



(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)



1-0028320

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 35/00; C12N 15/81; (13) B
C12N 1/21; C12N 15/13; C12N 15/70;
A61K 39/395; C12N 1/19

(21) 1-2016-02529

(22) 14/11/2014

(86) PCT/CN2014/091090 14/11/2014

(87) WO 2015/085847 18/06/2015

(30) 201310681942.6 12/12/2013 CN

(45) 25/05/2021 398

(43) 25/11/2016 344A

(73) 1. Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd. (CN)

279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China

2. Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd. (CN)

No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone

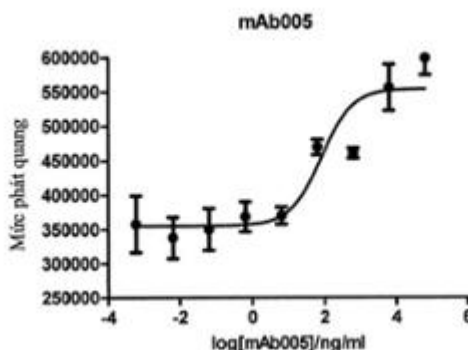
Lianyungang, Jiangsu 222047, China

(72) YUAN, Jijun (CN); QU, Xiangdong (US); LIN, Jufang (CN); YE, Xin (CN); CAO, Guoqing (US); TAO, Weikang (US); ZHANG, Lianshan (US); ZHANG, Lei (CN); YANG, Li (CN).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 HOẶC MẢNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể PD-1 của người, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và còn đề cập đến kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity-determining region: CDR) của kháng thể, và được phẩm chứa kháng thể PD-1 của người và mảnh liên kết kháng nguyên của nó.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể PD-1, mảnh liên kết kháng nguyên PD-1, kháng thể khảm và các kháng thể được làm tương thích với người chứa CDR của kháng thể PD-1, cũng như được phẩm chứa kháng thể PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Liệu pháp miễn dịch điều trị khối u là điểm nóng trong lĩnh vực điều trị khối u trong thời gian dài, liệu pháp miễn dịch ung thư kết hợp tế bào T nằm ở vị trí trung tâm. Liệu pháp miễn dịch điều trị khối u tác động đến các khối u bằng cách sử dụng và huy động đầy đủ các lympho bào T gây độc tế bào ở các bệnh nhân có khối u; liệu pháp này có thể là cách hữu hiệu và an toàn nhất để điều trị bệnh ung thư. Đồng thời, sự lẫn tránh của khối u là trở ngại lớn mà liệu pháp miễn dịch điều trị khối u phải đối mặt, trong đó các tế bào ung thư thúc đẩy sự phát triển nhanh chóng của khối u thông qua tác động ức chế của nó đối với hệ miễn dịch.

Có mối quan hệ cực kỳ phức tạp giữa cơ chế lẫn tránh miễn dịch của khối u và đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với các khối u. Trong giai đoạn đầu của liệu pháp miễn dịch điều trị khối u, các tế bào T tiêu diệt đặc hiệu khối u có hoạt tính sinh học, nhưng chúng mất chức năng tiêu diệt ở giai đoạn cuối của quá trình phát triển khối u. Do đó, liệu pháp miễn dịch điều trị khối u là làm tăng cường tối đa đáp ứng của hệ miễn dịch của bệnh nhân đối với khối u. Chìa khóa của liệu pháp miễn dịch điều trị khối u không chỉ là hoạt hóa đáp ứng của hệ miễn dịch hiện có mà còn là duy trì thời gian và cường độ đáp ứng của hệ miễn dịch.

Sự hoạt hóa tế bào T của người in vivo được thực hiện bằng hệ thống hai con đường truyền tín hiệu mà không chỉ cần đưa peptit kháng nguyên-MHC đến các tế bào T qua các tế bào trình diện kháng nguyên để tạo ra tín hiệu thứ nhất, mà còn cần chuỗi các phân tử đồng kích thích để tạo ra tín hiệu thứ hai, và sau đó các tế bào T biểu hiện đáp ứng miễn dịch thông thường. Hệ truyền tín hiệu kép này đóng vai trò sống còn đối với sự cân bằng của hệ miễn dịch, và điều hòa một cách nghiêm ngặt các đáp ứng miễn dịch khác nhau được kích thích bởi các kháng nguyên nội sinh và ngoại sinh. Sự vắng mặt tín hiệu thứ hai được tạo ra bởi các phân tử đồng kích thích sẽ dẫn đến việc không có đáp ứng hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào T đặc hiệu kéo dài, kết quả là dẫn đến sự dung nạp. Do đó, con đường tín hiệu thứ hai đóng vai trò điều hòa chính trong toàn bộ quá trình đáp ứng miễn dịch.

Thụ thể quy định sự chết theo chương trình của tế bào-1 (Programmed death-1: PD-1), được phát hiện vào năm 1992, là thụ thể protein được biểu hiện ở bề mặt tế bào T, và có liên quan đến sự chết tế bào theo chương trình. PD-1 thuộc họ CD28, biểu thị mức độ tương đồng về trình tự axit amin là 23% so với kháng nguyên lympho bào T gây độc tế bào 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen - CTLA-4), nhưng chủ yếu được biểu hiện ở các tế bào T, tế bào B và tế bào tủy được hoạt hóa, khác với CTLA. PD-1 có hai phối tử lần lượt là PD-L1 và PD-L2. PD-L1 được biểu hiện chủ yếu ở các tế bào T, các tế bào B, các đại thực bào, và các tế bào đuôi gai (dendritic cell: DC), và sự biểu hiện được điều hòa tăng cường ở các tế bào được hoạt hóa. Sự biểu hiện của PD-L2 chủ yếu được giới hạn ở các tế bào trình diện kháng nguyên, như các tế bào đuôi gai và các đại thực bào được hoạt hóa.

Các nghiên cứu mới đã phát hiện mức biểu hiện cao của protein PD-L1 trong các mô khối u của người như các khối u ung thư vú, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột, ung thư thận, u melanin và các ung thư khác, và các mức biểu hiện của PD-L1 này có liên quan chặt chẽ với tình trạng lâm sàng và tiên lượng bệnh của bệnh nhân. Để PD-L1 ức chế sự tăng sinh tế bào T qua con đường truyền tín hiệu thứ hai, sự phong bế liên kết của PD-L1/PD-1 trở thành đích rất hứa hẹn trong lĩnh vực liệu pháp miễn dịch điều trị khối u.

Hiện tại, có một số hãng dược đa quốc gia đã nghiên cứu các kháng thể đơn dòng kháng PD-1, kháng thể này tối đa hóa đáp ứng tự miễn dịch của bệnh nhân đối với khối u bằng cách phong bế liên kết của PD-L1/PD-1, và tiếp đó đạt được mục đích tiêu diệt đối với các tế bào khối u, xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2009114335. Trong các kết quả lâm sàng của các kháng thể đơn dòng PD-1 của BMS và Merck, tỷ lệ đáp ứng nhất định đã quan sát được trên bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, u melanin và caxinom thận, và tỷ lệ đáp ứng này biểu hiện mối tương quan đặc biệt cao với sự biểu hiện PD-L1 ở các khối u, điều này gợi ý rằng kháng thể PD-1 có tác dụng tích cực đối với các khối u.

Sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 có ái lực cao, độ chọn lọc cao, và hoạt tính sinh học cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa ít nhất một LCDR được chọn từ các trình tự như được thể hiện trong: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8; và

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa ít nhất một HCDR được chọn từ các trình tự như được thể hiện trong: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt như được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8; và trong đó

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây, kháng thể này là kháng thể của chuột hoặc mảnh của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể của chuột hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, vùng biến đổi chuỗi nhẹ còn chứa FR chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể của chuột hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể của chuột hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, vùng biến đổi chuỗi nặng còn chứa FR chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của chuột hoặc biến thể của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể của chuột hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của chuột hoặc biến thể của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây, kháng thể là kháng thể khảm hoặc mảnh của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể khảm PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể khảm là SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể khảm PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể khảm là SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể khảm PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của người hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể khảm PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 mà không có ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) sau quá trình đột biến axit amin.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây, kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người còn chứa FR chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của người hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, trình tự FR chuỗi nhẹ của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người là thu được từ trình tự kết hợp của các chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV1-39 và JK4 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, bao gồm FR1, FR2 và FR3 của IGKV 1-39 và FR4 của JK4.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, trình tự của chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được thể hiện trên SEQ ID NO: 12 hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, biến thể của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người chứa phần đột biến 0 đến 10 axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, tốt hơn là A43S.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của người hoặc biến thể của nó.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, vùng biến đổi chuỗi nặng còn chứa FR

chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người, hoặc biến thể của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, trình tự FR chuỗi nặng của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người là thu được từ trình tự kết hợp của các chuỗi nặng dòng mầm của người IgHV3-7 và JH6 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13, bao gồm FR1, FR2 và FR3 của IgHV3-7 và FR4 của JH6.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây, trình tự của chuỗi nặng kháng thể được làm tương thích với người được thể hiện trên SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó; trong đó biến thể này tốt hơn là chứa phần đột biến 0 đến 10 axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nặng, tốt hơn nữa là G44R.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người PD-1 hoặc mảnh của nó được đề xuất ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, và tốt hơn là chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người mà không có ADCC, hoặc vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 mà không có ADCC (độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) sau quá trình đột biến axit amin. Tốt hơn là, biến thể này là đột biến vùng cố định chuỗi nặng mà gây ra sự suy giảm hoặc thiếu hụt ADCC, và tốt hơn nữa là N297A, L234A, L235A của IgG1, thể khảm IgG2/4, và F235E hoặc L234A/E235A của IgG4.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây, mảnh liên kết kháng nguyên là Fab, Fv, sFv hoặc F(ab')₂.

Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN mã hóa kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện chứa phân tử ADN như nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện như nêu trên.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, theo tế bào chủ được đề xuất ở đây, tế bào chủ là vi khuẩn, tốt hơn là *E. coli*.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, tế bào chủ được đề xuất ở đây là nấm men, tốt hơn là *Pichia pastoris*.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được nêu ở đây và tá được, chất pha loãng hoặc chất mang được dụng.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nêu trên, hoặc được phẩm chứa chúng, để bào chế thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn qua trung gian PD-1; trong đó bệnh này tốt hơn là bệnh ung thư, tốt hơn nữa là bệnh ung thư biểu hiện PD-L1; và bệnh ung thư này tốt hơn là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư thận, u melamin, và tốt nhất là bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, u melamin và bệnh ung thư thận.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị và phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn qua trung gian PD-1, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu trong điều trị của kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa kháng thể PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; trong đó bệnh này tốt hơn là bệnh ung thư, tốt hơn nữa là bệnh ung thư biểu hiện PD-L1; bệnh ung thư này tốt hơn là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư thận, u melamin, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, và tốt nhất là bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, u melamin và bệnh ung thư thận.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình thể hiện thử nghiệm sự tăng sinh tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người. Kết quả cho thấy rằng kháng thể PD-1 thử nghiệm mAb005 có thể kích thích một cách hữu hiệu sự tăng sinh của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người, với EC50 là 83ng/ml.

Fig.2 là hình thể hiện thử nghiệm tiết xytokin IFN- γ tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người. Kết quả cho thấy rằng kháng thể PD-1 thử nghiệm mAb005 có thể kích thích sự tăng sinh PBMC (các tế bào đơn nhân máu ngoại vi: peripheral blood mononuclear cell), và đồng thời kích thích một cách hữu hiệu sự tiết xytokin IFN- γ , với EC50 là 13ng/ml.

Fig.3 là hình thể hiện tác dụng ức chế của kháng thể PD-1 H005-1 đối với sự phát triển của các tế bào u thần kinh đệm.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi thể tích khối u sau khi điều trị.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện sự thay đổi trọng lượng của chuột sau khi điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Để hiểu sáng chế một cách dễ dàng hơn, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật nhất định được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa cụ thể đầu đó trong tài liệu này, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật khác được sử dụng ở đây đều có nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế đề cập.

Như được sử dụng ở đây, mã một ký tự và mã ba ký tự dùng cho các axit amin là như được mô tả trong J. biol. chem, 243, (1968) p3558.

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể" chỉ globulin miễn dịch, cấu trúc chuỗi bốn peptit được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau. Các vùng cố định chuỗi nặng của globulin miễn dịch khác nhau biểu thị các thành phần axit amin khác nhau và các thứ bậc khác nhau, nhờ đó trình diện các loại tính kháng nguyên khác nhau. Do đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm nhóm, hoặc được gọi là các lớp (isotype) globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, các chuỗi nặng của chúng lần lượt là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ . Theo thành phần axit amin của vùng bản lề của nó và số lượng và vị trí của các liên kết disulfua chuỗi nặng, cùng một kiểu Ig có thể được chia thành các phân nhóm khác nhau, ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc λ dựa trên các vùng cố định khác nhau. Mỗi Ig trong số năm Ig nêu trên có thể có chuỗi κ hoặc λ .

Theo sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nhẹ, vùng này bao gồm chuỗi κ , λ của chuột hoặc của người hoặc biến thể của chúng.

Theo sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được nêu ở đây còn chứa vùng cố định chuỗi nặng, vùng này bao gồm IgG1, 2, 3, 4 của chuột hoặc của người hoặc biến thể của chúng.

Trình tự gần đầu N của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, trình tự khoảng 110 axit amin thay đổi lớn, được biết như là vùng biến đổi (vùng V); phần còn lại của trình tự axit amin gần đầu C là tương đối ổn định, được biết như là vùng cố định (vùng C). Vùng biến đổi bao gồm ba vùng siêu biến (hypervariable region: HVR) và bốn vùng khung (framework

region: FR) có trình tự được bảo toàn một cách tương đối. Ba vùng siêu biến quyết định tính đặc hiệu của kháng thể, còn được biết như là vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region: LCVR) và mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region: HCVR) bao gồm ba CDR và bốn FR, với thứ tự lần lượt từ đầu amin đến đầu carboxyl là: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Ba CDR chuỗi nhẹ là LCDR1, LCDR2, và LCDR3; ba CDR chuỗi nặng là HCDR1, HCDR2 và HCDR3. Số lượng và vị trí của các gốc axit amin CDR trong LCVR và HCVR của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên ở đây tương ứng với các tiêu chuẩn đánh số Kabat đã biết (LCDR1-3, HCDE2-3), hoặc tương ứng với tiêu chuẩn đánh số kabat và chothia (HCDR1).

Thuật ngữ "kháng thể của chuột" trong sáng chế chỉ kháng thể đơn dòng PD-1 kháng người được tạo ra dựa vào kiến thức và trình độ chuyên môn trong lĩnh vực này. Trong quá trình tạo kháng thể, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên PD-1, và sau đó thể lai biểu hiện kháng thể mà có trình tự hoặc các đặc tính chức năng mong muốn được tách ra. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể PD-1 của chuột hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn chứa vùng cố định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của chúng, hoặc còn chứa vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của chuột, hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể khảm", là kháng thể mà được tạo ra bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể của chuột với vùng cố định của kháng thể của người, kháng thể khảm có thể làm giảm đáp ứng miễn dịch được gây ra bởi kháng thể của chuột. Để thiết lập kháng thể khảm, thể lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu của chuột được thiết lập đầu tiên, gen vùng biến đổi được tách dòng ra khỏi các tế bào thể lai của chuột, sau đó gen vùng cố định của kháng thể của người được tách dòng nếu muốn, gen vùng biến đổi của chuột được nối vào gen vùng cố định của người để tạo ra gen khảm mà có thể được lồng vào vectơ của người, và cuối cùng là phân tử kháng thể khảm được biểu hiện trong hệ tế bào có nhân điển hình hoặc hệ tế bào không nhân trong công nghiệp. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể khảm PD-1 còn chứa FR chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột hoặc biến thể của chúng, và trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể khảm PD-1 còn chứa FR chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của chuột hoặc biến thể của chúng, và trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trên SEQ ID NO: 10. Vùng cố định của kháng thể của người được chọn từ vùng cố định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc

vùng cố định chuỗi nặng của IgG1 mà không có ADCC (độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) sau quá trình đột biến axit amin.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", còn được biết như là kháng thể được ghép CDR, chỉ kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR của chuột vào khung vùng biến đổi của kháng thể của người, cụ thể là, trình tự của khung kháng thể dòng mầm của người thuộc kiểu khác. Kháng thể được làm tương thích với người khắc phục tính đáp ứng kháng thể mạnh đến mức bất lợi gây ra do kháng thể khảm, là kháng thể mang lượng lớn các thành phần protein của chuột. Các trình tự khung này có thể thu được từ cơ sở dữ liệu ADN đã biết gồm cả các trình tự gen kháng thể dòng mầm hoặc từ các tài liệu tham khảo đã được công bố. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm của các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (có sẵn trên trang web www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), cũng như có thể tìm thấy trong tài liệu của Kabat, EA, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, tái bản lần thứ 5. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các trình tự CDR của chuột của kháng thể được làm tương thích với người PD-1 được chọn từ SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Các khung vùng biến đổi kháng thể của người được thiết kế và chọn lọc sao cho trình tự FR chuỗi nhẹ của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể là thu được từ trình tự kết hợp của các chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV1-39 và JK4: SEQ ID NO: 14, bao gồm FR1, FR2 và FR3 của IGKV 1-39 và FR4 của JK4; trình tự FR chuỗi nặng của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể là thu được từ trình tự kết hợp của các chuỗi nặng dòng mầm của người IgHV3-7 và JH6: SEQ ID NO: 13, bao gồm FR1, FR2 và FR3 của IgHV3-7 và FR4 của JH6. Để tránh sự giảm hoạt tính trong quá trình giảm tính tạo miễn dịch, vùng biến đổi của kháng thể của người được đem đi gây đột biến ngược tối thiểu để duy trì hoạt tính.

Như được sử dụng ở đây, "mảnh liên kết kháng nguyên" chỉ mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')₂ có hoạt tính liên kết kháng nguyên, cũng như mảnh Fv mảnh sFv liên kết với PD-1 của người; chứa một hoặc nhiều vùng CDR của kháng thể nêu trong sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:3 đến SEQ ID NO:8. Mảnh Fv là mảnh kháng thể tối thiểu chứa vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và tất cả các vị trí liên kết kháng nguyên mà không chứa vùng cố định. Thông thường, kháng thể Fv còn chứa phần tử liên kết polypeptit nằm giữa các miền VH và VL, và có khả năng tạo thành cấu trúc cần để liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, các phần tử liên kết khác cũng có thể được sử dụng để liên kết các vùng biến đổi của hai kháng thể để tạo ra polypeptit, gọi là kháng thể đơn chuỗi hoặc Fv đơn chuỗi (single chain Fv: sFv). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "liên kết với PD-1", có nghĩa là tương tác với PD-1 của người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "yếu tố quyết định

kháng nguyên" theo sáng chế chỉ các vị trí ba chiều không liên tục trên kháng nguyên, nhận dạng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ADCC", cụ thể là độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, chỉ các tế bào biểu hiện các thụ thể Fc trực tiếp tiêu diệt các tế bào đích được bọc bởi kháng thể qua việc nhận dạng đoạn Fc của kháng thể. Chức năng tác động ADCC của kháng thể có thể được giảm xuống hoặc loại bỏ bằng cách cải biến đoạn Fc trong IgG. Sự cải biến chỉ các đột biến của vùng cố định chuỗi nặng của kháng thể, như các đột biến được chọn từ N297A, L234A, L235A trong IgG1; thể khảm IgG2/4; F235E, hoặc các đột biến L234A/E235A trong IgG4.

