



(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)



1-0031705

(51)<sup>8</sup> C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2017-02808

(22) 22/12/2015

(86) PCT/US2015/067332 22/12/2015

(87) WO 2016/106302 30/06/2016

(30) 62/096,267 23/12/2014 US

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/10/2017 355A

(73) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

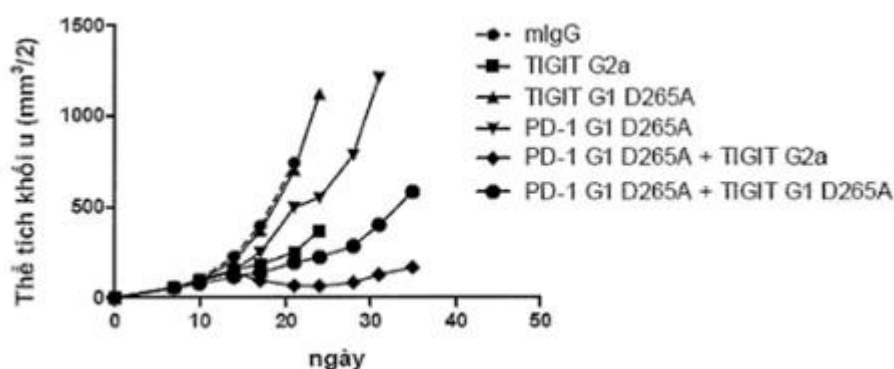
Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543, United States of America

(72) MAURER, Mark F. (US); CHEN, Tseng-Hui Timothy (US); DEVAUX, Brigitte (US); SRINIVASAN, Mohan (US); JULIEN, Susan H. (US); SHEPPARD, Paul O. (US); ARDOUREL, Daniel F. (US); CHAKRABORTY, Indrani (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI THỤ THỂ MIỄN DỊCH TẾ BÀO T CÓ MIỀN IG VÀ ITIM CỦA NGƯỜI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với thụ thể miễn dịch tế bào T có miền Ig và miền ITIM của người, axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này, vectơ biểu hiện chứa axit nucleic này, tế bào vật chủ được biến nạp bằng vectơ này, phương pháp sản xuất kháng thể này, thuốc chứa kháng thể này, và kháng thể đặc hiệu kép.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với thụ thể miễn dịch tế bào T có miền Ig và miền ITIM của người, axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này, vectơ biểu hiện chứa axit nucleic này, tế bào vật chủ được biến nạp bằng vectơ này, phương pháp sản xuất kháng thể này, thuốc chứa kháng thể này, và kháng thể đặc hiệu kép.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains - thụ thể miễn dịch tế bào T có miền Ig và miền ITIM) là protein thụ thể đồng ức chế, còn được gọi là WUCAM, Vstm3 hoặc Vsig9. TIGIT được phát hiện ra trong các nghiên cứu về hệ gen đối với các protein được biểu hiện đặc hiệu trên các tế bào T, và có miền biến đổi của globulin miễn dịch, miền xuyên màng, và môtip ức chế trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif - ITIM), và chứa các yếu tố trình tự đặc trưng của họ protein PVR. Đã biết protein này tương tác với thụ thể của virut gây bệnh viêm tủy xám (poliovirus receptor) (PVR; CD155) và với nectin2 (CD112). Xem, ví dụ bài báo: Stengel et al. (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 19:5399; WO 2006/124667; WO 2009/126688. Mặc dù PVR có thể tương tác với thụ thể đồng hoạt hóa DNAM-1 (CD226) để tăng cường sự tiêu diệt khối u, nhưng sự tương tác TIGIT/PVR ái lực cao sẽ ức chế sự tiêu diệt này, và có thể có tác dụng ngăn ngừa sự tiêu diệt của (chính) các tế bào bình thường mà cũng biểu hiện PVR. Stanitsky et al. (2009) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 106:17858. Tính ưu thế của tương tác ức chế này có thể có vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn các phản ứng miễn dịch tự kháng, nhưng trong trường hợp khối u, nó hạn chế sự tiêu diệt khối u. *Như trên*

TIGIT ức chế sự hoạt hóa tế bào T bằng cách thúc đẩy sự sản sinh các tế bào đuôi gai điều hòa miễn dịch trưởng thành. Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48. TIGIT và các phân tử đồng ức chế khác như vậy (ví dụ, CTLA-4, PD-1, Lag3 và BTLA) có thể đóng vai trò trong việc lẫn tránh sự giám sát miễn dịch của các tế bào khối u. Các thử nghiệm

đã cho thấy rằng PVR/CD155 được biểu hiện quá mức trên các tế bào u melanin (Inozume *et al.* (2014) *J. Invest. Dermatol.* 134:S121 - Abstract 693) và các khối u khác nhau khác. Có khả năng là sự tương tác TIGIT/PVR có thể bảo vệ các tế bào khối u này khỏi sự tiêu diệt do sự miễn dịch gây ra bằng cách ức chế các đáp ứng kháng khối u của tế bào T và NK. Stanitsky *et al.* (2009) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 106:17858 và Lozano *et al.* (2012) *J. Immunol.* 188:3869. Các thử nghiệm khác đã nhận diện nhóm phụ TIGIT<sup>+</sup> của các tế bào T điều hòa (T<sub>regs</sub>) mà ức chế chọn lọc các đáp ứng Th1 và Th17 (Joller *et al.* (2014) *Immunity* 40:569), gợi ý cơ chế thay thế mà nhờ đó kháng thể kháng TIGIT có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng khối u.

TIGIT có thể có tác dụng “dừng” đáp ứng miễn dịch tương tự như các thụ thể đồng ức chế khác như CTLA-4, PD-1 và BTLA. *Như trên* Các kháng thể hướng đích CTLA-4 (ipilimumab) và PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) đã được phê chuẩn để điều trị ung thư cho người, chứng nhận phương pháp trị liệu này. Các kháng thể mà gắn kết với TIGIT của người cũng có thể có công dụng để điều trị ung thư. Xem, ví dụ WO 2006/124667. Ở mô hình chuột nhắt, sự phong bế bằng kháng thể của cả PD-L1 và TIGIT dẫn đến sự tăng cường hiệp đồng sự thải loại khối u gián tiếp qua tế bào T CD8<sup>+</sup>. Grogan *et al.* (2014) *J. Immunol.* 192(1) Suppl. 203.15; Johnston *et al.* (2014) *Cancer Cell* 26:1-15. Các kết quả tương tự đã thu được ở các mô hình u melanin của động vật. Inozume *et al.* (2014) *J. Invest. Dermatol.* 134:S121 - Abstract 693. Một số thử nghiệm gợi ý rằng sự phong bế TIGIT có hiệu quả để tăng cường đáp ứng tế bào T CD8<sup>+</sup> kháng khối u chỉ với sự có mặt của thụ thể đồng hoạt hóa DNAM-1/CD226, mà cạnh tranh với TIGIT để gắn kết với PVR/CD155. Johnston *et al.* (2014) *Cancer Cell* 26:1-15.

Các thử nghiệm gần đây đã chứng minh rằng vi khuẩn trong khối u biểu hiện protein Fap2 có thể ức chế sự tiêu diệt khối u gián tiếp qua tế bào NK bằng cách gắn kết với TIGIT (Gur *et al.* (2015) *Immunity* 42:344), gợi ý rằng việc tiêu diệt vi khuẩn này, phong bế sự tương tác của TIGIT với Fap2, hoặc phong bế hoạt tính của TIGIT nói chung, có thể là hữu ích trong việc điều trị ung thư, ví dụ ung thư kết-trực tràng. Hampton (2015) *JAMA* 313:1305.

Cần có các phương pháp cải tiến để điều trị ung thư và các bệnh nhiễm virus mạn tính và các thuốc, như các kháng thể đơn dòng trị liệu, để sử dụng trong các phương pháp này. Các thuốc để sử dụng trong các phương pháp điều trị bệnh cải tiến này có thể chứa các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với TIGIT và đảo ngược

hoặc đảo ngược một phần sự ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u hoặc kháng virus gián tiếp qua TIGIT.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất các thuốc và các phương pháp cải tiến để điều trị ung thư và bệnh nhiễm virus mạn tính bao gồm các kháng thể, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với huTIGIT. Được đề xuất trong bản mô tả này là các kháng thể phân lập, như các kháng thể đơn dòng, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng của người, mà gắn kết đặc hiệu với huTIGIT và có các đặc tính chức năng đáng mong muốn, như gắn kết đặc hiệu ái lực cao với huTIGIT, gắn kết với TIGIT của khỉ (ví dụ, TIGIT của khỉ cynomolgus), khả năng phong bế sự gắn kết của TIGIT với PVR và/hoặc Nectin-2, khả năng phong bế sự tương tác của TIGIT với DNAM, hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này.

Sáng chế mô tả phương pháp cải tiến để điều trị ung thư và các kháng thể trị liệu để sử dụng trong các phương pháp này, bao gồm các ung thư trong đó tín hiệu gián tiếp qua TIGIT ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u, các khối u trong đó sự tương tác của TIGIT với thụ thể đồng hoạt hóa DNAM-1/CD226 ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u, các khối u trong đó các tế bào T điều hòa biểu hiện TIGIT ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u, hoặc các khối u trong đó TIGIT ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u. Sáng chế cũng mô tả các phương pháp và các kháng thể trị liệu để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhiễm virus mạn tính trong đó TIGIT ức chế đáp ứng miễn dịch kháng virus.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các kháng thể mà cạnh tranh với các kháng thể này có các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này để gắn kết với huTIGIT, và/hoặc phong bế chéo các kháng thể có các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này để không gắn kết với huTIGIT.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng khối u, ví dụ đáp ứng tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, phong bế tín hiệu ức chế gián tiếp qua TIGIT cho phép đồng kích thích PVR/DNAM của tế bào NK để làm tăng mức độ tiêu diệt bằng đáp ứng kháng khối u gián tiếp qua NK. Theo một

phương án khác nữa, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, làm suy kiệt quần thể của tế bào T điều hòa trong khối u mà nếu không sẽ ức chế đáp ứng miễn dịch kháng khối u. Theo một phương án khác nữa, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế được định dạng dưới dạng các IgG1 làm suy kiệt các tế bào T cạn kiệt  $CD8^+$  và  $T_{regs}$ , cho phép các tế bào T  $CD8^+$  mới, không cạn kiệt đi vào. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, tác động bằng một cơ chế trong số nhiều cơ chế nêu trên do các cơ chế không nhất thiết loại trừ lẫn nhau.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, không gắn kết với các thụ thể  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma$  receptor -  $Fc\gamma R$ ) hoạt hóa, ví dụ theo các phương án dựa vào sự tăng cường hoạt tính kháng khối u của các tế bào biểu hiện TIGIT. Theo các phương án thay thế, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, gắn kết với một hoặc nhiều  $Fc\gamma R$  hoạt hóa, ví dụ theo các phương án dựa vào sự tiêu diệt các tế bào biểu hiện TIGIT, như các tế bào T  $CD8^+$  cạn kiệt hoặc  $T_{regs}$ .

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đơn dòng phân lập (15A6), hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết đặc hiệu với huTIGIT và chứa các trình tự CDRH1, CDRH2, và CDRH3 của chuỗi nặng bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.14, 15 và 16, và/hoặc các trình tự CDRL1, CDRL2, và CDRL3 của chuỗi nhẹ bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.17, 18, và 19.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đơn dòng phân lập (22G2), hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết đặc hiệu với huTIGIT và chứa các trình tự CDRH1, CDRH2, và CDRH3 của chuỗi nặng bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.20, 21 và 22, và/hoặc các trình tự CDRL1, CDRL2, và CDRL3 của chuỗi nhẹ bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.23, 24, và 25.

Sáng chế còn đề xuất tiếp các kháng thể đơn dòng phân lập (11G11), hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết đặc hiệu với huTIGIT và chứa các trình tự CDRH1, CDRH2, và CDRH3 của chuỗi nặng bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.26, 27 và 28, và/hoặc các trình tự CDRL1, CDRL2, và CDRL3 của chuỗi nhẹ bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.29, 30, và 31.

