãng. Ủ nó ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó rửa ba lần bằng chất đệm rửa. Sau đó, pha loãng kháng thể dê kháng người được tiếp hợp HRP (Jackson ImmunoResearch) đến 1: 10000 bằng chất đệm rửa và ủ nó ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng chất đệm rửa, bổ sung 50 μ l dung dịch nền TMB vào để tạo ra màu. Sau khi phản ứng trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, kết thúc phản ứng bằng 25 μ l 0,5M dung dịch axit sulfuric và đọc độ hấp thụ ở 450nm. Các kết quả (Fig.8A, Fig.B và Fig.C) thể hiện rằng tất cả các dòng gắn kết với PD-1 của người hoặc khi đuôi dài với ái lực tương tự mặc dù tất cả chúng không tương tác với PD-1 có nguồn gốc từ chuột.

So sánh trình tự PD-1 của người, khi đuôi dài và chuột (xem Fig.9 trong đó các vùng khác nhau chính của PD-1 của chuột và PD-1 của người/khi đuôi dài được đánh dấu bằng hộp). Đã được chứng minh qua các thử nghiệm rằng epitop của kháng thể ứng viên với protein PD-1 tồn tại trong các vùng này.

Ví dụ 14: Thử nghiệm sự kích thích *in vitro* bởi kháng thể được làm giống người đối với sự tăng sinh tế bào T – thử nghiệm đáp ứng nhớ kháng nguyên bệnh uốn ván

Tạo tằm lát PBMC mới được tạo ra (Beijing Blood Institute) vào trong đĩa đáy phẳng 96 giếng. Sau khi ủ qua đêm, đánh dấu nó bằng CFSE và bổ sung 10 μ g/ml kháng thể được làm giống người (38, 39, 41 và 48) và 100ng/ml độc tố bệnh uốn ván (TT) (List Biological Laboratories). Tiến hành phân tích định lượng đối với sự tăng sinh tế bào T ở ngày thứ 6, 8 và 10 bằng phép đo dòng tế bào (FACS) qua tỷ lệ pha loãng CFSE. Như được thể hiện bởi kết quả của Fig.10, so sánh với IgG đối chứng, tế bào miễn dịch được hoạt hoá bởi sự kích thích TT được cảm ứng

qua việc phong bế tín hiệu PD-1 là dưới sự phân đôi và tăng sinh tế bào hơn nữa.

Ví dụ 15: Thử nghiệm kích thích *in vitro* bởi kháng thể được làm giống người đối với sự tăng sinh tế bào T- thử nghiệm đáp ứng nhớ kháng nguyên polypeptit virut

Tạo tằm lát PBMC mới được tạo ra (Beijing Blood Institute) vào trong đĩa đáy phẳng 96 giếng. Sau khi ủ qua đêm, đánh dấu nó bằng CFSE. Bổ sung 10ug/ml kháng thể được làm giống người (38, 39, 41 và 48) và 1ug/ml hỗn hợp CEF peptit (CMV, EBV và Bệnh cúm). Tiến hành phân tích định lượng đối với sự tăng sinh tế bào T ở ngày thứ 6, 8 và 10 bằng phép đo dòng tế bào (FACS) qua tỷ lệ pha loãng CFSE. Như được thể hiện bởi kết quả của Fig.11, so sánh với IgG đối chứng, tế bào miễn dịch được hoạt hoá bởi sự kích thích polypeptit hỗn hợp CEF cảm ứng qua việc phong bế tín hiệu PD-1 là trong sự phân chia và tăng sinh tế bào hơn nữa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh chức năng của nó gắn kết với protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 43, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm SEQ ID NO: 33 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ gồm SEQ ID NO: 34.
2. Phân tử axit nucleic phân tách được, trong đó phân tử này mã hoá kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo điểm 1.
3. Vật truyền biểu hiện, trong đó vật truyền này bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 2.
4. Tế bào vật chủ, trong đó tế bào này bao gồm vật truyền biểu hiện theo điểm 3.
5. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh chức năng của nó theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước: nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 4 trong điều kiện cho phép tạo ra kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó, và thu gom kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó được tạo ra theo cách này.
6. Thê tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo điểm 1 được kết hợp với chất điều trị, trong đó chất điều trị này là độc tố, đồng vị phóng xạ, được chất hoặc chất gây độc tế bào.
7. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES INC. & JUNMENG BIOSCIENCES CO. LTD

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG HOẶC MẢNH CHỨC NĂNG CỦA NÓ GẮN KẾT VỚI PROTEIN GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH 1 (PD-1) VÀ PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC PHÂN TÁCH ĐƯỢC

<130> 2013-06-26

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> CDR1 của chuỗi nặng của dòng 1

<400> 1

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> CDR2 của chuỗi nặng của dòng 1

<400> 2

Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> CDR3 của chuỗi nặng của dòng 1

<400> 3

Glu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10					15	

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> CDR1 của chuỗi nhẹ của dòng 1

<400> 4

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu
1				5					10					15	

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> CDR2 của chuỗi nhẹ của dòng 1

<400> 5

Lys	Val	Tyr	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> CDR3 của chuỗi nhẹ của dòng 1

<400> 6

Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> CDR1 của chuỗi nặng của dòng 10

<400> 7

Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> CDR2 của chuỗi nặng của dòng 10

<400> 8

Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ala Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> CDR3 của chuỗi nặng của dòng 10

<400> 9

Glu Gly Ile Thr Thr Ser Val Val Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> CDR1 của chuỗi nhẹ của dòng 10

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> CDR2 của chuỗi nhẹ của dòng 10