Như được sử dụng ở đây, protein dung hợp được mô tả trong sáng chế là sản phẩm protein thu được bằng cách đồng biểu hiện hai gen nhờ kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Protein dung hợp Fc miền ngoại bào PD-1 tái tổ hợp thu được bằng cách đồng biểu hiện miền ngoại bào PD-1 và mảnh Fc kháng thể của người bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Miền ngoại bào PD-1 chỉ phần PD-1 nằm ngoài màng tế bào, trình tự của vùng này là vùng đánh dấu của SEQ ID NO: 1 dưới đây.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên đã được biết rõ trong lĩnh vực này và có thể được thấy, ví dụ, trong tài liệu Hướng dẫn kỹ thuật thử nghiệm kháng thể (Antibody Experimental Technology Guide) của Cold Spring Harbor, Chương 5-8 và 15. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch bằng PD-1 của người, hoặc các mảnh của nó, và các kháng thể thu được sau đó có thể được hồi tính, tinh chế và giải trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Các mảnh liên kết kháng nguyên cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế được thực hiện các kỹ thuật di truyền để đưa một hoặc nhiều vùng khung (FR) của người vào CDR không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể thu được từ ImMunoGeneTics(IMG) qua trang web của công ty này tại địa chỉ <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ The Immunoglobulin FactsBook, 2001 ISBN 012441351. Đặc biệt là, dòng mầm FR chuỗi nhẹ để sử dụng trong kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm A3 và O2. Dòng mầm FR chuỗi nặng cụ thể để sử dụng trong kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm VH3-21 và VH3-23.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được thao tác di truyền theo sáng chế có thể được tạo ra và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự

cADN mã hóa chuỗi nặng (SEQ ID NO: 11) và chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 12) có thể được tách dòng và tái tổ hợp vào vector biểu hiện GS. Sau đó, vector biểu hiện globulin miễn dịch được tái tổ hợp có thể chuyển nhiễm một cách ổn định các tế bào CHO. Là phương pháp được khuyến nghị hơn thêm đã được biết rõ trong lĩnh vực này, sự biểu hiện các kháng thể trên động vật có vú sẽ dẫn đến sự glycosyl hóa, thường ở đầu N được bảo toàn ở mức độ cao trong vùng FC. Các dòng ổn định có thể thu được qua sự biểu hiện kháng thể liên kết một cách đặc biệt với PCSK9 của người. Các dòng dương tính có thể được mở rộng trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh để sản xuất kháng thể trong các thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường nuôi cấy, mà kháng thể được tiết vào đó, có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, môi trường này có thể được đưa một cách thuận tiện lên cột Protein A hoặc cột G Sepharose FF mà đã được làm cân bằng với dung dịch đệm tương thích. Cột được rửa để loại bỏ các thành phần liên kết không đặc hiệu. Kháng thể liên kết được rửa giải bằng gradien pH và các mảnh kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE, và sau đó được gom lại. Kháng thể có thể được lọc và cô bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Khối kết tụ hòa tan và các multimer có thể được loại bỏ một cách hữu hiệu bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm loại trừ theo kích cỡ hoặc trao đổi ion. Sản phẩm thu được có thể được cấp đông ngay lập tức, ví dụ ở -70°C , hoặc có thể được làm đông khô.

Kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng. Kháng thể đơn dòng hay mAb, như được sử dụng ở đây, chỉ kháng thể mà thu được từ dòng đơn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dòng tế bào nhân điển hình, dòng tế bào không nhân, hoặc dòng thực khuẩn thể bất kỳ. Các kháng thể đơn dòng và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể được tái tổ hợp, ví dụ, bằng các kỹ thuật thể lai, các kỹ thuật tái tổ hợp, các kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể, các kỹ thuật tổng hợp (ví dụ, ghép CDR), hoặc các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực này.

Việc "dùng" và "điều trị" khi được áp dụng cho động vật, người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, chỉ việc cho được chất, chất chẩn đoán, điều trị, hoặc chế phẩm ngoại sinh tiếp xúc với động vật, người, đối tượng, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học này. Việc "dùng" và "điều trị" có thể chỉ, ví dụ, các phương pháp điều trị, phương pháp được động học, phương pháp chẩn đoán, phương pháp nghiên cứu, và phương pháp thử nghiệm. Việc điều trị tế bào bao gồm cho chất phản ứng tiếp xúc với tế bào, cũng như cho chất phản ứng tiếp xúc với dịch, trong đó dịch này tiếp xúc với tế bào. Việc "dùng" và "điều trị" còn có nghĩa là điều trị in vitro và ex vivo, ví dụ, đối với tế bào, bằng chất phản ứng, hợp chất chẩn đoán, liên kết, hoặc bằng tế bào khác. "Điều trị", khi được áp dụng cho người, động vật, hoặc đối tượng nghiên cứu, chỉ việc điều trị chữa bệnh, biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn chặn, và các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

"Điều trị" chỉ việc dùng chất điều trị bệnh, như chế phẩm chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất liên kết theo sáng chế, ở bên trong hoặc ở bên ngoài cho bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà chất này có hoạt tính điều trị đã biết đối với các triệu chứng bệnh này. Thông thường, chất này được dùng với lượng hữu hiệu để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở cộng đồng hoặc bệnh nhân được điều trị, bằng cách gây ra sự thoái lui hoặc ức chế sự tiến triển của (các) triệu chứng này đến mức độ bất kỳ có thể đo được trên lâm sàng. Lượng chất điều trị bệnh mà hữu hiệu để làm giảm triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ (còn được gọi là "lượng hữu hiệu trong điều trị") có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh lý, tuổi tác, và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng được chất tạo ra đáp ứng mong muốn ở bệnh nhân. Việc triệu chứng bệnh đã được làm thuyên giảm hay chưa có thể được đánh giá bằng phương pháp đánh giá lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi các bác sỹ hoặc các nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe khác để đánh giá độ mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Mặc dù phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc vật sản xuất) có thể không hữu hiệu trong việc làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh cần quan tâm trên tất cả bệnh nhân nhưng nó sẽ làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh mục tiêu cần quan tâm trên số lượng bệnh nhân có ý nghĩa về mặt thống kê như được xác định bởi kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này như kiểm định Student's t, kiểm định Chi bình phương, kiểm định U theo Mann và Whitney, kiểm định Kruskal-Wallis (kiểm định H), kiểm định Jonckheere-Terpstra và kiểm định Wilcoxon.

"Các cải biến theo kiểu bảo toàn" hoặc "sự thay thế hoặc thế theo kiểu bảo toàn" chỉ sự thay thế các axit amin trong protein bằng các axit amin khác có các đặc tính tương tự (ví dụ, điện tích, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/tính ưa nước, cấu hình khung và tính cứng, v.v.), sao cho các thay đổi này có thể thường xuyên được thực hiện mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng, nói chung, sự thay thế axit amin đơn lẻ ở các vùng không thiết yếu của polypeptit gần như không làm thay đổi hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Ngoài ra, sự thay thế các axit amin tương tự về mặt cấu trúc hoặc chức năng ít có khả năng phá vỡ hoạt tính sinh học.

"Về cơ bản là gồm", hoặc các cụm từ tương tự được sử dụng trong suốt phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, chỉ việc bao gồm các yếu tố hoặc nhóm các yếu tố được nêu bất kỳ, và bao gồm tùy ý các yếu tố khác có bản chất tương tự hoặc khác với các yếu tố được nêu, các yếu tố này không làm thay đổi một cách thiết yếu các tính chất cơ bản hoặc mới của chế độ liều quy định, phương pháp, hoặc chế phẩm. Là ví dụ không giới hạn, hợp chất liên kết mà về cơ bản là gồm trình tự axit amin được nêu có thể còn bao gồm một hoặc nhiều axit amin mà không

ảnh hưởng một cách thiết yếu đến các tính chất của hợp chất liên kết.

"Lượng hữu hiệu" bao gồm lượng đủ để làm cải thiện hoặc ngăn ngừa triệu chứng hoặc dấu hiệu của tình trạng bệnh lý. Lượng hữu hiệu còn chỉ lượng đủ để cho phép hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc chẩn đoán. Lượng hữu hiệu đối với đối tượng là bệnh nhân hoặc thú y cụ thể có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh được điều trị, tình trạng sức khỏe chung của bệnh nhân, đường dùng và liều dùng và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ. Lượng hữu hiệu có thể là liều tối đa hoặc phương thức dùng liều mà tránh các tác dụng phụ hoặc các tác động gây độc đáng kể.