Sáng chế còn đề xuất tiếp các kháng thể đơn dòng phân lập (10D7), hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết đặc hiệu với huTIGIT và chứa các trình tự CDRH1, CDRH2, và CDRH3 của chuỗi nặng bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.32, 33 và 34, và/hoặc các trình tự CDRL1, CDRL2, và CDRL3 của chuỗi nhẹ bao gồm lần lượt các SEQ ID NO.35, 36, và 37.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết đặc hiệu với huTIGIT và chứa trình tự chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi được nêu trong các SEQ ID NO.2 (hoặc 3, 4, 5) và 6; SEQ ID NO.7 (hoặc 8) và 9; SEQ ID NO.10 và 11; và SEQ ID NO.12 và 13.

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết với huTIGIT và chứa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin mà có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 95% hoặc 99% so với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO.2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 và 12.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đơn dòng phân lập, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mà gắn kết với huTIGIT và chứa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin mà có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 95% hoặc 99% so với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO.6, 9, 11, và 13.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể đơn dòng phân lập theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, (a) gắn kết với cùng epitop trên huTIGIT như 15A6, 22G2, 11G11, và/hoặc 10D7, và/hoặc (b) ức chế gắn kết của 15A6, 22G2, 11G11, và/hoặc 10D7 với huTIGIT khi được đo, ví dụ bằng FACS hoặc ELISA.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, gắn kết với epitop chứa hoặc được cấu thành bởi một hoặc nhiều gốc E60, I109, L65, N70, F107, T117, I68, H76 và N58 (kháng thể 22G2) của huTIGIT (SEQ ID NO.1), ở epitop chứa hoặc được cấu thành bởi một hoặc nhiều gốc G74, N70, H76, L65, L73, Q56, I68, H111 và P114 (kháng thể 11G11), hoặc ở epitop chứa hoặc được cấu thành bởi một hoặc nhiều gốc H76, G74, L65, N58, I68, Q139, G135, L73, F107, N70, E60, H134, A132 và I109 (kháng thể 15A6).

Theo cách khác, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, gắn kết ở epitop chứa hoặc được cấu thành bởi một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO.38) và FCIYHTYPDGT (SEQ ID NO.39) (kháng thể 22G2), hoặc từ nhóm được cấu thành bởi QVNWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO.40) và HTYP (SEQ ID NO.41) (kháng thể 11G11), hoặc từ nhóm được cấu thành bởi NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO.38), FCI, và AEHGARFQ (SEQ ID NO.43) (kháng thể 15A6).

Theo các phương án khác nữa, kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với epitop lõi trên huTIGIT (SEQ ID NO.1) chứa hoặc được cấu thành bởi một hoặc nhiều gốc L65, I68, N70 và H76, và/hoặc ở epitop chứa hoặc được cấu thành bởi LLAICNADLGWH (SEQ ID NO.44).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, còn gắn kết với TIGIT của khỉ cynomolgus.

Theo các phương án khác nhau, các kháng thể kháng TIGIT, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế là các kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người, hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án nhất định, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp phong bế tín hiệu TIGIT trong các tế bào T đặc hiệu khối u “cạn kiệt” hoặc phong bế tín hiệu ức chế trên tế bào NK cho phép sự đồng kích thích gián tiếp qua DNAM-1/PVR hoặc các phương pháp phong bế sự tương tác của TIGIT với DNAM-1/CD226 để làm suy yếu sự nhị trùng hóa đồng nhất của DNAM-1, các kháng thể kháng TIGIT, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, chứa Fc không hiệu ứng hoặc hầu như không hiệu ứng. Các vùng Fc này bao gồm, ví dụ IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc biến thể không hiệu ứng của IgG1 của người có một hoặc nhiều đột biến sau: L234A, L235E, G237A, A330S và P331S (đánh số theo EU), bao gồm IgG1.1f (SEQ ID NO.48) chứa tất cả năm đột biến được liệt kê.

Theo các phương án thay thế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp làm suy kiệt các tế bào T điều hòa TIGIT<sup>+</sup>, các kháng thể kháng TIGIT, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, chứa Fc mà gắn kết ưu tiên với FcγR hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa hoặc FcγRIIIa), như IgG1 của người, hoặc biến thể trình tự có sự gắn kết tăng với FcγR hoạt hóa so với Fc IgG1 kiểu đại. Theo các phương án liên quan đến việc

sử dụng các dạng IgG1 của các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế để giúp làm suy kiệt  $T_{reg}$ s, việc tiêm trong khối u có thể tùy ý được sử dụng để khoanh vùng các tác dụng đến vi môi trường khối u, làm giảm đến mức tối thiểu các tác dụng phụ tiềm tàng do hoạt tính gây ra trong các mô ngoại biên.

Theo các phương án nhất định, các gốc metionin trong các vùng CDR của các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế (ví dụ, M115 trong CDRH3 của 10D7, SEQ ID NO.34), hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, được thay thế bằng các gốc axit amin mà không được oxy hóa.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng huTIGIT mà cạnh tranh để gắn kết, phong bế chéo, hoặc gắn kết với cùng epitop như 15A6, 22G2, 11G11 hoặc 10D7, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, là các kháng thể của người hoặc được làm giống như của người.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế không phải là, hoặc không gắn kết với cùng epitop như, các kháng thể được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0258013, ví dụ chúng không gắn kết với cùng epitop như mAb kháng huTIGIT 10A7 hoặc 1F4. *Cũng xem bài báo: Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1; Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48.*

Theo các phương án khác, các kháng thể kháng huTIGIT chứa các miền biến đổi thu được từ cùng các trình tự dòng mầm của miền V của người như các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm các miền V của chuỗi nặng V4-39, V4-61, hoặc V1-69. Theo các phương án cụ thể hơn, các kháng thể kháng huTIGIT chứa các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thu được từ cùng các trình tự dòng mầm của miền V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người như các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, như V4-39/VA27 (15A6), V4-61/VL6 (22G2), V4-39/VL6 (11G11), và V1-69/VL15 (10D7).

Theo các phương án khác nhau, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế gắn kết với huTIGIT với  $K_D$  nhỏ hơn 10nM, 5nM, 2nM, 1nM, 300pM hoặc 100pM. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế gắn kết với huTIGIT với  $K_D$  nằm trong khoảng từ 2nM đến 100pM.

Theo các phương án khác, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế về cơ bản được cấu thành bởi, hoặc bao gồm, một số tổ hợp của các CDR của các kháng thể 15A6,

22G2, 11G11 và 10D7, như CDRH1 (các SEQ ID NO.14, 20, 26 và 32); CDRH2 (các SEQ ID NO.15, 21, 27 và 33); CDRH3 (các SEQ ID NO.16, 22, 28 và 34); CDRL1 (các SEQ ID NO.17, 23, 29 và 35); CDRL2 (các SEQ ID NO.18, 24, 30 và 36); và CDRL3 (các SEQ ID NO.19, 25, 31 và 37). Theo các phương án khác, các kháng thể này về cơ bản được cấu thành bởi, hoặc bao gồm, các tổ hợp cụ thể riêng rẽ của các trình tự CDR của các kháng thể 15A6, 22G2, 11G11 và 10D7.

Theo các phương án khác, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế về cơ bản được cấu thành bởi, hoặc bao gồm, các miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể 15A6 (các SEQ ID NO.2-5 và 6), 22G2 (các SEQ ID NO.7-8 và 9), 11G11 (các SEQ ID NO.10 và 11) và 10D7 (các SEQ ID NO.12 và 13), hoặc các trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% và 95% so với các trình tự được nêu này.

Theo các phương án khác nữa, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế về cơ bản được cấu thành bởi, hoặc bao gồm, các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ chứa các trình tự của miền biến đổi của các kháng thể 15A6 (các SEQ ID NO.2-5 và 6), 22G2 (các SEQ ID NO.7-8 và 9), 11G11 (các SEQ ID NO.10 và 11) và 10D7 (các SEQ ID NO.12 và 13), hoặc các trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% và 95% so với các trình tự được nêu này.

Theo các phương án khác, các miền gắn kết kháng nguyên của các kháng thể theo sáng chế có mặt trong các phân tử đặc hiệu kép còn bao gồm miền gắn kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể điều biến miễn dịch khác, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PD-1, CTLA-4 hoặc LAG3.

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ, của các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, các vector biểu hiện chứa các phân tử axit nucleic, các tế bào được biến nạp bằng các vector biểu hiện này, và các phương pháp sản xuất các kháng thể này bằng cách biểu hiện các tế bào đã được biến nạp bằng các vector biểu hiện này và thu hồi kháng thể này.

Sáng chế còn đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch chứa các kháng thể kháng huTIGIT được mô tả trong bản mô tả này, được liên kết với chất, như chất đánh dấu để phát hiện hoặc tác nhân gây độc tế bào.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và chất mang. Cũng được đề xuất trong bản mô tả này là kit bao gồm các kháng thể kháng TIGIT, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và hướng dẫn sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên bao gồm việc cho tế bào T tiếp xúc với kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, sao cho đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được tăng cường, ví dụ bằng cách giảm tín hiệu ức chế mà nếu không sẽ làm giảm đáp ứng kháng khối u. Theo một số phương án, tế bào T đặc hiệu kháng nguyên là tế bào T hiệu ứng đặc hiệu kháng nguyên khối u, như tế bào T  $CD8^+$ , và sự tăng cường, ví dụ thông qua việc phong bế tác dụng ức chế gián tiếp qua TIGIT, gây ra tăng hoạt tính kháng khối u. Các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, cũng có thể làm giảm các tín hiệu ức chế trong tế bào NK và do đó, làm tăng hoạt tính kháng khối u của chúng. Không dự định bị ràng buộc bởi lý thuyết, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế làm tăng chức năng tế bào T hiệu ứng hoặc tế bào NK bằng cách phong bế gắn kết của TIGIT với PVR, do đó, làm giảm hoặc làm mất tín hiệu ức chế mà nếu không sẽ được phân phối đến tế bào. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có thể ức chế sự tương tác giữa TIGIT và DNAM-1/CD226 mà nếu không sẽ làm giảm sự hoạt hóa miễn dịch gián tiếp qua DNAM-1.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm tăng mức độ sản sinh IL-2 và/hoặc IFN- $\gamma$  trong, và/hoặc sự tăng sinh của, tế bào T bao gồm việc cho tế bào T tiếp xúc với kháng thể kháng TIGIT, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với lượng có hiệu quả.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm hoặc làm suy kiệt  $T_{regs}$  trong khối u ở đối tượng cần điều trị bao gồm việc dùng kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế với lượng có hiệu quả, trong đó kháng thể này có chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hiệu ứng được tăng cường, để làm giảm số lượng  $T_{regs}$  trong khối u.

Sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm việc dùng kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với lượng có hiệu quả, cho đối tượng sao cho đáp ứng miễn dịch ở đối tượng này được tăng cường. Theo các phương án nhất định, đối tượng này có khối u và đáp ứng

miễn dịch kháng khối u được tăng cường. Theo một phương án khác, đối tượng này có sự nhiễm virus và đáp ứng miễn dịch kháng virus được tăng cường.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế sự sinh trưởng của khối u ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, sao cho sự sinh trưởng của khối u được ức chế.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị ung thư, ví dụ bằng cách trị liệu miễn dịch, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, với lượng có hiệu quả điều trị bệnh, ví dụ dưới dạng dược phẩm, nhờ đó điều trị được ung thư. Theo các phương án nhất định, ung thư này là bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung/cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tế bào mầm, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư da, khối u của hệ thần kinh trung ương, u limphô, bệnh bạch cầu, u tủy, sarcoma, và bệnh ung thư liên quan đến virus. Theo các phương án nhất định, ung thư này là bệnh ung thư di căn, bệnh ung thư dai dẳng, hoặc bệnh ung thư tái diễn.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp điều biến chức năng miễn dịch và các phương pháp điều trị bệnh được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc dùng kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế kết hợp với, hoặc dưới dạng chất phản ứng đặc hiệu kép với, một hoặc nhiều phép trị liệu bổ sung, ví dụ kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng LAG3, kháng thể kháng GITR, kháng thể kháng OX40, kháng thể kháng CD73, kháng thể kháng CD40, mAb kháng CD137, mAb kháng CD27, kháng thể kháng CSF-1R, và/hoặc kháng thể kháng CTLA-4, chất chủ vận TLR, hoặc chất đối kháng phân tử nhỏ của IDO hoặc TGF $\beta$ . Theo các phương án cụ thể, phép trị liệu kháng huTIGIT được kết hợp với phép trị liệu kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1, ví dụ điều trị bằng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với PD-1 của người hoặc kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với PD-L1 của người.