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> CDR3 của chuỗi nhẹ của dòng 10

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> CDR1 của chuỗi nặng của dòng 11

<400> 13

Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> CDR2 của chuỗi nặng của dòng 11

<400> 14

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> CDR3 của chuỗi nặng của dòng 11

<400> 15

Ile Glu Glu Arg Phe Arg Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> CDR1 của chuỗi nhẹ của dòng 11

<400> 16

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Ile Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> CDR2 của chuỗi nhẹ của dòng 11

<400> 17

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> CDR3 của chuỗi nhẹ của dòng 11

<400> 18

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
 1 5

<210> 19
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 1

<400> 19

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 1

<400> 20

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe 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 Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21

<211> 125

<212> PRT

<213> vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 10

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Ser Val Val Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 10

<400> 22

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23

<211> 121

<212> PRT

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 11

<400> 23

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Glu Glu Arg Phe Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 109

<212> PRT

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 11

<400> 24

Arg Ala Gly Trp Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Ile Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 25

<211> 375

<212> ADN

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 1

<400> 25

```

caggggtcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg      60
acctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca      120
cctatacatg gcctggaatg gattggagtt attgaatctg aaactgggtg tactgcctac      180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagagggg      300
attactacgg tagcaactac gtactactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg      360
gtcaccgtct cctca                                                    375

```

<210> 26

<211> 336

<212> ADN

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 1

<400> 26

```

gatgttttga tgacccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccagag ctctgatct acaaagtta caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcca      300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaaa                                336

```

<210> 27

<211> 375

<212> ADN

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 10

<400> 27

caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60
 tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120
 cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaactgggtg tgctgcctac 180
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagaggg 300
 attactacgt cagtgggttac gtactactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 28

<211> 336

<212> ADN

<213> vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 10

<400> 28

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagagtgg agcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcca 300
 ctcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 29

<211> 363

<212> ADN

<213> vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 11

<400> 29

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttttggtg tgggtgtcgg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaaggggtct ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
 tataatcccg ccctgaagag tcggctcaca atctccaaga atacctcaa aaaccaggta 240
 ttctcaaga tcgccaatgt ggacactgaa gatactgcca catactactg tgctcgaata 300
 gaggagaggt tccgctggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 30

<211> 327

<212> ADN

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 11

<400> 30

agggctgggtt ggactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc 60

acttgctcgt caagtactgg ggctattaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa 120

aaaccagatc atttattcac tgggtctaata ggtggtacca acaaccgagc tccagggtgtt 180

cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacaggggca 240

cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggt acagcaacca ctgggtgttc 300

ggtggaggaa ccaaactgac tgtccta 327

<210> 31

<211> 31

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi thuận

<400> 31

gtacgctagc caccatgcag atcccacagg c 31

<210> 32

<211> 29

<212> ADN

<213> Đoạn mỗi ngược

<400> 32

gacctcgcag ccaccagggt ttggaactg

29

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

<213> vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 38

<400> 33

Gln Gly 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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 38, 39 và 41

<400> 34

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

Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	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	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	

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

<210> 35

<211> 125

<212> PRT

<213> Vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 39 và 48

<400> 35

Gln	Gly	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

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

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

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

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

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 36

<211> 125

<212> PRT

<213> vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 41

<400> 36

Gln Gly 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

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

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

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

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

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 48

<400> 37

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Phe Gln Gly
85 90 95

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

<210> 38

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 38

<400> 38

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacgaga tgactgggt gagacaggcc 120
cccatccacg gcctggagtg gatcggcgtg atcgagagcg agaccggcgg caccgcctac 180
aaccagaagt tcaagggcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc 300
atcaccaccg tggccaccac ctactactgg tacttcgacg tgtggggcca gggcaccacc 360
gtgaccgtga gcagc 375

<210> 39

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 38, 39 và 41

<400> 39

gatgtggtga tgaccagag cccgctgagc ctgccggtga ccctgggcca gccggcgagc 60
attagctgcc gcagcagcca gagcattgtg catagcaacg gcaacaccta tctggaatgg 120

tatctgcaga aaccgggcca gagcccgag ctgctgattt ataaagtgag caaccgcttt 180
 agcggcgctgc cggatcgctt tagcggcagc ggcagcggca ccgattttac cctgaaaatt 240
 agccgcgtgg aagcgggaaga tgtgggcgtg tattattgct ttcagggcag ccatgtgccg 300
 ctgacctttg gccagggcac caaactggaa attaaa 336

<210> 40

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 39 và 48

<400> 40

cagggccagc tggcgagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaagggtg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacgaga tgcactgggt gagacaggcc 120
 cccggccagg gcctggagtg gatgggcgtg atcgagagcg agaccggcgg caccgcctac 180
 aaccagaagt tcaagggcag agccaagatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
 atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcac cagagagggc 300
 atcaccaccg tggccaccac ctactactgg tacttcgacg tgtggggcca gggcaccacc 360
 gtgaccgtga gcagc 375

<210> 41

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nặng của dòng 41

<400> 41

cagggccagc tggcgagag cggcgcgga gtgaaaaaac cggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gattatgaaa tgcattgggt gcgccaggcg 120
 ccgggcccagg gcctggaatg gatgggcgtg attgaaagcg aaaccggcgg caccgcgtat 180
 aaccagaaat ttcagggccg cgtgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcac ccgcgaaggc 300
 attaccaccg tggcgaccac ctattattgg tattttgatg tgtggggcca gggcaccctg 360
 gtgaccgtga gcagc 375