"Ngoại sinh" chỉ các chất mà được sinh ra bên ngoài sinh vật, tế bào, hoặc cơ thể người, tùy thuộc vào văn cảnh. "Nội sinh" chỉ các chất mà được sinh ra bên trong tế bào, sinh vật, hoặc cơ thể người tùy thuộc vào văn cảnh.

"Tính tương đồng" chỉ mức độ tương tự về trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai polypeptit. Nếu vị trí ở cả hai trình tự được so sánh được chiếm bởi cùng một cấu trúc dưới phân tử là monome bazơ hoặc monome axit amin, ví dụ, nếu vị trí trong mỗi trong số hai phân tử ADN được chiếm bởi adenin, thì các phân tử là tương đồng ở vị trí đó. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm số của số vị trí khớp nhau hoặc vị trí tương đồng có chung giữa hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh $\times 100$. Ví dụ, nếu 6 trong số 10 vị trí trong hai trình tự là khớp nhau hoặc tương đồng với nhau khi các trình tự được sắp thẳng trình tự một cách tối ưu, thì hai trình tự có mức tương đồng là 60%. Nói chung, sự so sánh được thực hiện khi hai trình tự được sắp thẳng để cho phần trăm mức tương đồng là tối đa.

Như được sử dụng ở đây, các từ "tế bào", "dòng tế bào", và "dịch nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế nhau và tất cả các cụm từ này đều bao gồm cả thể hệ con. Do đó, các từ "thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp" bao gồm tế bào chủ thể sơ cấp và các dịch nuôi cấy thu được từ đó mà không xem xét đến số lần chuyển. Cũng cần hiểu rằng tất cả các thể hệ con có thể không giống nhau một cách chính xác về phần ADN, do sự đột biến có chủ ý hoặc không có chủ ý. Thể hệ con đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu là nằm trong định nghĩa về các cụm từ này. Trường hợp thuật ngữ khác biệt được dự tính thì nó sẽ được nêu rõ ràng từ văn cảnh cụ thể.

Như được sử dụng ở đây, "phản ứng chuỗi polymeraza" hoặc "PCR" (polymerase chain reaction) chỉ quy trình hoặc kỹ thuật trong đó các lượng nhỏ của phần đặc hiệu của axit nucleic, ARN và/hoặc ADN, được khuếch đại như được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 4,683,195. Nói chung, thông tin trình tự từ các đầu của vùng quan tâm hoặc xa hơn cần phải

có sẵn, sao cho các đoạn mồi oligonucleotit có thể được tạo ra; các đoạn mồi này sẽ giống hoặc tương tự về trình tự với các sợi tương ứng của khuôn cần khuếch đại. Các nucleotit đầu 5' của hai đoạn mồi có thể giống với các đầu của vật liệu cần khuếch đại. PCR có thể được sử dụng để khuếch đại các trình tự ARN đặc hiệu, trình tự ADN đặc hiệu từ ADN hệ gen tổng thể, và cADN được phiên mã từ các trình tự ARN tế bào tổng thể, thực khuẩn thể hoặc plasmid, v.v. Nói chung, xem các ấn phẩm Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). Như được sử dụng ở đây, PCR được xem như là một, nhưng không phải duy nhất, ví dụ về phương pháp phản ứng axit nucleic polymeraza để khuếch đại các mẫu thử nghiệm axit nucleic, bao gồm việc sử dụng axit nucleic đã biết làm đoạn mồi và axit nucleic polymeraza để khuếch đại hoặc tạo ra phân đặc hiệu của axit nucleic.

“Tùy ý” hoặc “một cách tùy ý” có nghĩa là sự việc hoặc tình huống theo sau có thể nhưng không nhất thiết phải xảy ra, và phần mô tả sáng chế bao gồm các trường hợp trong đó sự việc hoặc tình huống xảy ra hoặc không xảy ra. Ví dụ, “tùy ý chứa 1 đến 3 vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể” có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể với trình tự đặc hiệu có thể, nhưng không nhất thiết phải có mặt.

“Dược phẩm” chỉ chế phẩm chứa hỗn hợp của một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế hoặc muối hoặc tiền dược chất chấp nhận được về mặt sinh lý/dược dụng của chúng cùng với các thành phần hóa học khác, cũng như các thành phần bổ sung như các chất mang và tá dược chấp nhận được về mặt sinh lý/dược dụng. Dược phẩm nhằm thúc đẩy việc sử dụng cho sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thụ thành phần hoạt tính và nhờ đó tạo ra tác dụng sinh học.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả thêm bằng cách viện dẫn đến các ví dụ; tuy nhiên, phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở đó. Trong các ví dụ của sáng chế, khi các điều kiện cụ thể không được mô tả, nói chung, các thử nghiệm được thực hiện ở các điều kiện thông thường như được mô tả trong các ấn phẩm Antibody Technology Laboratory Manual and Molecular Cloning Manual của Cold Spring Harbor, hoặc ở các điều kiện được nhà sản xuất vật liệu hoặc sản phẩm đề xuất. Nếu nguồn chất phản ứng không được quy định một cách cụ thể thì các chất phản ứng là các chất phản ứng thông thường có trên thị trường.

Ví dụ 1: Tạo kháng thể

Các kháng thể đơn dòng của chuột kháng PD-1 của người được tạo ra. Protein dung hợp Fc miền ngoại bào PD-1 tái tổ hợp được tinh chế (PD-1 Fc) (SEQ ID NO: 1); hoặc các tế bào CHO được chuyển nhiễm bằng PD-1 (SEQ ID NO: 2) được sử dụng làm kháng nguyên để gây miễn dịch ở chuột Balb/C và chuột SJL. Kháng nguyên PD-1 của người được mua từ ORIGENE, Cat No. SC117011, Trình tự tham chiếu NCBI: NM_005018.1.

PD-1 Fc, protein dung hợp Fc miền ngoại bào PD-1 tái tổ hợp (SEQ ID NO: 1):

MDMRVPAOLLGLLLWFPGSRCPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFOTLVYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK .

PD-1, kháng nguyên PD-1 chuyển nhiễm vào tế bào (SEQ ID NO: 2):

MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFT
 CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
 MSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
 AGQFQTLVVGVLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAV
 PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGP
 RSAQPLRPEDGHCSWPL .

Việc gây miễn dịch bằng protein dung hợp Fc-miền ngoại bào PD-1 được chia thành liều cao (50ug) và liều thấp (10ug) của kháng nguyên đã được tinh chế, việc gây miễn dịch bằng các tế bào CHO được chuyển nhiễm PD-1 sử dụng $0,5-1 \times 10^7$ tế bào. Việc gây miễn dịch được thực hiện lần lượt vào ngày 0, 14, và 35 với tá chất Freund hoàn chỉnh; máu được lấy mẫu ở vị trí sau hốc mắt để giám sát đáp ứng miễn dịch. Chuột với hiệu giá globulin miễn dịch của người kháng PD-1 thu được bằng phương pháp ELISA sàng lọc huyết tương. Vào ngày 56, chuột có hiệu giá globulin miễn dịch của người kháng PD-1 cao nhất được đem đi gây miễn dịch tăng cường. 3 ngày sau, chuột bị giết và lá lách được lấy để tiến hành dung hợp. Các thể dung hợp lai được sàng lọc và kháng thể đơn dòng của chuột mAb005 được thu nhận. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng chuột mAb005 là như sau:

mAb005 HCVR

EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYMSWVRQTPEKRLEWVATISG
 GGANTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDALYYCARQLYYFDYW
 GQGTTLTVSS

SEQID NO: 9

mAb005 LCVR

DIQMTQSPASQSASLGEGVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKSPQLLIYTATSLA
 DGVPSRFSGSGSGTKFSFKISLQAEDFVITYCQQVYSIPWTFGGGKLEIK

SEQID NO: 10

Các trình tự CDR là như sau:

Tên	Trình tự	Số
HCDR1	SYMMS	SEQID NO: 3
HCDR2	TISGGGANTYYPDSVKG	SEQID NO: 4
HCDR3	QLYYFDY	SEQID NO: 5
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQID NO: 6
LCDR2	TATSLAD	SEQID NO: 7
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQID NO: 8

Ví dụ 2: Sàng lọc kháng thể

Thử nghiệm ELISA liên kết kháng thể PD-1 in vitro:

Kháng thể PD-1 phong bế con đường truyền tín hiệu của PD-1 và phối tử của nó bằng cách liên kết với miền ngoại bào PD-1. Thử nghiệm ELISA in vitro được sử dụng để phát hiện đặc tính liên kết của kháng thể PD-1. Protein dung hợp FC miền ngoại bào PD-1 (PD-1 FC) được biotin hóa được phủ lên các đĩa 96 lỗ bằng cách liên kết với avidin trung hòa. Cường độ tín hiệu sau khi bổ sung kháng thể được sử dụng để xác định đặc tính liên kết của kháng thể và PD-1.

Avidin trung hòa (liên kết với biotin) được pha loãng đến nồng độ 1 µl/ml bằng dung dịch đệm PBS, được đưa bằng pipet vào đĩa 96 lỗ với lượng 100 µl/lỗ và để yên trong 16 đến 20 giờ ở 4°C. Đĩa 96 lỗ được rửa một lần bằng PBST (PBS pH=7,4, chứa tween20 0,05%) sau khi loại bỏ dung dịch đệm PBS, sau đó đĩa này được ủ và phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng cùng với việc bổ sung PBST/1% sữa với lượng 120 µl/lỗ. Sau khi loại bỏ dung dịch phong bế, đĩa được rửa bằng dung dịch đệm PBST, sau đó bổ sung 1 µg/ml PD1-FC được đánh dấu bằng biotin đã được pha loãng bằng PBST/1% sữa, và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ dung dịch phong bế, đĩa này được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBST,

sau đó bổ sung kháng thể PD-1 thử nghiệm đã được pha loãng đến nồng độ thích hợp bằng PBST/1% sữa, và ủ trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ hệ phản ứng, đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBST, sau đó bổ sung kháng thể thứ cấp kháng chuột được đánh dấu HRP (The Jackson Laboratory) đã được pha loãng bằng PBST/1% sữa với lượng 100 μ l/lỗ, và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi được rửa ba lần bằng PBST, đĩa được bổ sung TMB với lượng 100 μ l/lỗ, và ủ trong 5 đến 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ 1M với lượng 100 μ l/lỗ. Trị số hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa NOVOSTar; trị số EC₅₀ liên kết ELISA được tính.