Theo một số phương án, các mẫu từ đối tượng bị bệnh, ví dụ sinh thiết, được sàng lọc để biểu hiện DNAM-1 trên tế bào T hoặc tế bào NK để chọn lọc các đối tượng bị bệnh thích hợp nhất để đáp ứng với phép trị liệu kháng TIGIT, trong đó sự có mặt của DNAM-1 trên các tế bào T gợi ý đối tượng bị bệnh sẽ có đáp ứng kháng khối u có lợi với phép trị liệu kháng TIGIT, ví dụ điều trị bằng kháng thể kháng huTIGIT hoặc mảnh theo sáng chế, và sự vắng mặt của DNAM-1 xác nhận các đối tượng bị bệnh này là ít thích hợp để được lợi từ phép trị liệu kháng TIGIT. Theo các phương án khác, các mẫu từ đối tượng bị bệnh được sàng lọc để biểu hiện PVR và/hoặc Nectin-2 trên các tế bào khối u hoặc các tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u để chọn lọc các đối tượng bị bệnh thích hợp nhất để đáp ứng với phép trị liệu kháng TIGIT, trong đó sự có mặt của PVR và/hoặc Nectin-2 gợi ý đối tượng bị bệnh sẽ có đáp ứng kháng khối u có lợi với phép trị liệu kháng TIGIT, ví dụ điều trị bằng kháng thể kháng huTIGIT hoặc mảnh theo sáng chế, và sự vắng mặt của PVR và/hoặc Nectin-2/CD112 xác nhận các đối tượng bị bệnh này là ít thích hợp để được lợi từ phép trị liệu kháng TIGIT. Theo các phương án khác nhau, sự biểu hiện bề mặt tế bào của TIGIT, DNAM, PVR và/hoặc Nectin-2 là bằng FACS, IHC hoặc LC-MS. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị các đối tượng cần điều trị liên quan đến việc xác định sự biểu hiện bề mặt tế bào của TIGIT, DNAM, PVR và/hoặc Nectin-2 như được mô tả trong bản mô tả này và việc dùng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế ưu tiên, hoặc dành riêng, cho đối tượng mà việc điều trị này là thích hợp nhất để thu được lợi ích trị liệu.

Theo một phương án, hàm lượng PVR hòa tan và/hoặc Nectin-2 hòa tan (sPVR, sNectin-2) được đo ở các đối tượng được xem xét để điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, và chỉ các đối tượng biểu hiện hàm lượng PVR và/hoặc Nectin-2 hòa tan tăng được điều trị bằng các kháng thể này. Theo một số phương án, sPVR và/hoặc sNectin-2 được phát hiện trong huyết thanh bằng ELISA hoặc LC-MS.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của TIGIT trong mẫu, trên tế bào trong mẫu (ví dụ, FACS), hoặc ở các vị trí cụ thể trong tế bào hoặc mô (ví dụ, IHC), hoặc phương pháp phân loại các tế bào dựa trên sự có mặt hay không có của TIGIT trên bề mặt của chúng (ví dụ, FACS), bao gồm việc cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong các điều kiện cho phép tạo thành phức hợp giữa kháng thể này, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và TIGIT, và phát hiện sự tạo thành phức hợp này. Theo một số phương án,

kháng thể kháng TIGIT được sử dụng để phát hiện được tiếp hợp với chất đánh dấu để phát hiện.

Các dấu hiệu và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ là hiển nhiên từ phần mô tả chi tiết và các ví dụ dưới đây, phần mô tả và các ví dụ này không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

### **Mô tả vắn tắt hình vẽ**

Fig.1 thể hiện sơ đồ phác họa các thử nghiệm “kết hợp” trong đó các kháng thể kháng huTIGIT khác nhau theo sáng chế được thử nghiệm, từng cặp, về khả năng phong bế sự gắn kết của các kháng thể khác với huTIGIT. Các kết quả thể hiện rằng các kháng thể nằm trong một số giới hạn các loại, hay “bin.” Xem ví dụ 3.

Fig.2A, Fig.2B, và Fig.2C thể hiện dữ liệu hiển thị trên năm men đối với sự gắn kết của các biến thể trình tự huTIGIT lần lượt với các kháng thể 22G2, 11G11, và 15A6. Số lượng gốc đối với mỗi gốc axit amin trong huTIGIT trưởng thành được thể hiện dọc theo trục hoành. Số gốc là 21, thấp hơn so với đánh số đối với trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 do danh mục trình tự bao gồm peptit tín hiệu, peptit này không được thể hiện trên các hình vẽ. Như được mô tả một cách chi tiết trong ví dụ 4, các biến thể trình tự hiển thị bởi năm men của huTIGIT được chọn lọc dựa trên việc không có khả năng gắn kết với các kháng thể tương ứng (22G2, 11G11, 15A6). Do đó, các vị trí dọc theo trình tự huTIGIT mà có tính quyết định đối với sự gắn kết kháng thể xuất hiện ở tần suất cao (tức là dưới dạng các cột/các đường ở phía trên trục tung) do sự biểu hiện quá mức của chúng trong nhóm các dòng năm men vô tính không gắn kết. Tần suất mà ở đó các gốc biến thể (không phải kiểu dại) xuất hiện ở mỗi gốc được thể hiện (trên thang logarit) trên trục tung, với một cột (đường) hoặc mỗi gốc. Dữ liệu tần suất được chuẩn hóa thành các tần suất mà ở đó các gốc biến thể xuất hiện ở mỗi vị trí trong thư viện không được chọn, tức là thư viện mà không được sử dụng để chọn lọc dựa trên sự không có khả năng gắn kết với các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế. Xem ví dụ 4.

Fig.3 thể hiện tác dụng của mAb kháng TIGIT 22G2 lên sự tiêu tế bào, tính theo tỷ lệ phần trăm tiêu bào cụ thể của các tế bào biểu hiện PVR của người bởi tế bào NK của người. Xem ví dụ 5. Đối với mỗi kháng thể, cột bên trái là các tế bào P815 kiểu dại và cột bên phải là các tế bào P815 biểu hiện PVR của người.

Fig.4A thể hiện rằng việc xử lý máu cho của người khỏe mạnh bằng hỗn hợp các peptit có tính kháng nguyên (CETF = các peptit từ CMV, EBV, bệnh cúm và bệnh uốn ván) gây ra sự điều chỉnh tăng PD-1 và TIGIT trên các tế bào T CD8<sup>+</sup>. Mẫu “No Stim” là không được xử lý bằng CETF, còn mẫu “Stim” là được xử lý. Fig.4B thể hiện tác dụng của mAb kháng TIGIT và/hoặc mAb kháng PD-1 lên sự biểu hiện IFN $\gamma$  từ bốn mẫu máu cho của người khỏe mạnh được kích thích bằng CETF. *Xem ví dụ 6.*

Fig.5A và Fig.5B thể hiện các tác dụng của các kháng thể kháng TIGIT, riêng rẽ hoặc kết hợp với phép trị liệu điều biến miễn dịch khác, lên sự sinh trưởng của khối u ở mô hình chuột nhắt. Fig.5A thể hiện thể tích khối u (milimet khối), được tính bằng cách lấy bình phương chiều rộng của khối u nhân với một nửa chiều dài, ở mô hình ung thư kết tràng của chuột nhắt CT26 đối với chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể TIGIT kháng chuột nhắt có chức năng hiệu ứng kích hoạt miễn Fc IgG2a của chuột (“TIGIT G2a”), kháng thể TIGIT kháng chuột nhắt có chức năng hiệu ứng thiếu miễn Fc IgG1 D265A (“TIGIT G1 D265A”), kháng thể PD-1 kháng chuột nhắt có chức năng hiệu ứng thiếu miễn Fc IgG1 D265A (“PD-1 G1 D265A”), tổ hợp của chúng, hoặc kháng thể IgG1 đối chứng. Fig.5B thể hiện tác dụng của phép trị liệu đơn trị kháng TIGIT, cũng như phép trị liệu kết hợp với các kháng thể kháng PD-1 và kháng CTLA-4. Các thể tích khối u được đưa ra cùng với số lượng chuột nhắt không có khối u (tumor-free - TF) trong mỗi nhóm gồm mười con chuột ở cuối thử nghiệm. Mỗi đường đại diện cho một con chuột. Đối chứng isotyp mIgG1 không thu được chuột không có khối u, khi dùng kháng TIGIT dưới dạng phép trị liệu đơn trị. Kháng PD-1 thu được một con chuột không có khối u khi trị liệu đơn trị, và năm khi được kết hợp với kháng TIGIT. Kháng CTLA-4 thu được ba con chuột không có khối u khi trị liệu đơn trị, và sáu khi được kết hợp với kháng TIGIT. *Xem ví dụ 7.*

Fig.6A và Fig.6B thể hiện mức độ biểu hiện PVR tăng trong các mô ung thư. Fig.6A thể hiện mức độ biểu hiện mARN (ARN thông tin) PVR trong các loại khối u khác nhau khi được phát hiện trong tập dữ liệu của tập bản đồ hệ gen ung thư (The Cancer Genome Atlas - TCGA). Dữ liệu được đưa ra đối với ung thư biểu mô vỏ tuyến thượng thận-thận (adrenocortical carcinoma - ACC), ung thư biểu mô tế bào thận kỵ nhuộm màu (chromophobe renal cell carcinoma - KICH), ung thư biểu mô tế bào gan (liver hepatocellular carcinoma - LIHC), ung thư biểu mô tuyến kết tràng và trực tràng (colon and rectal adenocarcinoma - COAD, READ), ung thư biểu mô tuyến ống tụy

(pancreatic ductal adenocarcinoma - PAAD), u tế bào ưa crom & u cận hạch (pheochromocytoma & paraganglioma - PCPG), ung thư biểu mô nhú thận (papillary kidney carcinoma - KIRP), ung thư biểu mô tuyến phổi (lung adenocarcinoma - LUAD), ung thư biểu mô tế bào hình vảy đầu và cổ (head and neck squamous cell carcinoma - HNSC), ung thư biểu mô tuyến tiền liệt (prostate adenocarcinoma - PRAD), ung thư biểu mô nội mạc tử cung thể tử cung (uterine corpus endometrial carcinoma - UCEC), bệnh ung thư cổ tử cung (cervical cancer - CESC), u melanin da (cutaneous melanoma - SKCM), u trung biểu mô (mesothelioma - MESO), bệnh ung thư bàng quang tế bào chuyển tiếp (urothelial bladder cancer - BLCA), ung thư biểu mô tế bào sáng ở thận (clear cell kidney carcinoma - KIRC), ung thư biểu mô tế bào hình vảy ở phổi (lung squamous cell carcinoma - LUSC), ung thư biểu mô sacom tử cung (uterine carcinosarcoma - UCS), sacom (sarcoma - SARC), ung thư biểu mô u tuyến huyết thanh buồng trứng (ovarian serous cystadenocarcinoma - OV), ung thư biểu mô tuyến giáp dạng nhú (papillary thyroid carcinoma - THCA), u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng (glioblastoma multiforme - GBM), bệnh ung thư vú (breast cancer - BRCA), u thần kinh đệm cấp độ thấp (lower grade glioma - LGG), và u limphô tế bào B lớn lan tỏa (diffuse large B-cell lymphoma - DLBC). Các kết quả được bộc lộ trong bản mô tả này là dựa hoàn toàn hoặc một phần vào dữ liệu được tạo ra bởi mạng tra cứu TCGA. Fig.6B thể hiện PVR của người trong mô ung thư biểu mô tuyến kết tràng so với biểu mô kết tràng bình thường, với các vùng tối hơn trong mẫu ung thư biểu mô tuyến biểu thị mức độ biểu hiện PVR tăng. Xem ví dụ 9.