<210> 42

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của dòng 48

<400> 42

gatgtggtga tgacccagag cccgctgagc ctgccggtga ccctgggcca gccggcgagc 60
 attagctgcc gcagcagcca gagcattgtg catagcaacg gcaacaccta tctggaatgg 120
 tatctgcaga aaccgggcca gagcccgcg cctgtgattt ataaagtgag caaccgcttt 180
 agcggcgtgc cggatcgctt tagcggcagc ggcagcggca ccgattttac cctgaaaatt 240
 agccgcgtgg aagcgggaaga tgtgggcgtg tattattgct ttcagggcag ccatgtgccg 300
 ctgacctttg gccagggcac caaactggaa attaaa 336

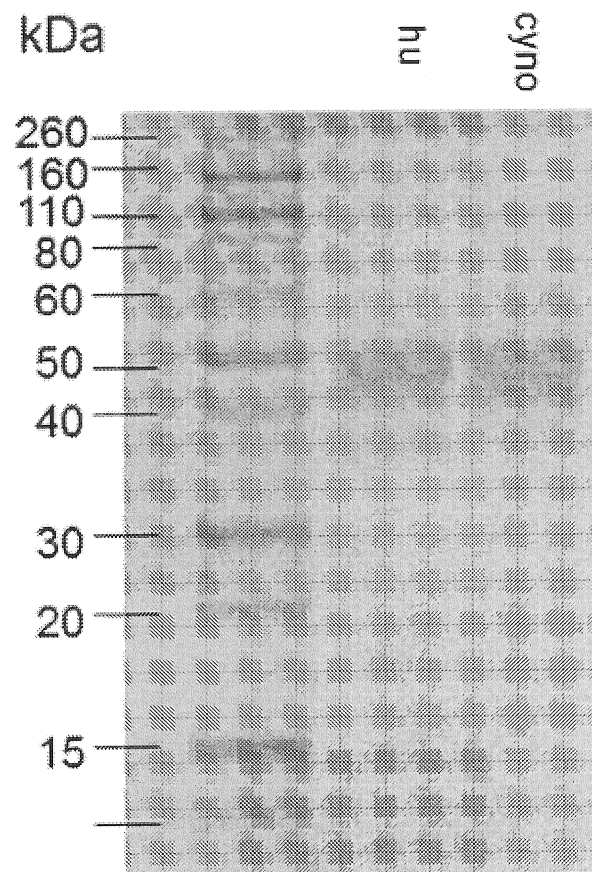
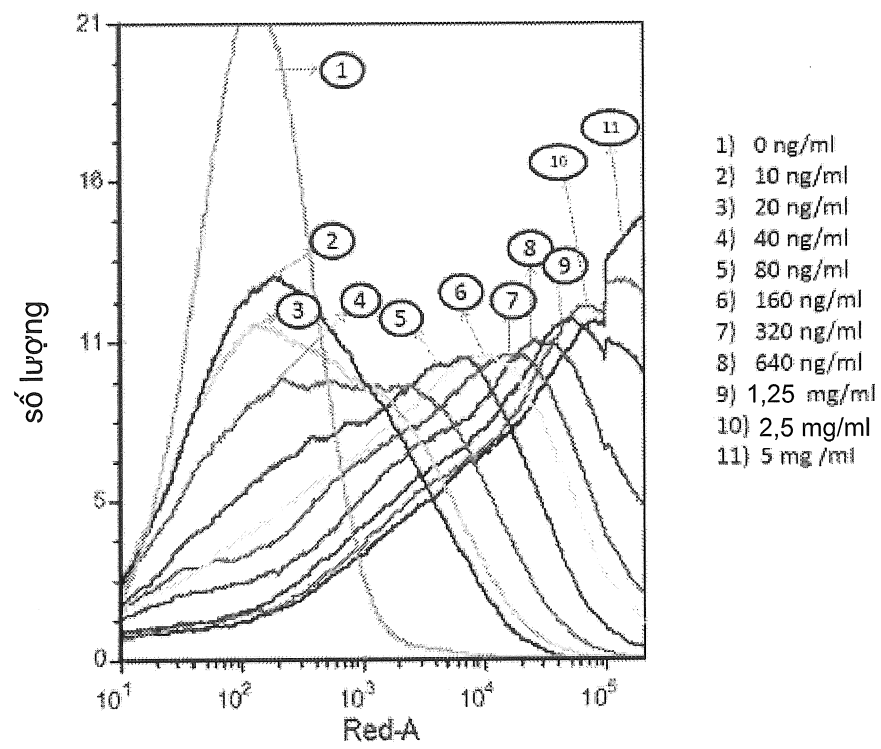