Kháng thể thử nghiệm	ELISA, EC ₅₀ ,nM	
	PD-1 của người	PD-1 của khỉ cyno
mAb005	0,25	0,27

Kết quả chứng minh rằng kháng thể mAb005 thể hiện hoạt tính liên kết tuyệt vời đối với PD-1Fc của người (PD-1 của người) và PD-1Fc của khỉ cynomolgus (PD-1 của khỉ cyno).

Thử nghiệm phong bế liên kết in vitro của kháng thể PD-1 và phối tử PD-1:

PD-L1 trên bề mặt của tế bào khối u biểu hiện tác dụng ngăn chặn sự tăng sinh của các tế bào T bằng cách liên kết với PD-1 trên bề mặt của tế bào T. Kháng thể PD-1 phong bế con đường truyền tín hiệu PD-L1/PD-1 bằng cách liên kết với PD-1 để kích thích sự tăng sinh tế bào T. Thử nghiệm phong bế liên kết PD-1/PD-L1 được sử dụng để phát hiện hoạt tính phong bế của kháng thể PD-1 đối với con đường truyền tín hiệu.

Trong thử nghiệm này, đĩa 96 lỗ được phủ protein PD-1 có miền ngoại bào được dung hợp với FC (PD-1-FC), và được ủ bằng kháng thể PD-1 thử nghiệm; PD-L1 được đánh dấu biotin sau đó được bổ sung vào để ủ. Sau khi rửa đĩa, lượng liên kết của PD-L1 được đánh dấu biotin được phát hiện; trị số IC₅₀ phong bế của kháng thể PD-1 đối với sự liên kết phối tử PD-L1 được tính.

PD-1-FC được pha loãng đến nồng độ 1 μ g/ml bằng dung dịch đệm CB có độ pH bằng 9,6 (1,59g Na₂CO₃ và 2,93g NaHCO₃ được hòa tan trong 1L nước cất), được đưa vào đĩa 96 lỗ bằng pipet với lượng 100 μ l/lỗ và để yên trong 16 đến 20 giờ ở 4°C. Đĩa 96 lỗ này được rửa một lần bằng PBST (PBS có độ pH bằng 7,4, chứa tween20 0,05%) sau khi dung dịch đệm PBS được loại bỏ, sau đó đĩa được ủ và phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với

PBST/1% sữa với lượng 120 μ l/lỗ. Sau khi loại bỏ dung dịch phong bế, đĩa được rửa một lần bằng dung dịch đệm PBST, sau đó bổ sung 90 μ l kháng thể PD-1 thử nghiệm đã được pha loãng đến nồng độ thích hợp bằng chất pha loãng mẫu (PBS có độ pH bằng 7,4 chứa BSA 5%, Tween20 0,05%), và ủ trong 1 giờ ở 4°C. Sau đó, các nồng độ theo cấp số nhân 10 của PD-L1 được đánh dấu biotin (Beijing Sino Biological Inc.) (10 μ g/ml) được bổ sung vào đĩa với lượng 10 μ l/lỗ, lắc nhẹ và trộn bằng máy lắc, và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi loại bỏ hệ phản ứng, đĩa được rửa 6 lần bằng dung dịch đệm PBST, sau đó bổ sung Streptavidin – Peroxidaza Polyme đã được pha loãng bằng PBST với tỷ lệ 1:400 với lượng 100 μ l/lỗ, và ủ trong điều kiện lắc nhẹ trong 50 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi được rửa 6 lần bằng PBST, đĩa được bổ sung TMB với lượng 100 μ l/lỗ, và ủ trong 5 đến 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ 1M với lượng 100 μ l/lỗ. Trị số hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa NOVOSTar; trị số IC₅₀ phong bế của PD-1 đối với liên kết phối tử PD-L1 được tính.

Kháng thể thử nghiệm	Thử nghiệm phong bế liên kết phối tử (LBB)
	IC ₅₀ , nM
mAb005	1,13

Kết quả thể hiện rằng kháng thể mAb005 là rất hữu hiệu để phong bế liên kết của PD-L1 với PD-1.

Ví dụ 3: Thử nghiệm độ chọn lọc liên kết của kháng thể PD-1 in vitro

Để phát hiện hoạt tính liên kết đặc hiệu của kháng thể PD-1 đối với các protein khác của họ PD-1, CTLA4 của người và CD28 của người được sử dụng cho các thử nghiệm liên kết. Trong khi đó, PD-1 của chuột cũng được sử dụng cho các thử nghiệm liên kết để xác định tính đa dạng của kháng thể PD-1 đối với các loài khác ngoài người/khỉ.

Các protein liên kết chọn lọc: PD-1 của người, ICOS của người, CTLA4 của người, CD28 của người và PD-1 của chuột, (Beijing Sino Biological Inc.), lần lượt được pha loãng đến nồng độ 1 μ g/ml bằng dung dịch đệm PBS, được đưa vào đĩa 96 lỗ bằng pipet với lượng 100 μ l/lỗ và để yên trong 16 đến 20 giờ ở 4°C. Đĩa 96 lỗ được rửa một lần bằng PBST (PBS có độ pH bằng 7,4, chứa tween20 0,05%) sau khi dung dịch đệm PBS được loại bỏ, sau đó

đĩa được ủ và phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng PBST/1% sữa với lượng 120 μ l/lỗ. Sau khi loại bỏ dung dịch phong bế, đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBST, sau đó bổ sung kháng thể PD-1 thử nghiệm, và ủ trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ hệ phản ứng, đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, sau đó bổ sung kháng thể thứ cấp kháng chuột được đánh dấu HRP (The Jackson Laboratory) mà đã được pha loãng bằng PBST/1% sữa với lượng 100 μ l/lỗ, và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, sau đó bổ sung TMB với lượng 100 μ l/lỗ, và ủ trong 5 đến 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ 1M với lượng 100 μ l/lỗ. Trị số hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa NOVOSTar.

Kháng thể thử nghiệm	PD1-FC của người	PD1-Fc của chuột	ICOS/Fc của người	CTLA4 của người	CD28 của người
mAb005	2,64	0,07	0,15	0,17	0,12

Kết quả chứng minh rằng kháng thể mAb005 thể hiện là không có hoạt tính liên kết đặc hiệu với các protein khác của họ PD-1. Trong khi đó, mAb không có tính phản ứng chéo giữa các loài đối với PD-1 của chuột.

Ví dụ 4: Thử nghiệm liên kết tế bào in vitro của kháng thể PD-1

FACS (fluorescence-activated cell sorter: phương pháp sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang) là phương pháp thử nghiệm để phát hiện sự tương tác của các protein và các tế bào. Thử nghiệm này được sử dụng để phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể PD-1 đối với PD-1 nguyên thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Các tế bào được sử dụng trong thử nghiệm này là các tế bào CHO biểu hiện PD-1 ở mức cao (xem Ví dụ 1, các tế bào CHO được chuyển nhiễm bằng PD-1 (SEQ ID NO: 2)).

Các tế bào CHO biểu hiện PD-1 ở mức cao được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, và viên kết được thu gom và tạo huyền phù bằng 10 đến 15ml dòng dung dịch đệm đã được làm lạnh sơ bộ để đếm tế bào. Các tế bào được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong các ống ly tâm dung tích 50ml trong 5 phút và được thu gom. Sau khi loại bỏ chất nổi bề mặt, viên kết được tái tạo huyền phù bằng dung dịch đệm phong bế đã được làm lạnh sơ bộ với mật độ 0,5 đến 1,0 $\times 10^7$ tế bào/ml. Sau khi ủ ở 4°C trong 30 phút, dịch được tái tạo huyền phù được đưa bằng pipet vào đĩa 96 lỗ với lượng 100 μ l/lỗ. Đĩa 96 lỗ này được ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút trong 5 phút, chất nổi bề mặt được gạt bỏ. Bổ sung 100 μ l kháng thể sơ cấp vào mỗi lỗ; các tế bào được tái tạo huyền phù, và ủ trong bóng tối trong 60 phút ở 4°C. Sau

khi ly tâm và gạn chất nổi bề mặt, bổ sung 100 μ l kháng thể thứ cấp được đánh dấu FITC (BD Biosciences) đã được pha loãng với tỷ lệ 1:400. Các tế bào được tái tạo huyền phù và ủ trong bóng tối trong 60 phút ở 4°C. Rửa các tế bào hai lần bằng dung dịch đệm, tái tạo huyền phù và cố định bằng dung dịch paraformaldehyt 1% để dùng cho thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy.