Fig.7 thể hiện sự gắn kết thụ thể Fc $\gamma$ , tính theo tỷ lệ phần trăm của trị số gắn kết thụ thể lớn nhất theo lý thuyết ( $R_{max}$ ), đối với mAb kháng TIGIT 22G2 được định dạng dưới dạng IgG1f (SEQ ID NO.45) hoặc IgG1.1f (SEQ ID NO.48). Dữ liệu được thể hiện đối với sáu thụ thể Fc $\gamma$  khác nhau, đối với hai nhóm khác nhau của kháng thể IgG1.1f, được sử dụng ở nồng độ 10 $\mu$ M và 1 $\mu$ M, như được biểu thị. Trong mỗi nhóm cột, dữ liệu đối với các thụ thể Fc $\gamma$  được trình bày theo thứ tự, từ trái sang phải: hCD64 (Fc $\gamma$ RI); hCD32a-H131 (Fc $\gamma$ RIIA-H131); hCD32a-R131 (Fc $\gamma$ RIIA-R131); hCD32b (Fc $\gamma$ RIIB); hCD16a-V158 (Fc $\gamma$ RIIIA-V158); và hCD16b-NA2 (Fc $\gamma$ RIIIB-NA2, trong đó NA2 chỉ biến thể alotyp). Mặc dù các cặp của các thụ thể Fc $\gamma$  được biểu thị bởi các cột giống nhau, nhưng đặc tính của chúng là rõ ràng theo thứ tự mà chúng được biểu thị. Mức giảm

giống nhau được quan sát đối với gắn kết với các thụ thể Fcγ của khỉ *Cynomolgus* CD64, CD32a, CD32b, và CD16 (không được thể hiện trên hình vẽ).

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể phân lập, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng, ví dụ kháng thể đơn dòng của người, mà gắn kết đặc hiệu với TIGIT của người (“huTIGIT”) và phong bế sự gắn kết với PVR/CD155, nhờ đó làm giảm hoặc làm mất tín hiệu ức chế miễn dịch mà nếu không tín hiệu này sẽ xuất hiện trong các tế bào biểu hiện TIGIT. Sáng chế còn đề xuất các kháng thể phân lập, đặc biệt là các kháng thể đơn dòng, ví dụ các kháng thể đơn dòng của người hoặc được làm giống như của người, mà gắn kết đặc hiệu với TIGIT của người và phong bế sự tương tác của TIGIT của người với DNAM-1/CD226 mà nếu không sự tương tác này sẽ ngăn ngừa sự nhị trùng hóa đồng nhất DNAM-1 và do đó, sự đồng kích thích gián tiếp qua DNAM-1. Các trình tự được đưa ra đối với nhiều kháng thể đơn dòng kháng huTIGIT của người khác nhau. Theo các phương án nhất định, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này thu được từ các trình tự dòng mầm của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cụ thể và/hoặc bao gồm các đặc điểm cấu trúc cụ thể như các vùng CDR chứa các trình tự axit amin cụ thể.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất các kháng thể này, thể tiếp hợp miễn dịch và phân tử đặc hiệu kép chứa các kháng thể này hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và được phẩm được bào chế để chứa các kháng thể hoặc các mảnh này. Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng các kháng thể này để tăng cường đáp ứng miễn dịch, riêng rẽ hoặc kết hợp với các chất kích thích sinh miễn dịch khác (ví dụ, kháng thể) và/hoặc các liệu pháp điều trị ung thư hoặc chống lây nhiễm. Do đó, các kháng thể kháng huTIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng điều trị, bao gồm, ví dụ ức chế sự sinh trưởng khối u và điều trị bệnh nhiễm virus mạn tính.

### Thuật ngữ

Để phân mô tả này có thể được dễ hiểu hơn, trước tiên các thuật ngữ nhất định được định nghĩa. Các định nghĩa bổ sung được đưa ra xuyên suốt phần mô tả chi tiết.

TIGIT được sử dụng để chỉ “thụ thể miễn dịch tế bào T có miền Ig và miền ITIM,” một thành viên thuộc họ PVR (poliovirus receptor - thụ thể virus gây bệnh viêm tủy xám) của các protein globin miễn dịch, mà gắn kết với PVR/CD155 và Nectin-

2/CD112. TIGIT cũng được gọi là TIGIT, WUCAM, Vstm3 và Vsig9. Trừ khi có chỉ dẫn khác, hoặc rõ ràng trong ngữ cảnh, việc đề cập đến TIGIT trong bản mô tả này chỉ TIGIT của người (“huTIGIT”), và các kháng thể kháng TIGIT chỉ các kháng thể kháng TIGIT của người. TIGIT của người còn được mô tả trong GENE ID NO: 201633 và MIM (Mendelian Inheritance in Man - sự di truyền theo thuyết Mendel ở người): 612859. Trình tự của TIGIT của người (NP\_776160.2), bao gồm 21 trình tự tín hiệu axit amin, được nêu trong SEQ ID NO.1. Trừ khi có chỉ dẫn khác, hoặc rõ ràng trong ngữ cảnh, “sự ức chế” TIGIT được sử dụng để chỉ việc phong bế gắn kết và truyền tín hiệu của PVR. Các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế có thể tác động bằng cách ức chế sự truyền tín hiệu TIGIT, sự phong bế tương tác TIGIT/DNAM-1 và/hoặc các cơ chế khác, như nhằm làm suy kiệt các tế bào T điều hòa.

PVR (thụ thể virus gây bệnh viêm tủy xám) tương tác với TIGIT để gây ra tín hiệu ức chế miễn dịch. PVR còn được gọi là PVS; HVED; CD155; NECL5; TAGE4; Nec1-5. Trừ khi có chỉ dẫn khác, hoặc rõ ràng trong ngữ cảnh, việc đề cập đến PVR/CD155 trong bản mô tả này chỉ PVR của người (“huPVR”). PVR của người còn được mô tả trong GENE ID NO: 5817 và MIM: 173850. Có bốn biến thể sản phẩm phiên mã PVR của người đã biết: alpha (NP\_006496.4), beta (NP\_001129240.1), gamma (NP\_001129241.1) và delta (NP\_001129242.2), các trình tự của chúng được nêu trong các SEQ ID NO.50 – 53. Trừ khi có chỉ dẫn khác, việc đề cập đến PVR hoặc PVR của người liên quan đến polypeptit phiên mã alpha.

Trừ khi có chỉ dẫn khác hoặc rõ ràng trong ngữ cảnh, thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả này có thể bao gồm kháng thể nguyên vẹn và các mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ (tức là “phần gắn kết kháng nguyên”) hoặc các chuỗi đơn của chúng. “Kháng thể” được sử dụng để chỉ, theo một phương án, glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là  $V_H$ ) và vùng hằng định của chuỗi nặng. Trong các kháng thể IgG, IgD và IgA có trong tự nhiên nhất định, vùng hằng định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Trong các kháng thể có trong tự nhiên nhất định, mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là  $V_L$ ) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền,  $C_L$ . Các vùng  $V_H$  và  $V_L$  có thể còn được chia nhỏ thành các vùng có khả

năng siêu biến, được gọi là vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR), rải rác là các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (framework region - FR). Mỗi  $V_H$  và  $V_L$  bao gồm ba CDR và bốn vùng khung (framework region - FR), được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Vùng hằng định của các kháng thể có thể là trung gian gắn kết globulin miễn dịch với mô của vật chủ hoặc các yếu tố, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ thống bổ thể cổ điển.

Các kháng thể thường gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên cùng họ của chúng với ái lực cao, được phản ánh bởi hằng số phân ly ( $K_D$ ) nằm trong khoảng từ  $10^{-7}$  đến  $10^{-11}$  M hoặc nhỏ hơn.  $K_D$  bất kỳ lớn hơn  $10^{-6}$  M nói chung được coi là biểu thị gắn kết không đặc hiệu. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể mà “gắn kết đặc hiệu” với kháng nguyên được sử dụng để chỉ kháng thể mà gắn kết với kháng nguyên và các kháng nguyên gần giống với ái lực cao, điều này có nghĩa là có  $K_D$  là  $10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là  $10^{-8}$  M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là  $5 \times 10^{-9}$  M hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ  $10^{-8}$  M đến  $10^{-10}$  M hoặc nhỏ hơn, nhưng không gắn kết với ái lực cao với các kháng nguyên không liên quan. Kháng nguyên “gần giống” với kháng nguyên đã định nếu nó có độ đồng nhất trình tự ở mức độ cao với kháng nguyên đã định này, ví dụ nếu nó có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, hoặc tốt hơn nữa là ít nhất 99% so với trình tự của kháng nguyên đã định này. Để làm ví dụ, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với TIGIT của người cũng có thể phản ứng chéo với TIGIT từ các loài động vật linh trưởng không phải người nhất định (ví dụ, khỉ *Cynomolgus*), nhưng có thể không phản ứng chéo với TIGIT từ các loài khác, hoặc với kháng nguyên không phải là TIGIT.

Các kháng thể có thể có các cải biến ở các gốc axit amin đầu tận cùng N và/hoặc C. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra từ cấu trúc mã hóa gốc lysin đầu tận cùng C, ví dụ trên chuỗi nặng, nhưng lysin đầu tận cùng C này có thể không có mặt một phần hoặc hoàn toàn trong kháng thể trị liệu mà được bán hoặc được sử dụng. Theo cách khác, kháng thể có thể được tạo ra từ các cấu trúc mà đặc biệt không mã hóa gốc lysin đầu tận cùng C mặc dù lysin này có mặt trong kháng thể bố mẹ mà từ đó kháng thể trị liệu này được tạo ra. Theo một ví dụ khác, gốc glutamin hoặc axit glutamic đầu tận

cùng N trong kháng thể theo sáng chế có thể được chuyển hóa một phần hoặc toàn bộ thành axit pyro-glutamic trong kháng thể trị liệu mà được bán hoặc được sử dụng. Dạng bất kỳ của glutamin hoặc axit glutamic có mặt ở đầu tận cùng N của chuỗi kháng thể, bao gồm axit pyro-glutamic, được bao gồm trong thuật ngữ “glutamin” được sử dụng trong bản mô tả này. Do đó, các trình tự chuỗi kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có gốc glutamin hoặc axit glutamic đầu tận cùng N bao gồm các chuỗi kháng thể không phụ thuộc vào mức độ tạo ra axit pyro-glutamic.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, globulin miễn dịch có thể từ isotyp bất kỳ trong số các isotyp phổ biến đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgA, tiết IgA, IgG và IgM. Isotyp IgG được chia thành các phân nhóm ở các loài nhất định: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 ở người, và IgG1, IgG2a, IgG2b và IgG3 ở chuột nhắt. Globulin miễn dịch, ví dụ IgG1 của người, tồn tại trong một số alotyp, mà khác nhau ở nhiều nhất là vài axit amin. Trừ khi có chỉ dẫn khác, “kháng thể” có thể bao gồm, để làm ví dụ, các kháng thể đơn dòng và đa dòng; kháng thể khảm và được làm giống như của người; kháng thể của người và không phải của người; kháng thể tổng hợp hoàn toàn; và các kháng thể đơn chuỗi.