Fig.1



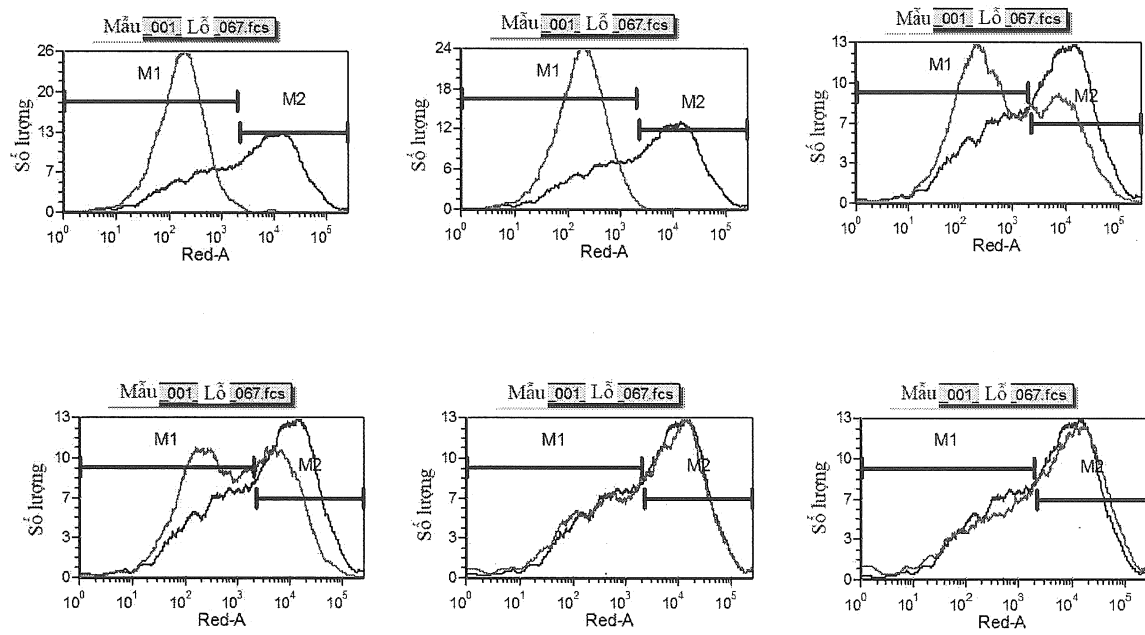


Fig. 3

Tổ hợp giữa (các) kháng thể ứng viên và (các) kháng nguyên khác nhau