Kháng thể thử nghiệm	MFI			
	50nM	5nM	0,5nM	0,05nM
mAb005	468	319	71,2	14

Kết quả thể hiện rằng kháng thể mAb005 cũng có thể liên kết với PD-1 trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 5: Thử nghiệm ái lực và động lực liên kết in vitro

Phương pháp Biacore là phương pháp thử nghiệm được thừa nhận mà phát hiện một cách khách quan động học và ái lực tương tác của protein. Các tác giả đã phân tích động học liên kết và ái lực đặc trưng của kháng thể PD-1 thử nghiệm theo sáng chế bằng phương pháp Biacore (GE).

Theo hướng dẫn của bộ kit do Biacore cung cấp, kháng thể PD-1 thử nghiệm theo sáng chế được liên kết cộng hóa trị với chip CM5 (GE) bằng cách sử dụng phương pháp kết hợp amin chuẩn. Sau đó, dãy gradien nồng độ của protein His PD-1 (Beijing Sino Biological Inc.), mà được pha loãng trong cùng một dung dịch đệm, lần lượt được nạp vào mỗi chu trình. Sau đó, các mẫu được hoàn nguyên bằng chất phản ứng hoàn nguyên trong bộ kit này. Động học liên kết kháng nguyên-kháng thể được theo dõi trong 3 phút và động học phân ly được theo dõi trong 10 phút. Dữ liệu thu được được phân tích bằng phần mềm GE's BIAevaluation sử dụng mô hình liên kết 1:1 (Langmuir). Các trị số K_a (kon), k_d (koff) và K_D được xác định bằng thử nghiệm được thể hiện trong bảng dưới đây.

Kháng thể thử nghiệm	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
mAb005	1,057E+5	3,769E-4	3,566E-9

Kết quả cho thấy rằng trị số K_d của liên kết của kháng thể mAb005 với PD-1 đạt đến mức 3,57nM.

Ví dụ 6: Thử nghiệm tế bào học in vitro

Thử nghiệm tăng sinh tế bào đơn nhân máu ngoại vi mới của người (PBMC-peripheral blood mononuclear cell) được tác động bởi kháng thể được sử dụng để phát hiện hoạt tính tế bào của kháng thể mAb005.

PBMC mới của người được điều chỉnh đến mật độ $2 \times 10^6/\text{ml}$, được gieo vào đĩa 6 lỗ với lượng 2ml/lỗ, và ủ trong 6 giờ ở 37°C , CO_2 5%. Sau khi các tế bào huyền phù được gạn bỏ, mỗi lỗ chứa các tế bào dính được trộn với 2ml môi trường RPMI1640 chứa GM-CSF 100ng/ml (granulocyte colony stimulating biological factor: nhân tố sinh học kích thích khuẩn lạc tế bào hạt) và IL-4 100ng/ml, và 1ml môi trường RPMI1640 chứa GM-CSF 100ng/ml và IL-4 100ng/ml sau khi ủ trong 2 ngày, sau đó các tế bào được nuôi cấy liên tục trong 2 ngày, sau đó bổ sung TNF- α 100ng/ml (yếu tố hoại tử khối u- α) vào mỗi lỗ, và nuôi cấy trong 2 ngày nữa để thu được các tế bào đuôi gai trưởng thành. Các tế bào đuôi gai và các tế bào T dị sinh lần lượt được ly tâm và tái tạo huyền phù ở nồng độ $1 \times 10^6/\text{ml}$ và $1 \times 10^5/\text{ml}$, và được đưa bằng pipet vào đĩa 96 lỗ với lượng 100 μl /lỗ, sau đó bổ sung kháng thể đã được pha loãng đến các gradien nồng độ khác nhau bằng PBS với lượng 20 μl /lỗ, và các tế bào được nuôi cấy trong tủ nuôi ở 37°C , CO_2 5% trong 5 ngày. Sau đó, 100 μl dịch nuôi cấy tế bào được lấy mẫu để phát hiện sự tăng sinh tế bào bằng kit thử nghiệm khả năng sống sót tế bào phát quang CellTiter-Glo®. Kết quả được thể hiện trên Fig.1, chỉ ra rằng kháng thể PD-1 thử nghiệm mAb005 có thể kích thích một cách hữu hiệu sự tăng sinh của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người, với EC50 bằng 83ng/ml. Mẫu còn lại được dùng để phát hiện khả năng tiết xytokin IFN- γ . Kết quả được thể hiện trên Fig.2, chứng minh rằng kháng thể PD-1 thử nghiệm mAb005 có thể kích thích sự tăng sinh PBMC, và đồng thời kích thích một cách hữu hiệu sự tiết xytokin IFN- γ , với EC50 bằng 13ng/ml.

Ví dụ 7: Làm cho kháng thể của chuột tương thích với người

Liên quan đến các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (mAb005 LCVR, SEQ ID NO: 10) và vùng biến đổi chuỗi nặng (mAb005 HCVR, SEQ ID NO: 9) của kháng thể mAb005, các khuôn được làm tương thích với người mà khớp nhất với phần không phải vùng quyết định tính hỗ trợ (non-CDR) của chúng trong cơ sở dữ liệu dòng mầm được chọn. Khuôn của chuỗi nặng kháng thể là IGHV3-7/JH6, chọn ra FR1, FR2, FR3 của chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV1-39 và FR4 của JK4, với trình tự SEQ ID NO: 13; khuôn của chuỗi nhẹ là IGKV1-39/JK4, chọn ra FR1, FR2, FR3 của chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV1-39, và FR4 của JK4, với trình tự SEQ ID NO: 14.

Khuôn của chuỗi nặng dòng mầm của người (SEQ ID NO: 13):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGTTV
TVSS;

Khuôn của chuỗi nhẹ dòng mầm của người (SEQ ID NO: 14):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFGGGTKVEIK .

CDR của kháng thể của chuột được ghép vào khuôn làm tương thích với người đã được chọn, thay thế CDR của khuôn của người, và sau đó được tái tổ hợp với vùng cố định IgG4 để thu được kháng thể được làm tương thích với người H005-1. Sau đó, dựa trên cấu trúc ba chiều của kháng thể của chuột, các phần gắn vào, các phần tương tác trực tiếp với CDR, và các phần mà ảnh hưởng đáng kể đến thể cấu tạo của VL và VH được đột biến ngược để thu được các kháng thể được làm tương thích với người H005-2, H005-3, và H005-4, các trình tự là như sau.

Sự biểu hiện kháng thể

H005-1 HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPD SVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHIAL
HNHYTQKSLSLGK

SEQID NO: 11

H005-1 LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA
DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQID NO: 12

Trình tự HC của kháng thể được làm tương thích với người H005-1 với CDR của chuột được ghép là (SEQID NO: 11), trình tự LC của kháng thể được làm tương thích với người là (SEQ ID NO: 12). Các vị trí mà có thể tác động đến hoạt tính của kháng thể được đem đi gây đột biến điểm, các trình tự là như sau:

	HC	LC
H005-1	SEQID NO: 11	SEQID NO: 12
H005-2	SEQID NO: 11, G44R	SEQID NO: 12
H005-3	SEQID NO: 11	SEQID NO: 12, A43S
H005-4	SEQID NO: 11, G44R	SEQID NO: 12, A43S

Các cADN được tổng hợp theo các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mỗi kháng thể được làm tương thích với người (SEQ NO 11, SEQ NO 12 và các biến thể của chúng). Sau khi các cADN được phân cắt bằng XhoI và BamHI, các mảnh cADN thu được được chèn vào các vector biểu hiện pcDNA3.1 (Life Technologies Cat. No.V790-20) ở các vị trí giới hạn BamHI/XhoI. Các vector biểu hiện và chất phản ứng chuyển nhiễm PEI (Polysciences, Inc. Cat. No.23966) được sử dụng để chuyển nhiễm các tế bào HEK293 (Life Technologies Cat. No. 11625019) với tỷ lệ 1: 2, và các tế bào được chuyển nhiễm này được ủ trong tủ nuôi CO₂ trong 4 đến 5 ngày. Các kháng thể được biểu hiện được thu hồi bằng cách ly tâm, và được tinh chế theo phương pháp thông thường để thu được các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế.

Ví dụ 8: Dữ liệu về hoạt tính của kháng thể được làm tương thích với người

Các kháng thể được làm tương thích với người được đưa vào thử nghiệm liên kết ELISA (phương pháp giống với phương pháp của Ví dụ 2), thử nghiệm phong bế liên kết phối tử (phương pháp giống với phương pháp của Ví dụ 2), và thử nghiệm động học ái lực (phương pháp giống với phương pháp của Ví dụ 5) in vitro. Kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây:

Kháng thể thử nghiệm	ELISA, EC50,nM	Thử nghiệm phong bế liên kết phối tử (LBB), IC50,nM	KD(M)
H005-1	0,11	1,27	2,79E-09
H005-2	0,14	1,27	2,98E-09
H005-3	0,15	1,33	2,45E-09
H005-4	0,14	1,36	3,89E-09

Kết quả chỉ ra rằng các kháng thể được làm tương thích với người H005-1, H005-2, H005-3 và H005-4 duy trì hoạt tính liên kết PD-1, với động học ái lực KD lần lượt là 2,79, 2,98, 2,45 và 3,89 nM. Đồng thời, tất cả các kháng thể được làm tương thích với người biểu

hiện một cách hữu hiệu hoạt tính phong bế đối với con đường PD-L1/PD-1.