Thuật ngữ “phần gắn kết kháng nguyên” hoặc “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể, được sử dụng trong bản mô tả này, được sử dụng để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, TIGIT của người). Ví dụ về các mảnh gắn kết bao hàm trong thuật ngữ “phần/mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab - mảnh có hóa trị một chứa các miền  $V_L$ ,  $V_H$ , CL và CH1; (ii) mảnh  $F(ab')_2$  - mảnh có hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu nối disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh  $F_d$  chứa các miền  $V_H$  và CH1; (iv) mảnh  $F_v$  chứa các miền  $V_L$  và  $V_H$  của một nhánh của kháng thể, và (v) mảnh dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546) chứa miền  $V_H$ . Vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) phân lập, hoặc tổ hợp hai hoặc nhiều CDR phân lập được nối bằng cầu nối tổng hợp, có thể bao gồm và miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể nếu có thể gắn kết kháng nguyên.

Cấu trúc của kháng thể đơn chuỗi cũng được bao gồm trong sáng chế. Mặc dù hai miền của mảnh  $F_v$ ,  $V_L$  và  $V_H$ , được mã hóa bởi các gen riêng rẽ, chúng có thể được nối, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu nối tổng hợp mà cho phép chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn trong đó các vùng  $V_L$  và  $V_H$  cặp đôi để

tạo ra phân tử có hóa trị một đã biết là Fv đơn chuỗi (single chain Fv - scFv); xem, ví dụ Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; và Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Các kháng thể đơn chuỗi này cũng được dự định bao hàm trong thuật ngữ “phần/mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các cấu trúc này và các cấu trúc tiềm năng khác được mô tả trong Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Các mảnh kháng thể này được tạo ra bằng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, và các mảnh này được sàng lọc tính hữu ích theo cách giống như các kháng thể nguyên vẹn. Phần/mảnh gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách phân cắt bằng enzym hoặc hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, từ “mảnh” được sử dụng kèm theo kháng thể, như trong yêu cầu bảo hộ, được sử dụng để chỉ mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, sao cho “kháng thể hoặc mảnh” có nghĩa giống như “kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.”

“Kháng thể đặc hiệu kép” hoặc “kháng thể hai chức” là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau, dẫn đến có hai vị trí gắn kết kháng nguyên có tính đặc hiệu đối với các kháng nguyên khác nhau. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp bao gồm dung hợp các tế bào lai hoặc liên kết các mảnh Fab'. Xem, ví dụ Songsivilai & Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315; Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1547.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng,” được sử dụng trong bản mô tả này, được sử dụng để chỉ kháng thể mà biểu hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực đối với epitop cụ thể hoặc thành phần của kháng thể trong đó tất cả các kháng thể biểu hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực đối với epitop cụ thể. Thông thường, các kháng thể đơn dòng này sẽ thu được từ đơn bào hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể này, và sẽ được nhân giống mà không đưa các biến đổi trình tự bất kỳ vào một cách chủ ý. Do đó, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng của người” được sử dụng để chỉ kháng thể đơn dòng mà có các vùng biến đổi và tùy ý các vùng hằng định thu được từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bằng tế bào lai, ví dụ được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào B thu được từ động vật không phải là người chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể (ví dụ, chuột nhắt chuyển gen có hệ gen chứa gen chuyển chuỗi nặng và gen chuyển chuỗi nhẹ của người), với tế bào được bất tử hóa.

Thuật ngữ “kháng thể của người tái tổ hợp”, được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm tất cả các kháng thể của người mà được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách tái tổ hợp, như (a) các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) là chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó, (b) các kháng thể được phân lập từ tế bào vật chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể này, ví dụ từ tế bào chuyển nạp, (c) các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể của người kết hợp tái tổ hợp, và (d) các kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách khác bất kỳ liên quan đến việc ghép nối các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác. Các kháng thể của người tái tổ hợp như vậy chứa các vùng biến đổi và các vùng hằng định mà sử dụng các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người cụ thể được mã hóa bởi các gen dòng mầm, nhưng bao gồm các sắp xếp lại và các đột biến liên tiếp xảy ra, ví dụ trong quá trình trưởng thành kháng thể. Như đã biết trong lĩnh vực này (*xem*, ví dụ Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), vùng biến đổi chứa miền gắn kết kháng nguyên, mà được mã hóa bởi các gen khác nhau mà sắp xếp lại để tạo ra kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên ngoại lai. Ngoài sự sắp xếp lại, vùng biến đổi có thể còn được cải biến bằng nhiều thay đổi axit amin đơn (được gọi là sự đột biến hoặc siêu đột biến sinh dưỡng) để làm tăng ái lực của kháng thể này với kháng nguyên ngoại lai. Vùng hằng định sẽ thay đổi trong đáp ứng tiếp với kháng nguyên (tức là, chuyển isotyp). Do đó, các trình tự axit nucleic được sắp xếp lại và được gây đột biến sinh dưỡng mà mã hóa các polypeptit globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong đáp ứng với kháng nguyên có thể không giống với các trình tự dòng mầm ban đầu, nhưng thay vào đó sẽ gần giống hoặc tương tự (tức là, có độ đồng nhất ít nhất là 80%).

“Kháng thể của người (HuMAb) được sử dụng để chỉ kháng thể có các vùng biến đổi trong đó cả vùng khung và vùng CDR thu được từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Ngoài ra, nếu kháng thể này chứa vùng hằng định, thì vùng hằng định này cũng thu được từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Kháng thể của người theo sáng chế có thể chứa các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến sinh dưỡng *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người”, được sử dụng trong bản mô tả này, không được dự định bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng

mầm của một loài động vật có vú khác, như chuột nhắt, đã được ghép trên các trình tự khung của người. Các thuật ngữ kháng thể “của người” và kháng thể “hoàn toàn của người” được sử dụng một cách đồng nghĩa.

Kháng thể “được làm giống như của người” được sử dụng để chỉ kháng thể trong đó một số, hầu hết hoặc tất cả các axit amin bên ngoài miền CDR của kháng thể không phải của người, ví dụ kháng thể của chuột nhắt, được thay thế bằng các axit amin tương ứng thu được từ globulin miễn dịch của người. Theo một phương án về dạng được làm giống như của người của kháng thể, một số, hầu hết hoặc tất cả các axit amin bên ngoài miền CDR đã được thay thế bằng các axit amin từ globulin miễn dịch của người, còn một số, hầu hết hoặc tất cả các axit amin trong một hoặc nhiều vùng CDR là không đổi. Các thêm đoạn, mất đoạn, xen đoạn, thay thế hoặc cải biến nhỏ của các axit amin là được phép miễn là chúng không làm mất khả năng của kháng thể gắn kết với kháng nguyên cụ thể. Kháng thể “được làm giống như của người” giữ được tính đặc hiệu kháng nguyên tương tự như tính đặc hiệu kháng nguyên của kháng thể ban đầu.

“Kháng thể khảm” được sử dụng để chỉ kháng thể trong đó vùng biến đổi có nguồn gốc từ một loài và vùng hằng định có nguồn gốc từ một loài khác, như kháng thể trong đó vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể của chuột nhắt và vùng hằng định có nguồn gốc từ kháng thể của người. Kháng thể “lai” được sử dụng để chỉ kháng thể có các chuỗi nặng và nhẹ thuộc các loại khác nhau, như chuỗi nặng của chuột nhắt (bố mẹ) và chuỗi nhẹ được làm giống như của người, hoặc *ngược lại*.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “isotyp” được sử dụng để chỉ nhóm kháng thể (ví dụ, kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, và IgE) mà được mã hóa bởi các gen của vùng hằng định của chuỗi nặng.

“Alotyp” được sử dụng để chỉ các biến thể có trong tự nhiên trong một nhóm isotyp cụ thể, các biến thể này khác nhau ở một hoặc vài axit amin. Xem, ví dụ Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1.

Các cụm từ “kháng thể nhận diện kháng nguyên” và “kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này với thuật ngữ “kháng thể gắn kết đặc biệt với kháng nguyên.”

“Kháng thể phân lập,” được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ kháng thể gần như được tách khỏi các kháng thể khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng

thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với TIGIT gần như được tách khỏi các kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên không phải là TIGIT). Tuy nhiên, kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với epitop của TIGIT của người có thể có khả năng phản ứng chéo với các protein TIGIT khác từ các loài khác.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể mà “ức chế gắn kết của PVR với TIGIT” được sử dụng để chỉ kháng thể mà ức chế gắn kết của PVR của người với TIGIT của người với EC50 khoảng 1µg/mL hoặc nhỏ hơn, như khoảng 0,9µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,85µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,8µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,75µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,7µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,65µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,6µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,55µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,5µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,45µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,4µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,35µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,3µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,25µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,2µg/mL hoặc nhỏ hơn, khoảng 0,15µg/mL hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 0,1µg/mL hoặc nhỏ hơn, trong các phương pháp được công nhận trong lĩnh vực này, ví dụ trong thử nghiệm gắn kết tế bào trên cơ sở FACS.

“Chức năng hiệu ứng,” có nguồn gốc từ sự tương tác của vùng Fc của kháng thể với các thụ thể Fc nhất định, bao gồm, nhưng không nhất thiết giới hạn ở, gắn kết C1q, tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), gắn kết thụ thể Fc, chức năng hiệu ứng gián tiếp qua FcγR như ADCC và sự thực bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP), và điều chỉnh giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR). Các chức năng hiệu ứng này thường yêu cầu vùng Fc kết hợp với miền gắn kết kháng nguyên (ví dụ, miền biến đổi của kháng thể).

“Thụ thể Fc” hoặc “FcR” là thụ thể mà gắn kết với vùng Fc của globulin miễn dịch. FcR mà gắn kết với kháng thể IgG bao gồm các thụ thể thuộc họ FcγR, bao gồm các biến thể alen và các dạng được ghép theo cách khác của các thụ thể này. Họ FcγR được cấu thành từ ba thụ thể hoạt hóa (FcγRI, FcγRIII, và FcγRIV ở chuột nhắt; FcγRIA, FcγRIIA, và FcγRIIIA ở người) và một thụ thể ức chế (FcγRIIb, hoặc một cách tương đương là FcγRIIB). Các đặc tính khác nhau của FcγR của người được tổng kết trong bảng 1. Phần lớn các loại tế bào hiệu ứng bẩm sinh đồng biểu hiện một hoặc nhiều FcγR hoạt hóa và FcγRIIb ức chế, còn tế bào giết tự nhiên (NK) biểu hiện chọn lọc một thụ thể Fc hoạt hóa (FcγRIII ở chuột nhắt và FcγRIIIA ở người) nhưng không biểu hiện FcγRIIb ức

chế ở chuột nhắt và người. IgG1 của người gắn kết với hầu hết các thụ thể Fc của người và được coi là tương đương với IgG2a của chuột về các loại thụ thể Fc hoạt hóa mà nó gắn kết với.