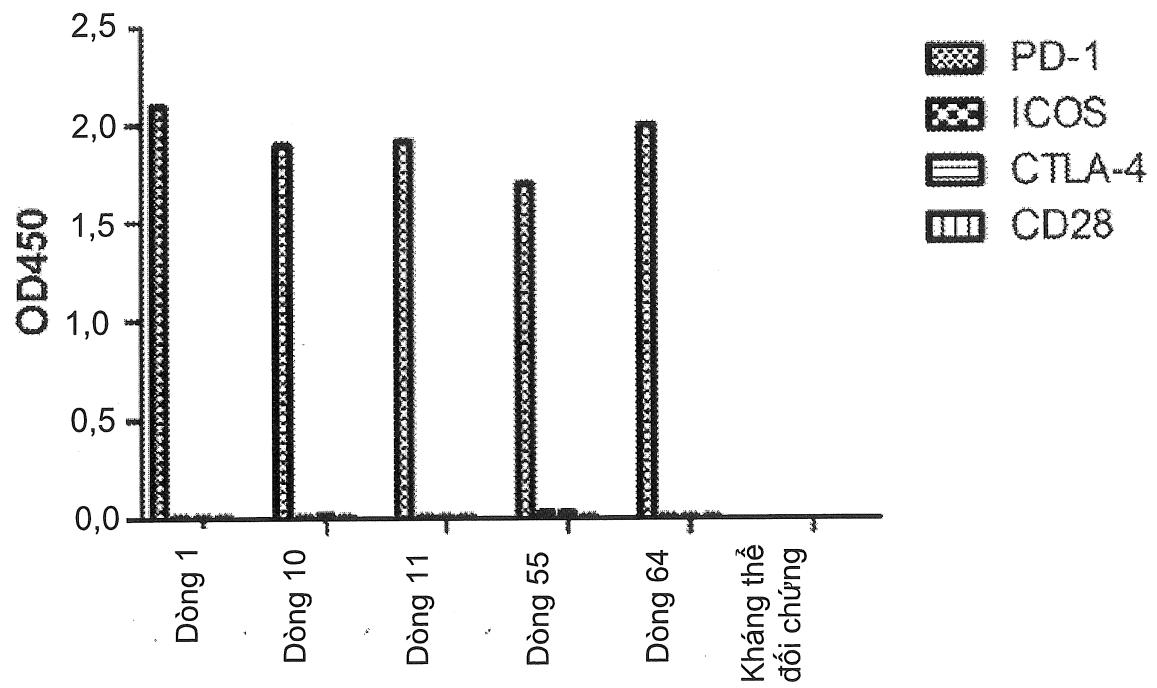


Fig.4

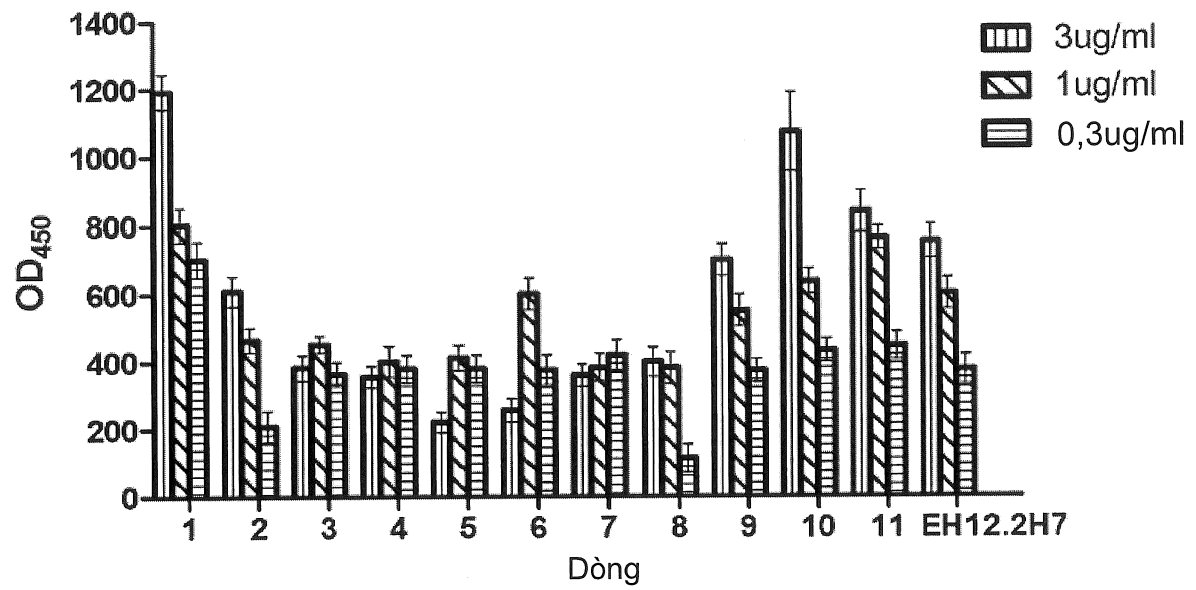


Fig.5