Ví dụ 9: Ưc chế sự phát triển tế bào khối u nhờ kháng thể PD-1

1. Các vật liệu thử nghiệm:

Các tế bào U87MG (các tế bào u thần kinh đệm): được mua từ Ngân hàng tế bào của Viện khoa học Trung Quốc (Chinese Academy of Sciences Cell Bank), Cat. TCHu138;

Các PBMC (tế bào đơn nhân máu ngoại vi) được mua từ Trung tâm Máu Thượng Hải (Shanghai Blood Center);

CD3: được mua từ Miltenyi Biotec Cat No. 130-093-387;

CD28: được mua từ Miltenyi Biotec Cat No. 130-093-375;

Kit đếm tế bào-8: của DOJINDO LABORATORIES, Cat No. CK04;

mIgG (đối chứng âm): được mua từ SANTA CRUZ Cat No. sc-2025; sử dụng liều 1660ng/ml.

2. Các phương pháp thử nghiệm:

1) Các tế bào U87MG được nuôi cấy trong môi trường EMEM chứa FBS 10% và P/S 1%, ủ trong đĩa 96 lỗ, mật độ 1×10^4 tế bào/lỗ.

2) Kháng thể H005-1 được pha loãng đến các gradien nồng độ khác nhau (được thể hiện trên trục hoành của Fig. 3) bằng PBS, bổ sung vào đĩa 96 lỗ với lượng 10ul/lỗ, và ủ trong tủ nuôi ở 37°C, CO₂ 5% trong 4 giờ.

3) Sau khi có sự bám dính tế bào, bổ sung 80ul huyền phù tế bào PBMC vào mỗi lỗ với mật độ tế bào là 2×10^4 tế bào/lỗ, và bổ sung 10ul kháng thể CD3 và kháng thể CD28 vào mỗi lỗ, nồng độ cuối cùng của cả kháng thể CD3 và kháng thể CD28 đều là 500ng/ml.

4) Sau 72 giờ ủ trong tủ nuôi ở 37°C, CO₂ 5%, bổ sung 10ul CCK8 vào mỗi lỗ để phát triển. 2 giờ sau, OD450 được xác định.

3. Kết quả:

Kết quả được thể hiện trên Fig.3, khi được so sánh với mIgG (đối chứng âm), các nồng

độ khác nhau của kháng thể PD-1 (H005-1) có tác dụng ức chế đáng kể đối với sự phát triển tế bào U87MG, và tỷ lệ ức chế ở nồng độ cao nhất là khoảng 30%.

Ví dụ 10: Hoạt tính của H005-1 đối với sự tăng sinh PBMC được kích thích bởi tuberculin

Hoạt tính của kháng thể được làm tương thích với người H005-1 đối với sự tăng sinh PBMC được kích thích bởi tuberculin được phát hiện.

Bổ sung 20 μ l tuberculin (Shanghai BiYou Biotechnology, cat#97-8800) vào 15ml PBMC mới, khoảng 3×10^7 tế bào, và ủ hỗn hợp trong 5 ngày trong tủ nuôi ở 37°C, CO₂ 5%. Vào ngày 6, các tế bào nuôi cấy được ly tâm, và tái tạo huyền phù vào môi trường mới với mật độ được điều chỉnh đến 5×10^5 tế bào/ml. Cho 190 μ l tế bào được tái tạo huyền phù vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ. Kháng thể được làm tương thích với người H005-1 được bổ sung vào các lỗ tương ứng của đĩa 96 lỗ với lượng 10 μ l/lỗ. Nhóm đối chứng và nhóm trống được bổ sung bằng 10 μ l PBS. Đĩa nuôi cấy tế bào được ủ trong tủ nuôi ở 37°C, CO₂ 5%, và 72 giờ sau, sự tăng sinh PBMC (Promega, cat # G7571) và sự tiết IFN- γ (Neo Bioscience, cat # EHC102g) được xác định. Kết quả là như sau:

Tác dụng hoạt hóa của mẫu thử nghiệm đối với sự tăng sinh PBMC được kích thích bởi tuberculin và sự tiết IFN- γ

Mẫu	Sự tăng sinh tế bào T, EC50(ng/ml)	IFN- λ EC50(ng/ml)
H005-1	15,95 $\pm$ 17,15	56,87 $\pm$ 48,53

Lưu ý: n=4

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng kháng thể được làm tương thích với người H005-1 hoạt hóa một cách tuyệt vời sự tăng sinh PBMC được kích thích bởi tuberculin ngoại sinh và sự tiết IFN- γ .

Ví dụ 11: Sự ức chế khối u U-87MG được cấy dưới da bằng H005-1

100 μ l tế bào U87 (5×10^6 tế bào) được cấy dưới da trên sườn phải của chuột SCID-Beige. Khi khối u phát triển đến kích thước 80-100mm³ sau 7 đến 10 ngày, chuột SCID-Beige, loại trừ các con có khối u hoặc cân nặng quá lớn hoặc quá nhỏ, được chia ngẫu nhiên thành nhóm H005-1 10mg/kg và nhóm IgG của người 10 mg/kg theo thể tích khối u, mỗi nhóm gồm 7 con chuột (D0). Hai loại PBMC được kích thích bằng kháng thể CD3 trong 3 ngày được trộn với tỷ lệ 1:1, và được tiêm vào các mô khối u với lượng 5×10^5 tế bào/60 μ l, trong khi đó, kháng

thử nghiệm được tiêm dưới da, một lần mỗi 7 ngày với tổng cộng 3 liều. Chuột được đo thể tích khối u và được cân hai lần một tuần. Số liệu được ghi lại. Thể tích khối u (V) được tính như sau: $V = 1/2 \times a \times b^2$, trong đó a và b lần lượt là chiều dài và chiều rộng.

Kết quả được thể hiện trên Fig.4: mức thay đổi thể tích khối u sau khi điều trị, và Fig.5: mức thay đổi thể trọng của chuột sau khi điều trị, chỉ ra rằng kháng thể H005-1 ức chế một cách tuyệt vời sự phát triển của khối u U87MG, và không có tác dụng đối với cân nặng của chuột.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa ít nhất một trong số LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự axit amin lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR3 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5.
2. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự axit amin lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5.
3. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự axit amin lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa ít nhất một trong số HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự axit amin lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5.
4. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR3 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5.
5. Phân tử ADN mã hóa kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
6. Tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện chứa phân tử ADN theo điểm 5.
7. Dược phẩm chứa kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.
8. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự axit amin lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự axit amin lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5.

9. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể của chuột hoặc mảnh của nó.

10. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 9, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể khảm hoặc mảnh của nó.

11. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể khảm chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10.

12. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể khảm chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9.

13. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên là kháng thể được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó.

14. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 13, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người chứa trình tự FR chuỗi nhẹ thu được từ trình tự kết hợp của chuỗi nhẹ dòng mầm của người IGKV1-39 và JK4 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, và trình tự FR chuỗi nhẹ chứa FR1, FR2 và FR3 của chuỗi nhẹ IGKV 1-39 và FR4 của chuỗi nhẹ JK4.

15. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 13, trong đó chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc biến thể của nó.

16. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 15, trong đó biến thể chứa đột biến 1 đến 10 axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

17. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 15, trong đó biến thể chứa đột biến axit amin A43S trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

18. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 13, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người còn chứa trình tự FR chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người, hoặc biến thể của chúng.

19. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 18, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người chứa chứa trình tự FR chuỗi nặng của IgG2 hoặc IgG4 của người.

20. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 13, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người chứa trình tự FR chuỗi nặng thu được từ trình tự kết hợp của chuỗi nặng dòng mầm của người IgHV3-7 và JH6 như được thể hiện trong SEQ ID NO:13, và trình tự FR chuỗi nặng chứa FR1, FR2 và FR3 của chuỗi nặng IgHV3-7 và FR4 của chuỗi nặng JH6.

21. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 13, trong đó kháng thể được làm tương thích với người chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc biến thể của nó.

22. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 21, trong đó biến thể chứa đột biến 1 đến 10 axit amin trong vùng biến đổi chuỗi nặng.

23. Kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 21, trong đó biến thể chứa đột biến axit amin G44R trong vùng biến đổi chuỗi nặng.

24. Phân tử ADN mã hóa kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 23.

25. Vector biểu hiện chứa phân tử ADN theo điểm 24.

26. Tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo điểm 25.

27. Tế bào chủ theo điểm 26, trong đó tế bào chủ là tế bào vi khuẩn.

28. Tế bào chủ theo điểm 27, trong đó tế bào chủ là *E. coli*.

29. Tế bào chủ theo điểm 26, trong đó tế bào chủ là tế bào nấm men.

30. Tế bào chủ theo điểm 29, trong đó tế bào chủ là *Pichia pastoris*.

31. Dược phẩm chứa kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 23 và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