Bảng 1

Đặc tính của Fc $\gamma$ R của người

| Fc $\gamma$       | Biến thể alen    | Ái lực đối với IgG của người | Sự ưu tiên isotyp | Sự phân bố trong tế bào                                                                            |
|-------------------|------------------|------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fc $\gamma$ RI    | Không được mô tả | Cao ( $K_D \sim 10$ nM)      | IgG1=3>4>>2       | Bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu trung tính được hoạt hóa, tế bào đuôi gai?               |
| Fc $\gamma$ RIIA  | H131             | Thấp đến trung bình          | IgG1>3>2>4        | Bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu ưa eosin, tế bào đuôi gai, tiểu cầu |
|                   | R131             | Thấp                         | IgG1>3>4>2        |                                                                                                    |
| Fc $\gamma$ RIIIA | V158             | Trung bình                   | IgG1=3>>4>2       | Tế bào NK, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, dưỡng bào, bạch cầu ưa eosin, tế bào đuôi gai?         |
|                   | F158             | Thấp                         | IgG1=3>>4>2       |                                                                                                    |
| Fc $\gamma$ RIIb  | I232             | Thấp                         | IgG1=3=4>2        | Tế bào B, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào đuôi gai, dưỡng bào                              |
|                   | T232             | Thấp                         | IgG1=3=4>2        |                                                                                                    |

“Vùng Fc” (vùng có khả năng kết tinh của mảnh) hoặc “miền Fc” hoặc “Fc” được sử dụng để chỉ vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng của kháng thể mà điều phối gắn kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm việc gắn kết với các thụ thể Fc nằm trên các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) hoặc với thành phần thứ nhất (C1q) của hệ thống bổ thể kinh điển. Do đó, vùng Fc bao gồm vùng hằng định của kháng thể ngoại trừ miền globulin miễn dịch của vùng hằng định thứ nhất (ví dụ, CH1 hoặc CL). Trong các isotyp của kháng thể IgG, IgA và IgD, vùng Fc chứa các miền ổn định C<sub>H2</sub> và C<sub>H3</sub> trong mỗi hai chuỗi nặng của kháng thể; các vùng Fc của IgM và IgE chứa ba miền ổn định của chuỗi nặng (các miền C<sub>H</sub> 2-4) trong mỗi chuỗi polypeptit. Đối với IgG, vùng Fc chứa các miền globulin miễn dịch C $\gamma$ 2 và C $\gamma$ 3 và bản lề giữa C $\gamma$ 1 và C $\gamma$ 2. Mặc dù ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể thay đổi, vùng Fc của chuỗi nặng của IgG của người thường được xác định là kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí C226 hoặc P230 (hoặc axit amin giữa hai axit amin này) đến đầu tận cùng carboxy của chuỗi nặng, trong đó đánh số là theo chỉ số EU như trong Kabat. Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD; cũng xem các FIG.3c-3f của công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0248028. Miền C<sub>H2</sub> của vùng Fc IgG của người

mở rộng từ axit amin 231 đến axit amin 340, còn miền  $C_{H3}$  nằm phía bên đầu tận cùng C của miền  $C_{H2}$  trong vùng Fc, tức là nó mở rộng từ axit amin 341 đến axit amin 447 của IgG (kể cả lysin đầu tận cùng C). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, vùng Fc có thể là Fc trình tự nguyên thể, kể cả biến thể alotyp bất kỳ, hoặc Fc biến thể (ví dụ, Fc không có trong tự nhiên). Fc cũng có thể chỉ vùng này trong quá trình phân lập hoặc trong trường hợp polypeptit protein chứa Fc như “protein gắn kết chứa vùng Fc,” cũng được gọi là “protein dung hợp Fc” (ví dụ, kháng thể hoặc chất bám dính miễn dịch).

Trừ khi có chỉ dẫn khác, hoặc rõ ràng trong ngữ cảnh, việc đánh số gốc axit amin trong vùng Fc của kháng thể là theo quy ước đánh số EU, ngoại trừ khi chỉ cụ thể các gốc trong trình tự trong phần Danh mục trình tự, trong trường hợp này, việc đánh số nhất thiết phải liên tiếp. Ví dụ, các tài liệu tham khảo chuyên ngành về tác dụng của các thay thế axit amin trong vùng Fc thường sẽ sử dụng việc đánh số theo EU, mà cho phép việc đề cập đến gốc đã định bất kỳ trong vùng Fc của kháng thể bởi cùng một số không phụ thuộc vào chiều dài của miền biến đổi mà nó được gắn vào. Trong các trường hợp hiếm có, có thể cần phải đề cập đến tài liệu được viện dẫn để xác nhận gốc Fc chính xác được đề cập.

“Vùng Fc trình tự nguyên thể” hoặc “Fc trình tự nguyên thể” bao gồm trình tự axit amin đồng nhất với trình tự axit amin của vùng Fc được tìm thấy trong tự nhiên. Các vùng Fc của người trình tự nguyên thể bao gồm vùng Fc IgG1 của người trình tự nguyên thể; vùng Fc IgG2 của người trình tự nguyên thể; vùng Fc IgG3 của người trình tự nguyên thể; và vùng Fc IgG4 của người trình tự nguyên thể cũng như các biến thể có trong tự nhiên của chúng. Fc trình tự nguyên thể bao gồm các alotyp khác nhau của Fc. Xem, ví dụ Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1.

Thuật ngữ “epitop” hoặc “quyết định kháng nguyên” được sử dụng để chỉ vị trí trên kháng nguyên (ví dụ, TIGIT) mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn kết đặc hiệu vào. Các epitop trong các kháng nguyên protein có thể được tạo ra cả từ các axit amin liên kề (thường là epitop dạng thẳng) hoặc các axit amin không liên kề được đặt cạnh nhau nhờ gấp cuộn bậc ba của protein (thường là epitop cấu hình riêng). Các epitop được tạo ra từ các axit amin liên kề thường, nhưng không phải luôn luôn, được giữ được khi tiếp xúc với các dung môi biến tính, còn các epitop được tạo ra bằng cách gấp cuộn bậc ba thường bị mất khi xử lý bằng các dung môi biến tính. Epitop thường chứa ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin trong cấu hình không gian duy nhất.

Thuật ngữ “lập bản đồ epitop” được sử dụng để chỉ quá trình xác định các yếu tố quyết định của phân tử trên kháng nguyên liên quan đến việc nhận diện kháng thể-kháng nguyên. Các phương pháp xác định epitop được liên kết bởi kháng thể đã định là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ thử nghiệm thẩm tách miễn dịch và kết tủa miễn dịch, trong đó các peptit chồng chéo hoặc liên kế từ (ví dụ, từ TIGIT) được thử nghiệm về khả năng phản ứng với kháng thể đã định (ví dụ, kháng thể kháng TIGIT); tinh thể học tia X; cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều; hiển thị trên nấm men (*xem ví dụ 4 trong bản mô tả này*); và HDX-MS (*xem, ví dụ Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)*).

Thuật ngữ “gắn kết với cùng epitop” liên quan đến hai hoặc nhiều kháng thể có nghĩa là các kháng thể này gắn kết với cùng đoạn của các gốc axit amin, khi được xác định bằng phương pháp đã định. Các kỹ thuật để xác định xem các kháng thể có gắn kết với “cùng epitop trên TIGIT” với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này hay không bao gồm, ví dụ các phương pháp lập bản đồ epitop, như, phân tích bằng tia x các tinh thể của phức hợp kháng nguyên:kháng thể, mà cung cấp độ phân giải nguyên tử của epitop, và khối phổ trao đổi hydro/deuteri (HDX-MS). Các phương pháp khác giám sát gắn kết của kháng thể với các mảnh kháng nguyên (ví dụ, các mảnh phân giải protein) hoặc với các biến đổi được gây đột biến của kháng nguyên trong đó mất sự gắn kết do cải biến của gốc axit amin trong trình tự của kháng nguyên thường được coi là thông tin biểu thị thành phần epitop, như sự gây đột biến quét alanin (Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1081) hoặc hiển thị trên nấm men của các biến thể trình tự đích đột biến (*xem ví dụ 4 trong bản mô tả này*). Ngoài ra, các phương pháp tổ hợp bằng máy tính để lập bản đồ epitop cũng có thể được sử dụng. Các phương pháp này dựa vào khả năng của kháng thể cần quan tâm để tách bằng ái lực các peptit ngắn cụ thể từ thư viện peptit hiển thị thể thực khuẩn tổ hợp. Các kháng thể có VH và VL giống nhau hoặc liên quan gần hoặc các trình tự CDR giống nhau được kỳ vọng là gắn kết với cùng epitop.

Các kháng thể mà “cạnh tranh với một kháng thể khác để gắn kết với đích” chỉ các kháng thể mà ức chế (một phần hoặc hoàn toàn) gắn kết của kháng thể khác với đích. Dù hai kháng thể có cạnh tranh với nhau để gắn kết với đích hay không, tức là dù và đến mức độ nào một kháng thể ức chế sự gắn kết của kháng thể kia với đích hay không, có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm cạnh tranh đã biết. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh với, và ức chế gắn kết của một kháng thể khác

với đích xuống ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 100%. Mức độ ức chế hoặc cạnh tranh có thể khác nhau tùy thuộc vào kháng thể nào là “kháng thể phong bế” (tức là kháng thể lạnh mà được ủ trước tiên với đích). Các thử nghiệm cạnh tranh có thể được tiến hành như được mô tả, ví dụ trong Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc.; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 hoặc trong chương 11 của “Using Antibodies” của Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Các kháng thể cạnh tranh gắn kết với cùng epitop, epitop chồng chéo hoặc với các epitop liền kề (ví dụ, như được chứng minh bởi sự cản trở không gian).

Các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh khác bao gồm: thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm miễn dịch enzyme (enzyme immunoassay - EIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm cạnh tranh kẹp (xem Stahli *et al.* (1983) *Methods in Enzymology* 9:242); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem Kirkland *et al.* (1986) *J. Immunol.* 137:3614); thử nghiệm đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm kẹp đánh dấu trực tiếp pha rắn (xem Harlow and Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA đánh dấu trực tiếp pha rắn bằng cách sử dụng chất đánh dấu I-125 (xem Morel *et al.* (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (Cheung *et al.* (1990) *Virology* 176:546); và RIA đánh dấu trực tiếp. (Moldenhauer *et al.* (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu,” “gắn kết chọn lọc,” “gắn kết một cách chọn lọc,” và “gắn kết một cách đặc hiệu,” chỉ kháng thể gắn kết với epitop trên kháng nguyên định trước nhưng không với các kháng nguyên khác. Thông thường, kháng thể (i) gắn kết với hằng số phân ly cân bằng (KD) xấp xỉ nhỏ hơn  $10^{-7}$  M, như xấp xỉ nhỏ hơn  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M hoặc  $10^{-10}$  M hoặc nhỏ hơn nữa khi được xác định bằng, ví dụ công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) trong thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE® 2000 bằng cách sử dụng kháng nguyên định trước, ví dụ TIGIT của người tái tổ hợp, làm chất phân tích và kháng thể làm phối tử, hoặc phân tích Scatchard gắn kết của kháng thể này với các tế bào dương tính với kháng nguyên, và (ii) gắn kết với kháng nguyên định trước với ái lực mà lớn hơn ít nhất hai lần ái lực của nó đối với gắn kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein) không phải là kháng nguyên định trước hoặc kháng nguyên có liên quan gần. Do đó, kháng thể mà “gắn kết đặc hiệu với TIGIT của người” được sử dụng để chỉ

kháng thể mà gắn kết với TIGIT của người hòa tan hoặc gắn với tế bào với  $K_D$  là  $10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn, như xấp xỉ nhỏ hơn  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M hoặc  $10^{-10}$  M hoặc nhỏ hơn nữa. Kháng thể mà “phản ứng chéo với TIGIT của khỉ cynomolgus” được sử dụng để chỉ kháng thể mà gắn kết với TIGIT của khỉ cynomolgus với  $K_D$  là  $10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn, như xấp xỉ nhỏ hơn  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M hoặc  $10^{-10}$  M hoặc nhỏ hơn nữa.

Thuật ngữ “ $k_{\text{assoc}}$ ” hoặc “ $k_a$ ”, được sử dụng trong bản mô tả này, được sử dụng để chỉ hằng số tốc độ liên kết của tương tác kháng nguyên-kháng thể cụ thể, còn thuật ngữ “ $k_{\text{dis}}$ ” hoặc “ $k_d$ ,” được sử dụng trong bản mô tả này, được sử dụng để chỉ hằng số tốc độ phân ly của tương tác kháng nguyên-kháng thể cụ thể. Thuật ngữ “ $K_D$ ,” được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ hằng số phân ly cân bằng, được tính bằng tỷ lệ của  $k_d$  và  $k_a$  (tức là  $k_d/k_a$ ) và được thể hiện dưới dạng nồng độ mol (M). Các giá trị  $K_D$  của kháng thể có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp được ưu tiên để xác định  $K_D$  của kháng thể bao gồm phân tích đo giao thoa lớp sinh học (biolayer interferometry - BLI), tốt hơn là bằng cách sử dụng thiết bị ForteBio Octet RED, cộng hưởng plasmon bề mặt, tốt hơn là bằng cách sử dụng hệ thống cảm biến sinh học như hệ thống cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE® (xem, ví dụ Ví dụ 2), hoặc miễn dịch dòng tế bào và phân tích Scatchard.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ái lực cao” đối với kháng thể IgG được sử dụng để chỉ kháng thể có  $K_D$  là  $10^{-8}$  M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là  $10^{-9}$  M hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nữa là  $10^{-10}$  M hoặc nhỏ hơn đối với kháng nguyên đích. Tuy nhiên, việc gắn kết “ái lực cao” có thể thay đổi đối với các isotyp kháng thể khác. Ví dụ, gắn kết “ái lực cao” đối với isotyp IgM chỉ kháng thể có  $K_D$  là  $10^{-7}$  M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là  $10^{-8}$  M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ “EC50” trong trường hợp thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* sử dụng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được sử dụng để chỉ nồng độ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gây ra đáp ứng bằng 50% đáp ứng lớn nhất, tức là nửa chừng giữa đáp ứng lớn nhất và đường nền.