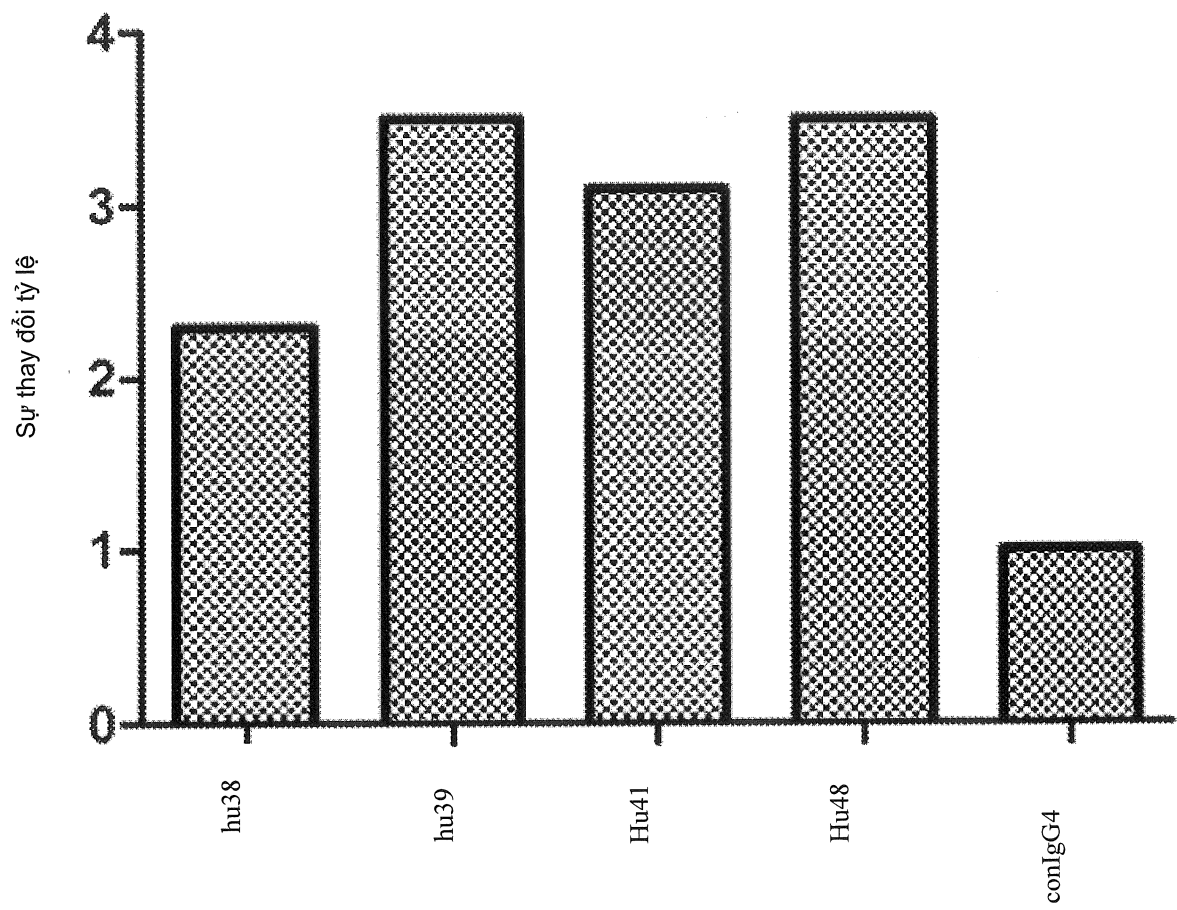


Fig.6

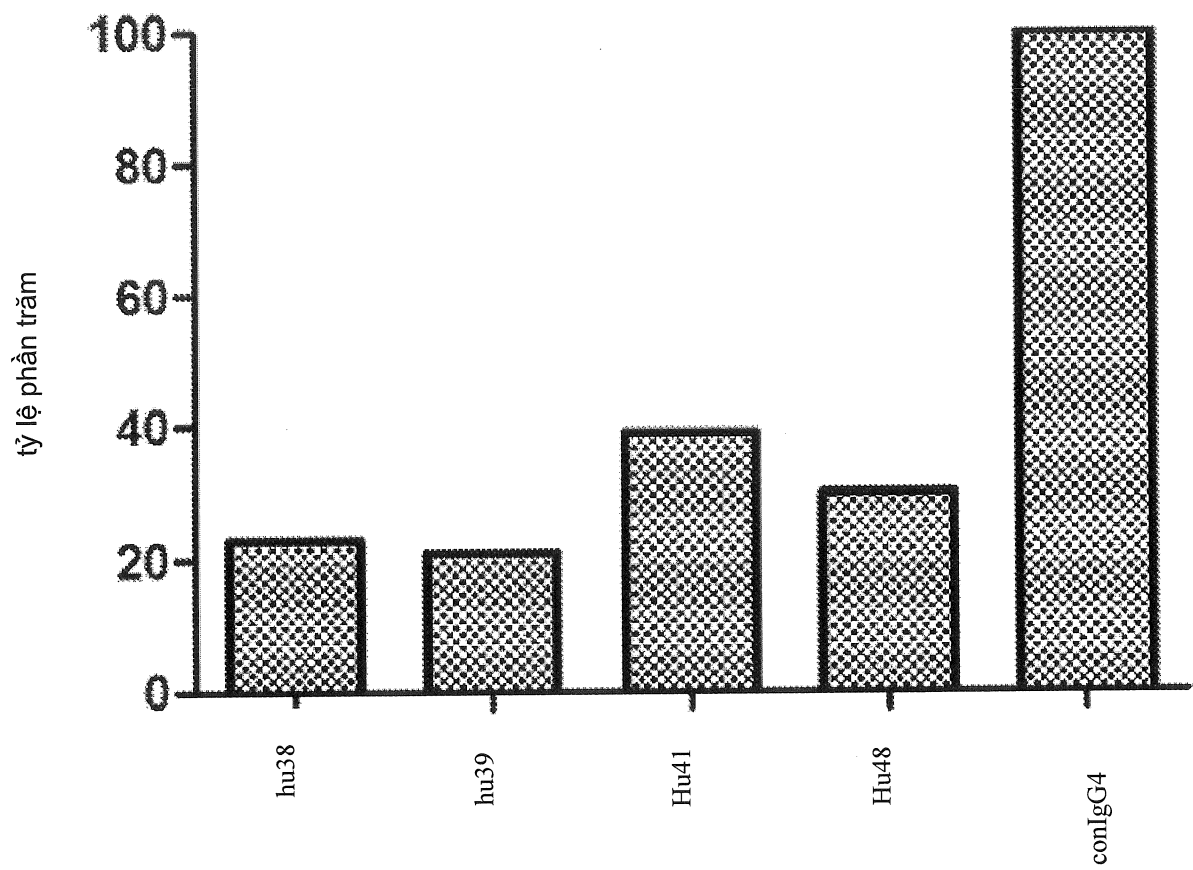
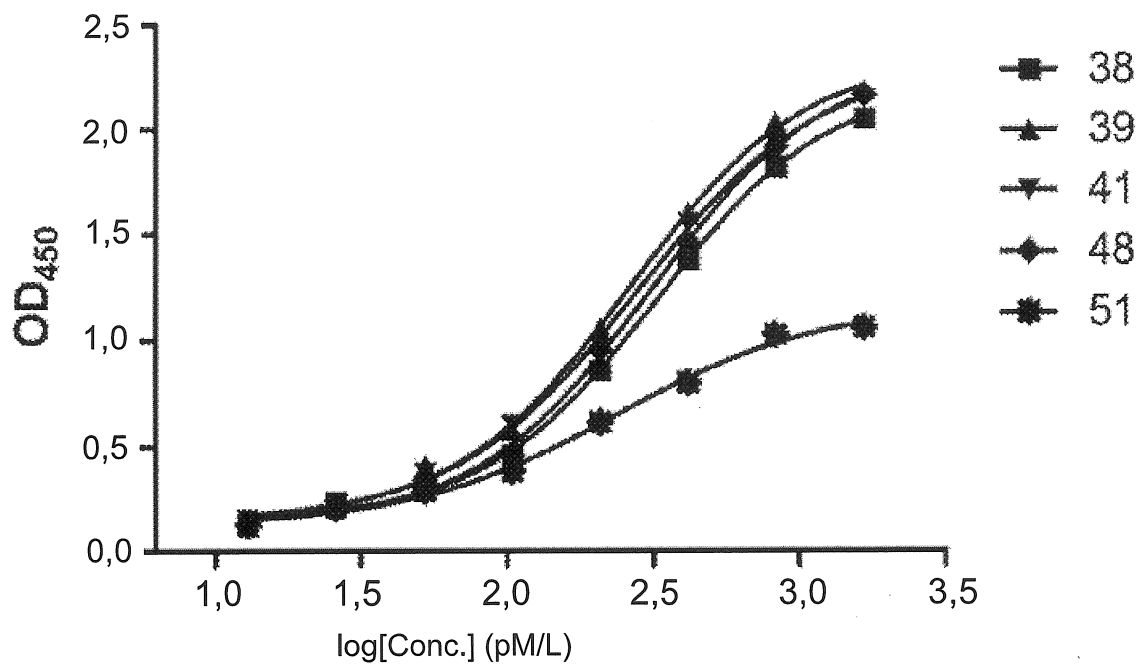