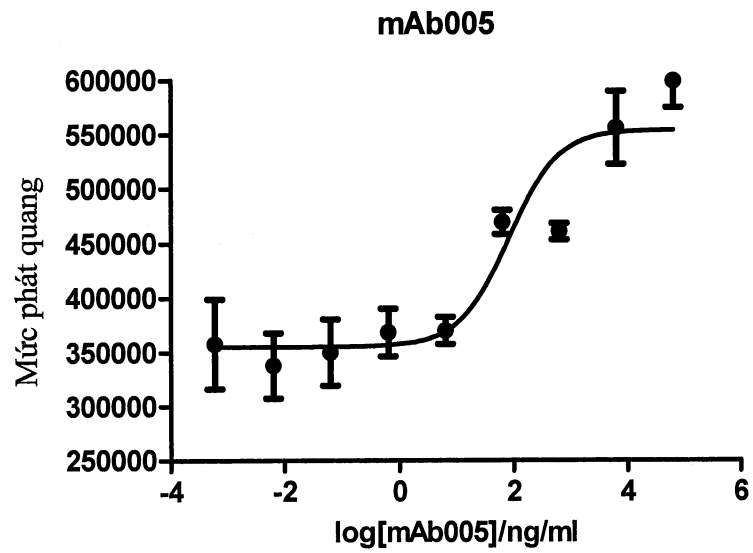


Fig.1

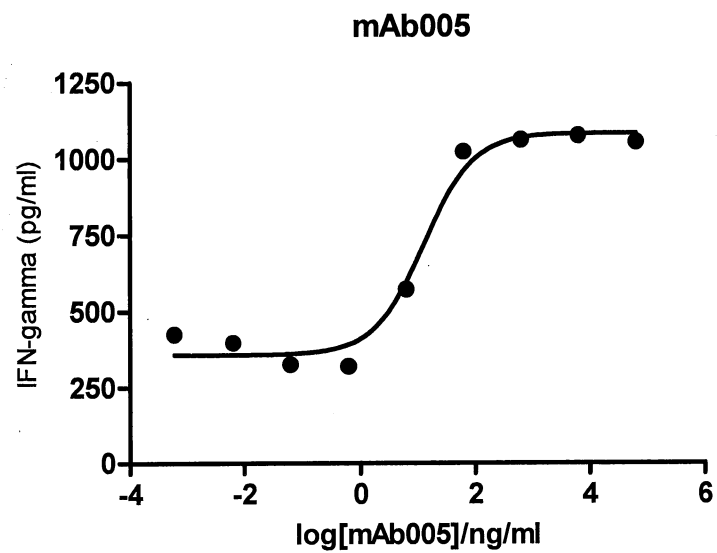


Fig.2

Thử nghiệm tăng sinh U87MG

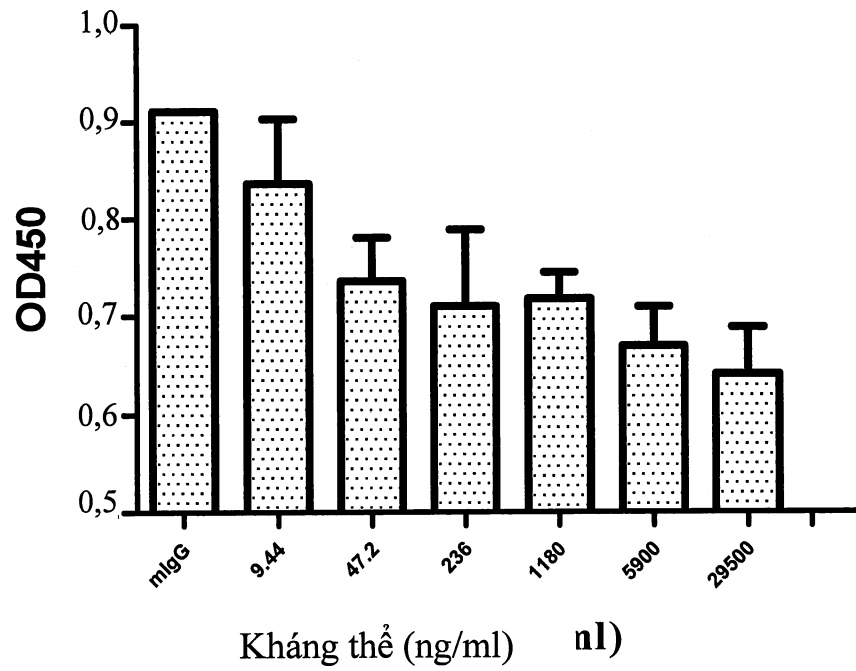


Fig.3

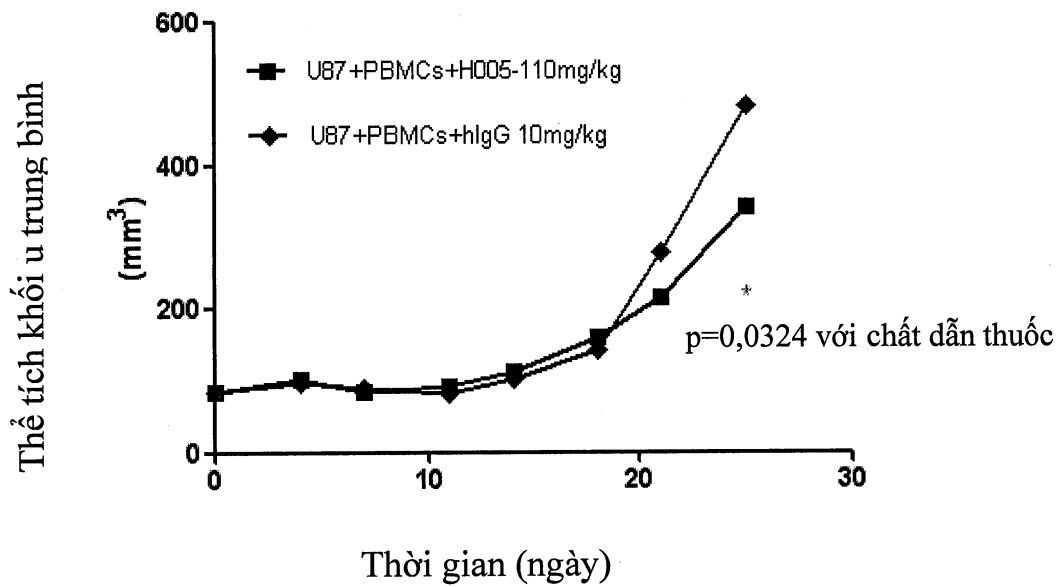


Fig.4

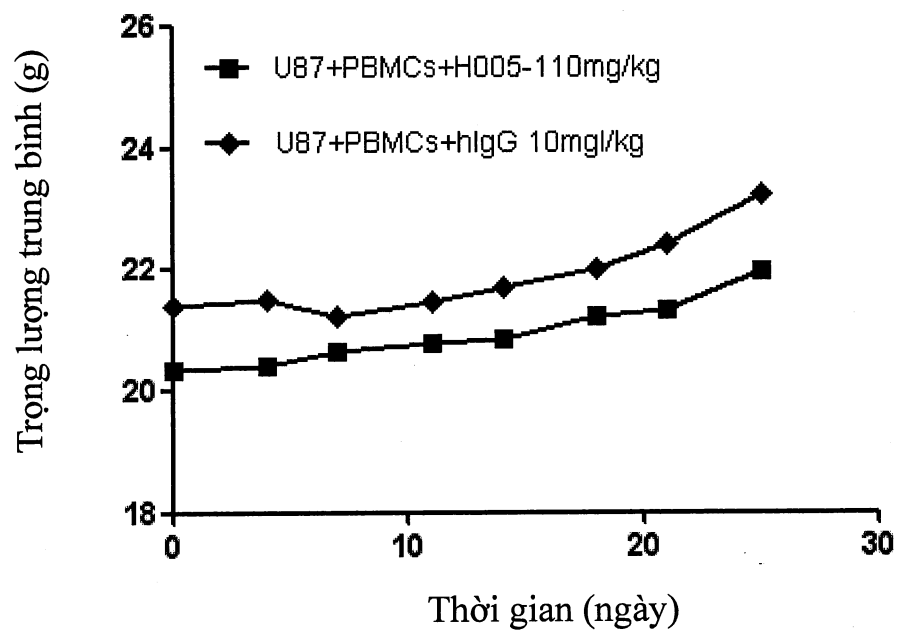


Fig.5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd
Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd

<120> Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và được phẩm chứa kháng thể này

<130> 740033CPCT

<151> PCT/CN2014/091090

<151> 12/12/2013

<160> 14

<170> PatentIn phiên bản 3.3

<210> 1

<211> 399

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp miễn Fc ngoại bào PD-1 tái tổ hợp

<400> 1

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg
20 25 30

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
35 40 45

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
50 55 60

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
65 70 75 80

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

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
100 105 110

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
115 120 125

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
130 135 140

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
145 150 155 160

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Asp Lys Thr His
165 170 175

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 180 185 190
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 210 215 220
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 225 230 235 240
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 245 250 255
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 260 265 270
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 275 280 285
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 290 295 300
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 305 310 315 320
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 325 330 335
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 340 345 350
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 355 360 365
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 370 375 380
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390 395
 <210> 2
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30
 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95
 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175
 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> HCDR1 của chuột nhắt

<400> 3

Ser Tyr Met Met Ser
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> HCDR2 của chuột nhắt

<400> 4

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> HCDR3 của chuột nhắt

<400> 5

Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> LCDR1 của chuột nhắt

<400> 6

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Thr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> LCDR2 của chuột nhắt

<400> 7

Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> LCDR3 của chuột nhắt

<400> 8

Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> vVH của chuột nhắt

<400> 9

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

[illegible]

<210>	10
<211>	107
<212>	PRT
<213>	VL của chuột nhắt

 $\langle 400 \rangle$ 10

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

```
<210> 11
<211> 443
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> trình tự chuỗi nặng của kháng thể H005-1 được làm tương thích với người

<400> 11

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

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

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

Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Pro	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
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	100	105	110
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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
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	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	210	215	220
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	225	230	235
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	245	250	255
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	260	265	270
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	275	280	285
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	290	295	300
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	305	310	315
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	325	330	335
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	340	345	350
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	355	360	365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể H005-1 được làm tương
 thích với người
 <400> 12
 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 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
 20 25 30
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp 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 Val Tyr Ser Ile Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự vùng khung chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 14
<211> 98
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự vùng khung chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người

<400> 14

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

28320

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 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
85 90 95

Ile Lys