Thuật ngữ “gắn kết với TIGIT được giữ cố định” được sử dụng để chỉ khả năng của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này gắn kết với TIGIT, ví dụ được biểu hiện trên bề mặt của tế bào hoặc được gắn với chất mang rắn.

Thuật ngữ “phản ứng chéo,” được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ khả năng của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này gắn kết với TIGIT từ loài khác. Ví dụ, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này mà gắn kết với TIGIT của người cũng có thể gắn kết với TIGIT từ một loài khác (ví dụ, TIGIT của khỉ cynomolgus). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, khả năng phản ứng chéo có thể được đo bằng cách phát hiện khả năng phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên đã được làm sạch trong thử nghiệm gắn kết (ví dụ, SPR, ELISA) hoặc gắn kết với, hoặc nếu không tương tác về mặt chức năng với, các tế bào biểu hiện TIGIT về mặt sinh lý học. Các phương pháp xác định khả năng phản ứng chéo bao gồm các thử nghiệm gắn kết chuẩn như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) BIACORE® sử dụng thiết bị BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Thụy Điển), hoặc kỹ thuật miễn dịch dòng tế bào.

Thuật ngữ “có trong tự nhiên” được sử dụng trong bản mô tả này khi được áp dụng cho đối tượng được sử dụng để chỉ thực tế là đối tượng này có thể được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ, trình tự polypeptit hoặc polynucleotit mà có mặt trong sinh vật (kể cả virus) mà có thể được phân lập từ nguồn trong tự nhiên và chưa được cải biến một cách chủ ý bởi con người trong phòng thí nghiệm là có trong tự nhiên.

“Polypeptit” được sử dụng để chỉ chuỗi chứa ít nhất hai gốc axit amin được liên kết liên tiếp, mà không có giới hạn trên về chiều dài của chuỗi này. Một hoặc nhiều gốc axit amin trong protein này có thể chứa cải biến như, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự glycosyl hóa, sự phosphoryl hóa hoặc liên kết disulfua. “Protein” có thể bao gồm một hoặc nhiều polypeptit.

Thuật ngữ “phân tử axit nucleic,” được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể có sợi đơn hoặc sợi kép, và có thể là cADN (ADN bổ trợ).

Cũng được đề xuất là “các cải biến trình tự bảo toàn” đối với trình tự kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, *tức là*, các cải biến trình tự nucleotit và axit amin mà không làm mất gắn kết của kháng thể được mã hóa bởi trình tự nucleotit này hoặc chứa trình tự axit amin này, với kháng nguyên. Ví dụ, các cải biến có thể được đưa vào bằng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như gây đột biến định hướng vị trí và gây đột biến gián tiếp qua PCR. Các cải biến trình tự bảo toàn bao gồm các thay thế axit amin

bảo toàn, trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Họ các gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm các axit amin có mạch bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin), mạch bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, gốc axit amin không thiết yếu được dự đoán trong kháng thể kháng TIGIT tốt hơn là được thay thế bằng một gốc axit amin khác từ cùng họ mạch bên. Các phương pháp nhận diện nucleotit và các thay thế bảo toàn axit amin mà không làm mất sự gắn kết kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); và Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Theo cách khác, theo một phương án khác, các đột biến có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên dọc theo tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa kháng thể kháng TIGIT, như bằng cách gây đột biến bão hòa, và các kháng thể kháng TIGIT cải biến thu được có thể được sàng lọc về hoạt tính gắn kết cải thiện.

Đối với các axit nucleic, thuật ngữ “độ tương đồng đáng kể” cho thấy rằng hai axit nucleic, hoặc các trình tự được chỉ định của chúng, khi được bắt cặp một cách tối ưu và được so sánh, là giống nhau, với sự xen đoạn hoặc mất đoạn nucleotit thích hợp, trong ít nhất khoảng 80% các nucleotit, thường là ít nhất khoảng 90% đến 95%, và tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 98% đến 99,5% các nucleotit. Theo cách khác, độ tương đồng đáng kể tồn tại khi các đoạn này sẽ lai trong các điều kiện lai chọn lọc, với phần bổ sung của sợi.

Đối với các polypeptit, thuật ngữ “độ tương đồng đáng kể” cho thấy rằng hai polypeptit, hoặc các trình tự được chỉ định của chúng, khi được bắt cặp một cách tối ưu và được so sánh, là giống nhau, với sự xen đoạn hoặc mất đoạn axit amin thích hợp, trong ít nhất khoảng 80% các axit amin, thường là ít nhất khoảng 90% đến 95%, và tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 98% đến 99,5% các axit amin.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí giống nhau được chia sẻ bởi các trình tự này khi các trình tự này được bắt cặp một cách tối ưu (tức là % độ tương đồng =  $\frac{\text{\# vị trí giống nhau}}{\text{tổng \# vị trí}} \times 100$ ), với sự bắt cặp tối ưu được xác định

có tính đến số lượng khoảng trống, và chiều dài của mỗi khoảng trống, mà cần phải được đưa vào để bắt cặp tối ưu hai trình tự. Sự so sánh các trình tự và xác định phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán toán học, như được mô tả trong các ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế dưới đây.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, bằng cách sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và khối lượng khoảng trống là 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và khối lượng chiều dài của 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự nucleotit hoặc axit amin cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) mà được kết hợp vào trong chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), bằng cách sử dụng bảng gốc khối lượng PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống là 12 và điểm phạt khoảng trống là 4. Ngoài ra, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) mà được kết hợp vào trong chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, bằng cách sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và khối lượng khoảng trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và khối lượng chiều dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Các trình tự axit nucleic và protein được mô tả trong bản mô tả này có thể còn được sử dụng làm “trình tự truy vấn” để thực hiện tìm kiếm đối với cơ sở dữ liệu công bố để, ví dụ nhận diện các trình tự liên quan. Các tìm kiếm này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình NBLAST và XBLAST (phiên bản 2.0) của Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Tìm kiếm nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình NBLAST, điểm = 100, độ dài từ = 12 để thu được các trình tự nucleotit tương đồng với các phân tử axit nucleic được mô tả trong bản mô tả này. Tìm kiếm protein BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình XBLAST, điểm = 50, độ dài từ = 3 để thu được các trình tự axit amin tương đồng với các phân tử protein được mô tả trong bản mô tả này. Để thu được sự bắt cặp có khoảng trống nhằm mục đích so sánh, Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Khi sử dụng các chương trình BLAST and Gapped BLAST, các thông số mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ, XBLAST và NBLAST) có thể được sử dụng.

Các axit nucleic này có thể có mặt trong các tế bào nguyên vẹn, trong dịch tan tế bào, hoặc ở dạng được làm sạch một phần hoặc gần như tinh khiết. Axit nucleic là “được phân lập” hoặc “được làm gần như tinh khiết” khi được làm sạch khỏi các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ các axit nucleic khác của tế bào (ví dụ, các phần khác của nhiễm sắc thể) hoặc protein, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý kiềm/SDS, tạo dải CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel agarosa và các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực này. Xem, F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Thuật ngữ “vector,” được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển một axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Một kiểu vector là “plasmid,” được sử dụng để chỉ vòng ADN sợi kép mà đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào. Một kiểu vector khác là vector virus, trong đó đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào trong hệ gen của virus. Các vector nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào vật chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có nguồn gốc sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú episom). Các vector khác (ví dụ, vector động vật có vú không episom) có thể được hợp nhất vào trong hệ gen của tế bào vật chủ qua việc đưa vào trong tế bào vật chủ, và nhờ đó được sao chép theo hệ gen của vật chủ. Ngoài ra, các vector nhất định có khả năng hướng sự biểu hiện của gen làm chúng được liên kết có điều khiển. Trong bản mô tả này, các vector này được gọi là “vector biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là “vector biểu hiện”). Nói chung, vector biểu hiện sử dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmid. Trong bản mô tả này, “plasmid” và “vector” có thể được sử dụng thay thế nhau do plasmid là dạng vector được sử dụng phổ biến nhất. Tuy nhiên, sáng chế cũng bao gồm các dạng khác của vector biểu hiện, như các vector virus (ví dụ, các retrovirus khiếm khuyết sự sao chép, adenovirus và các virus được liên kết adeno), mà có chức năng tương đương.

Thuật ngữ “tế bào vật chủ tái tổ hợp” (hoặc một cách đơn giản “tế bào vật chủ”), được sử dụng trong bản mô tả này, dự định để chỉ tế bào mà chứa axit nucleic không có mặt tự nhiên trong tế bào này, và có thể là tế bào mà vector biểu hiện tái tổ hợp đã được đưa vào. Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ này được dự định không những chỉ tế bào đối tượng cụ thể mà còn chỉ con cháu của tế bào đó. Do các cải biến nhất định có thể xảy ra trong các thế hệ kế tiếp do đột biến hoặc ảnh hưởng môi trường, con cháu này có thể, trên

thực tế, không giống với tế bào bố mẹ, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ “tế bào vật chủ” như được sử dụng trong bản mô tả này.

“Đáp ứng miễn dịch” được sử dụng để chỉ đáp ứng sinh học ở động vật có xương sống chống lại các chất ngoại lai, đáp ứng này bảo vệ sinh vật chống lại các chất này và các bệnh do chúng gây ra. Đáp ứng miễn dịch có nguyên nhân từ tác động của tế bào của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào limphô T, tế bào limphô B, tế bào giết tự nhiên (NK), đại thực bào, bạch cầu ưa eosin, dưỡng bào, tế bào đuôi gai hoặc bạch cầu trung tính) và các đại phân tử hòa tan được sinh ra bởi tế bào bất kỳ trong số các tế bào này hoặc gan (bao gồm kháng thể, xytokin, và bổ thể) mà gây ra sự hướng đích chọn lọc, gắn kết với, làm hủy hoại, sự phá hủy của, và/hoặc làm mất khỏi cơ thể của động vật có xương sống của tác nhân gây bệnh xâm nhập, các tế bào hoặc các mô bị nhiễm tác nhân gây bệnh, các tế bào ung thư hoặc các tế bào bất thường khác, hoặc, trong các trường hợp tính tự miễn dịch hoặc chứng viêm bệnh lý, các tế bào hoặc các mô bình thường của người. Phản ứng miễn dịch bao gồm, ví dụ sự hoạt hóa hoặc ức chế tế bào T, ví dụ tế bào T hiệu ứng hoặc tế bào Th, như tế bào T  $CD8^+$  hoặc  $CD4^+$ , hoặc sự ức chế hoặc làm suy kiệt tế bào  $T_{reg}$ . Các tế bào “hiệu ứng T” (“ $T_{eff}$ ”) được sử dụng để chỉ các tế bào T (ví dụ, tế bào T  $CD4^+$  và  $CD8^+$ ) có hoạt tính tiêu tế bào cũng như các tế bào T hỗ trợ (Th), mà tiết các xytokin và hoạt hóa và định hướng các tế bào miễn dịch khác, nhưng không bao gồm các tế bào T điều hòa (tế bào  $T_{reg}$ ).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đáp ứng qua trung gian tế bào T” được sử dụng để chỉ đáp ứng gián tiếp bởi tế bào T, bao gồm tế bào T hiệu ứng (ví dụ, các tế bào  $CD8^+$ ) và tế bào T hỗ trợ (ví dụ, tế bào  $CD4^+$ ). Các đáp ứng qua trung gian tế bào T bao gồm, ví dụ tính độc tế bào và sự tăng sinh của tế bào T.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đáp ứng của tế bào limphô T gây độc tế bào (cytotoxic T lymphocyte - CTL)” được sử dụng để chỉ đáp ứng miễn dịch gây ra bởi tế bào T độc. Đáp ứng CTL chủ yếu là gián tiếp qua các tế bào T  $CD8^+$ .