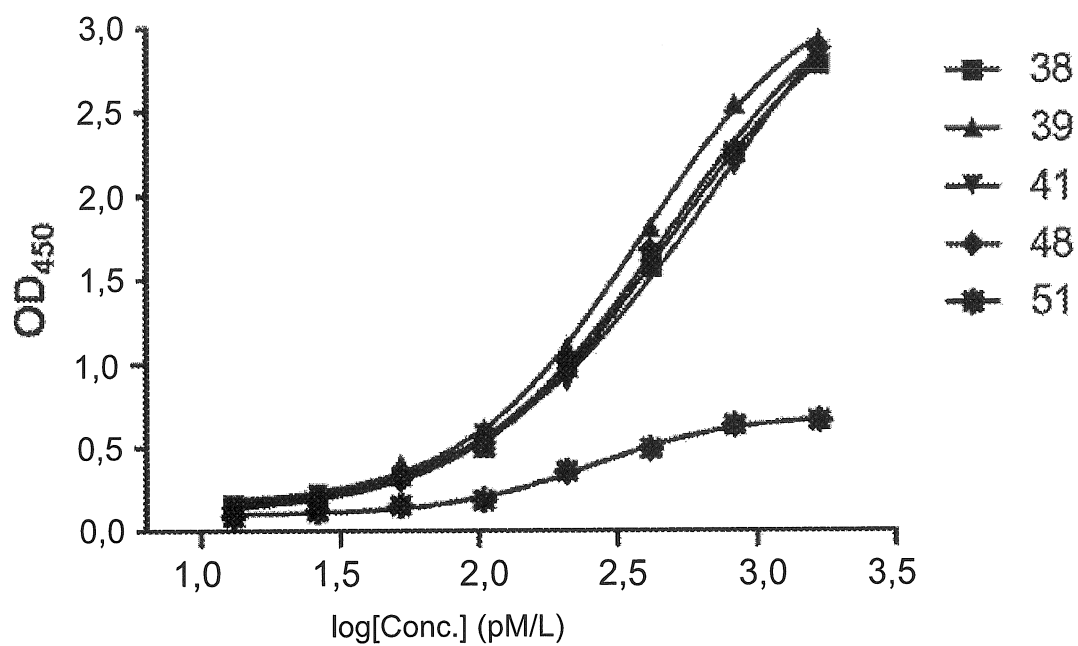
Fig.7

PD1 của người



Số	38	39	41	48	51
EC ₅₀ (pM/L)	326,1	262,9	279,6	310,9	236,5

Fig.8A

JS1 của *Macaca fascicularis*

Số	38	39	41	48	51
EC ₅₀ (pM/L)	488,8	381,9	724,8	485,3	259,9

Fig.8B

JS1 của chuột

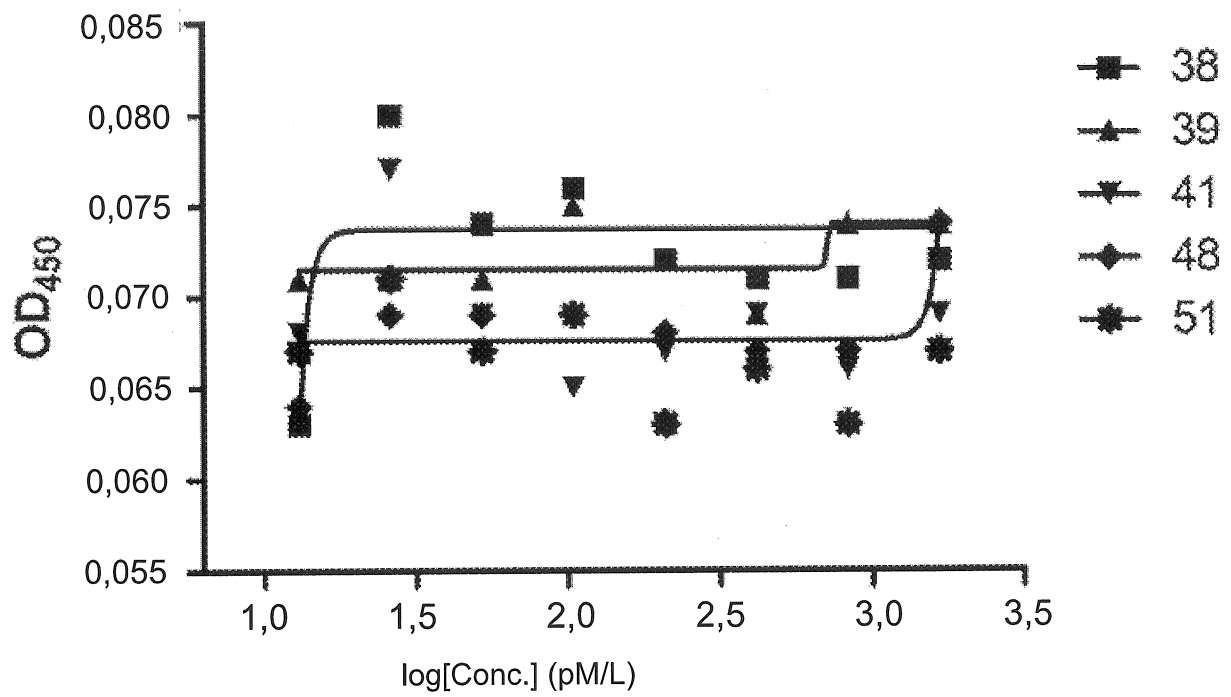


Fig.8C

		1	50
Người	(1)	MQLPAPWETVWAVLQLSWREGWFLDEPRPWNPPTTSPAILVITEGDA	
Cyno	(1)	MQLPAPWETVWAVLQLSWREGWFLDEPRPWNPPTTSPAILVITEGDA	
chuột	(1)	MWVROVENSFTWAVLQLSOSGNLLEVNGPWRSLTFYPAWLTVSECANA	
		51	100
Người	(51)	TFTCSLNTSESEVLNWTFRMSPSNQTEKLAAPFEDESOPASDPERFEVLC	
Cyno	(51)	TFTCSLNTSESEVLNWTFRMSPSNQTEKLAAPFEDESOPASDPERFEVLC	
chuột	(51)	TFTCSLNTSESEVLNWTFRMSPSNQTEKLAAPFEDESOPASDPERFEVLC	
		101	150
Người	(101)	PNRDFHMSVVRARENDSCTYLCAISLAPKAIKESLPAELRVTEPRAE	
Cyno	(101)	PNRDFHMSVVRARENDSCTYLCAISLAPKAIKESLPAELRVTEPRAE	
chuột	(101)	PNRDFHMSVVRARENDSCTYLCAISLAPKAIKESLPAELRVTEPRAE	
		151	200
Người	(151)	MTAHPSPSIFPACQFQTELVVGVVGLLCS--LVLLVWVLAVICSHARP	
Cyno	(151)	MTAHPSPSIFPACQFQTELVVGVVGLLCS--LVLLVWVLAVICSHARP	
chuột	(151)	TSTRPSISIFPACQFQTELVVGVVGLLCS--LVLLVWVLAVICSHARP	
		201	250
Người	(199)	TIGARRTQQLKEDPSANVIVSVVYGLDFQWRREKTPPEEIVSCVVEETEX	
Cyno	(199)	TIGARRTQQLKEDPSANVIVSVVYGLDFQWRREKTPPEEIVSCVVEETEX	
chuột	(201)	RRGRGSKDDMLRREPSRAPVPSVAYEELDFQWRREKTPPEEIVSCVVEETEX	
		251	290
Người	(249)	ATIVFESGLTSSPARSGSALQPSAPQIESBEDGHCSWPL	
Cyno	(249)	ATIVFESGLTSSPARSGSALQPSAPQIESBEDGHCSWPL	
chuột	(249)	ATIVFESGLTSSPARSGSALQPSAPQIESBEDGHCSWPL	

Fig.9

Tetanus- Toxoid nhắc lại tăng sinh tế bào T

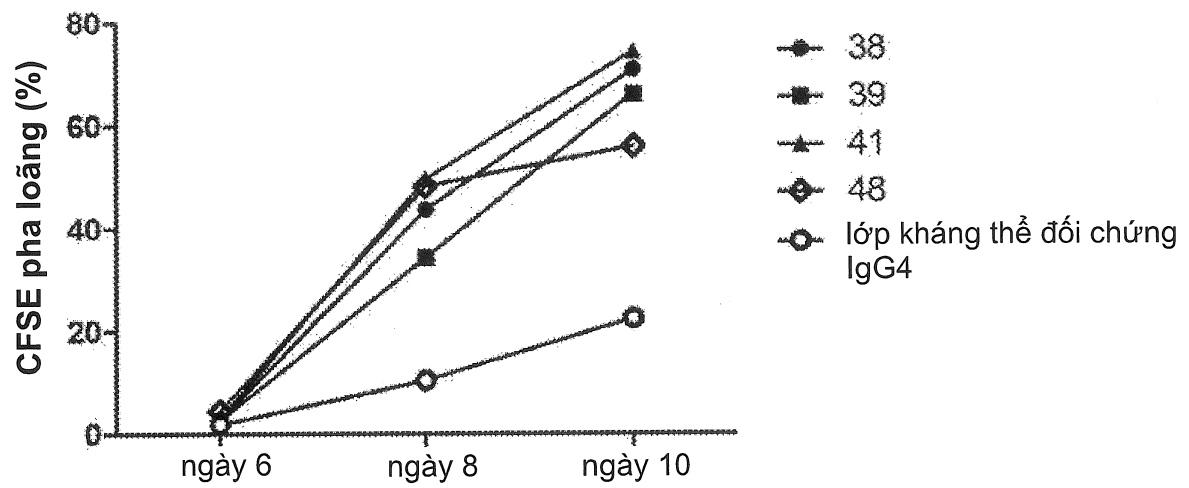


Fig.10

CEF peptit nhắc lại tăng sinh tế bào T

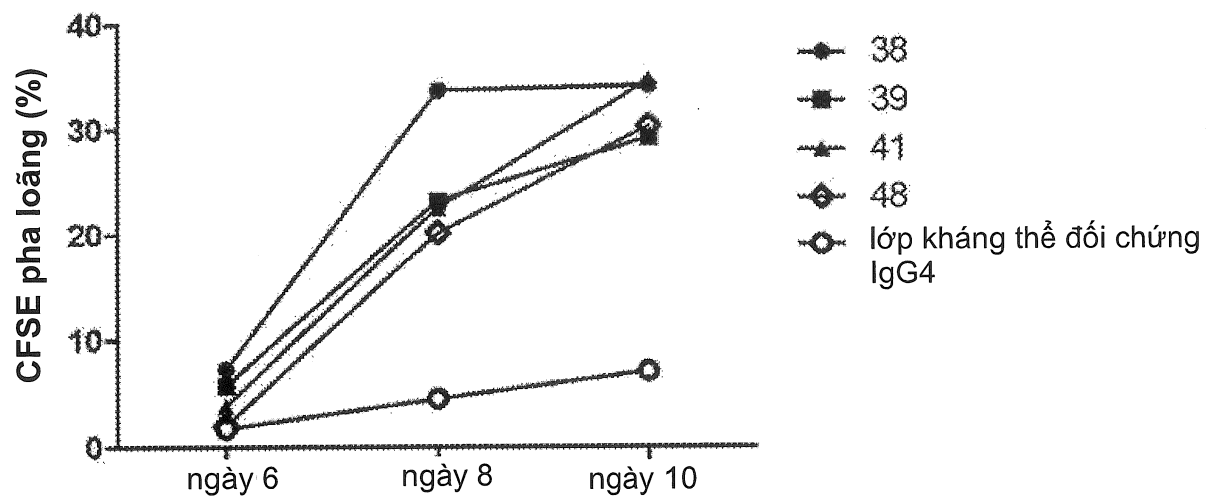


Fig.11