“Chất điều biến miễn dịch” hoặc “chất điều hòa miễn dịch” được sử dụng để chỉ chất, ví dụ thành phần của quá trình truyền tín hiệu, mà có thể liên quan đến việc điều biến, điều hòa, hoặc biến đổi đáp ứng miễn dịch. Việc “điều biến,” “điều hòa,” hoặc “biến đổi” đáp ứng miễn dịch được sử dụng để chỉ sự biến đổi bất kỳ trong tế bào của hệ miễn dịch hoặc trong hoạt tính của tế bào này (ví dụ, tế bào T hiệu ứng). Sự điều biến này

bao gồm sự kích thích hoặc sự ức chế hệ miễn dịch, mà có thể được biểu hiện bởi sự tăng hoặc giảm số lượng các loại tế bào khác nhau, sự tăng hoặc giảm hoạt tính của các tế bào này, hoặc các thay đổi bất kỳ khác có thể xảy ra trong hệ miễn dịch. Cả hai chất điều biến miễn dịch ức chế và kích thích đã được nhận diện, một số trong chúng có thể có chức năng được tăng cường trong vi môi trường khối u. Theo các phương án ưu tiên, chất điều biến miễn dịch nằm trên bề mặt của tế bào T. “Đích điều biến miễn dịch” hoặc “đích điều hòa miễn dịch” là chất điều biến miễn dịch mà được hướng đích để gắn kết bởi, và hoạt tính của chúng được biến đổi bởi sự gắn kết của, chất, tác nhân, gốc, hợp chất hoặc phân tử. Các đích điều biến miễn dịch bao gồm, ví dụ các thụ thể trên bề mặt của tế bào (“các thụ thể điều biến miễn dịch”) và các phối tử thụ thể (“phối tử điều biến miễn dịch”).

“Phép trị liệu miễn dịch” được sử dụng để chỉ việc điều trị đối tượng bị, hoặc có nguy cơ nhiễm hoặc chịu sự tái phát của, bệnh bằng phương pháp bao gồm gây ra, tăng cường, ức chế hoặc nếu không biến đổi đáp ứng miễn dịch.

“Phép trị liệu kích thích miễn dịch” hoặc “phép trị liệu kích thích sinh miễn dịch” được sử dụng để chỉ phép trị liệu mà dẫn đến tăng (gây ra hoặc tăng cường) đáp ứng miễn dịch ở đối tượng để, ví dụ điều trị ung thư.

“Làm tăng khả năng đáp ứng miễn dịch nội sinh” có nghĩa là việc làm tăng hiệu quả hoặc hiệu lực của đáp ứng miễn dịch hiện có ở đối tượng. Sự tăng về hiệu quả và hiệu lực này có thể đạt được, ví dụ bằng cách khắc phục các cơ chế mà hạn chế đáp ứng miễn dịch nội sinh của vật chủ hoặc bằng cách kích thích các cơ chế mà tăng cường đáp ứng miễn dịch nội sinh của vật chủ.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được liên kết” chỉ mối liên quan của hai hoặc nhiều phân tử. Sự liên kết này có thể là đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị. Sự liên kết này cũng có thể là di truyền (tức là được dung hợp tái tổ hợp). Các liên kết như vậy có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã được công nhận trong lĩnh vực này, như tiếp hợp hóa học và sản xuất protein tái tổ hợp.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “việc dùng” chỉ việc đưa vật lý chế phẩm chứa được chất vào đối tượng, bằng cách sử dụng bất kỳ các phương pháp và các hệ phân phối khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các đường dùng được ưu tiên đối với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này bao gồm đường dùng trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, dưới da, xương sống hoặc các

đường dùng ngoài đường tiêu hóa khác, ví dụ bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ “dùng ngoài đường tiêu hóa” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là các chế độ dùng không phải là dùng trong ruột và tại chỗ, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạch, trong mạch bạch huyết, trong thương tổn, trong bao, trong ổ mắt, trong tim, trong da, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, gây tê ngoài màng cứng và trong xương ức, cũng như xung điện *in vivo*. Theo cách khác, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng thông qua đường không phải ngoài đường tiêu hóa, như đường dùng tại chỗ, biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ dùng trong mũi, qua đường miệng, qua âm đạo, qua trực tràng, dưới lưỡi hoặc tại chỗ. Việc dùng cũng có thể được thực hiện, ví dụ một lần, nhiều lần, và/hoặc trong một hoặc nhiều giai đoạn kéo dài.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “ức chế” hoặc “phong bế” (ví dụ, chỉ sự ức chế/phong bế sự gắn kết của PVR với TIGIT trên các tế bào) được sử dụng thay thế nhau và bao hàm cả sự ức chế/phong bế một phần và hoàn toàn xuống, ví dụ ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, hoặc 100%.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “ung thư” chỉ một nhóm rộng các bệnh được đặc trưng bởi sự sinh trưởng không kiểm soát được của các tế bào bất thường trong cơ thể. Sự phân chia tế bào không được điều hòa có thể gây ra sự tạo thành các khối u ác tính hoặc các tế bào mà xâm lấn các mô lân cận và có thể gây di căn đến các phần xa của cơ thể thông qua hệ thống mạch bạch huyết hoặc dòng máu.

“Bệnh lý huyết học ác tính” bao gồm u limphô, bệnh bạch cầu, u tủy hoặc khối u limphô ác tính, cũng như ung thư của lá lách và hạch bạch huyết. Các u limphô làm ví dụ bao gồm cả u limphô tế bào B và u limphô tế bào T. U limphô tế bào B bao gồm cả u limphô Hodgkin và hầu hết u limphô không Hodgkin. Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về u limphô tế bào B bao gồm u limphô tế bào B lớn lan tỏa, u limphô dạng nang, u limphô mô mạch bạch huyết liên quan đến niêm mạc, u limphô tế bào limphô nhỏ (chồng chéo với bệnh bạch cầu limphô mạn tính), u limphô tế bào vỏ (MCL), u limphô Burkitt, u limphô tế bào B lớn trung thất, bệnh macroglobulin huyết Waldenström, u limphô tế bào B vùng rìa hạch, u limphô vùng rìa lá lách, u limphô tế bào B lớn trong mạch, u limphô lan tỏa nguyên phát, bệnh u hạt u bạch huyết. Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về u limphô tế bào T bao gồm u limphô tế

bào T ngoài hạch, u limphô tế bào T ở da, u limphô tế bào lớn đặc biệt ác tính, và u limphô tế bào T nguyên bào miễn dịch mạch máu. Bệnh lý huyết học ác tính còn bao gồm bệnh bạch cầu, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh bạch cầu thứ phát, bệnh bạch cầu limphô mạn tính, bệnh bạch cầu tủy cấp tính, bệnh bạch cầu tủy mạn tính, và bệnh bạch cầu nguyên bào limphô cấp. Bệnh lý huyết học ác tính còn bao gồm u tủy, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh đa u tủy và bệnh đa u tủy âm ỉ. Các bệnh ung thư khác liên quan đến huyết học và/hoặc tế bào B hoặc tế bào T được bao gồm trong thuật ngữ bệnh lý huyết học ác tính.

Các thuật ngữ “điều trị,” “việc điều trị,” và “sự điều trị,” được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ loại can thiệp bất kỳ hoặc quá trình được thực hiện trên, hoặc việc dùng hoạt chất cho, đối tượng với mục đích làm đảo ngược, làm thuyên giảm, cải thiện, ức chế, hoặc làm chậm hoặc phòng ngừa sự tiến triển, phát triển, mức độ nghiêm trọng hoặc sự tái phát của triệu chứng, biến chứng, tình trạng hoặc dấu hiệu phân biệt hóa sinh liên quan đến bệnh. Phòng bệnh được sử dụng để chỉ việc dùng cho đối tượng không có bệnh, để phòng ngừa bệnh không xuất hiện hoặc làm giảm tác động của bệnh nếu nó xuất hiện.

Thuật ngữ “liều có hiệu quả” hoặc “liều lượng có hiệu quả” được xác định là lượng đủ để đạt được hoặc ít nhất đạt được một phần tác dụng mong muốn. “Lượng có hiệu quả điều trị bệnh” hoặc “liều có hiệu quả điều trị bệnh” của dược chất hoặc được chất là lượng bất kỳ của dược chất mà, khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với một dược chất khác, thúc đẩy sự thoái triển của bệnh, thể hiện bằng sự giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, tăng tần suất và độ dài của các giai đoạn không có triệu chứng bệnh, hoặc ngăn chặn sự suy yếu hoặc khuyết tật do đau bệnh. “Lượng có hiệu quả phòng bệnh” hoặc “liều có hiệu quả phòng bệnh” của dược chất là lượng dược chất mà, khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với một dược chất khác cho đối tượng có nguy cơ phát triển bệnh hoặc chịu sự tái phát của bệnh, ức chế sự phát triển hoặc sự tái phát của bệnh. Khả năng của dược chất hoặc phòng bệnh để thúc đẩy sự thoái triển bệnh hoặc ức chế sự phát triển hoặc sự tái phát của bệnh có thể được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết đối với bác sỹ điều trị, như ở người trong các thử nghiệm lâm sàng, trong các hệ thống mô hình động vật tiên lượng hiệu quả ở người, hoặc bằng cách thử nghiệm hoạt tính của chất trong các thử nghiệm *in vitro*.

Để làm ví dụ, chất chống ung thư là dược chất mà làm chậm sự tiến triển ung thư hoặc thúc đẩy sự thoái triển ung thư ở đối tượng. Theo các phương án ưu tiên, lượng có

hiệu quả điều trị bệnh của dược chất thúc đẩy sự thoái triển ung thư đến điểm làm mất ung thư. “Thúc đẩy sự thoái triển ung thư” có nghĩa là việc dùng lượng có hiệu quả của dược chất, riêng rẽ hoặc kết hợp với chất chống ung thư, gây ra sự giảm sự sinh trưởng hoặc kích thích khối u, chứng hoại tử của khối u, giảm mức độ nghiêm trọng của ít nhất một triệu chứng bệnh, tăng tần suất và độ dài của các giai đoạn không có triệu chứng bệnh, ngăn ngừa sự suy yếu hoặc khuyết tật do đau bệnh, hoặc nếu không làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh ở đối tượng bị bệnh. Hiệu quả dược lý được sử dụng để chỉ khả năng của dược chất để thúc đẩy sự thoái triển ung thư ở đối tượng bị bệnh. Độ an toàn sinh lý học được sử dụng để chỉ mức độ tính, hoặc các tác dụng sinh lý bất lợi khác ở mức thấp chấp nhận được ở trong tế bào, cơ quan và/hoặc sinh vật (tác dụng bất lợi) gây ra do việc dùng dược chất.

Để làm ví dụ để điều trị khối u, lượng có hiệu quả điều trị bệnh hoặc liều của dược chất tốt hơn là ức chế sự sinh trưởng tế bào hoặc sự sinh trưởng khối u xuống ít nhất khoảng 20%, tốt hơn là xuống ít nhất khoảng 40%, tốt hơn nữa là xuống ít nhất khoảng 60%, và tốt hơn nữa là xuống ít nhất khoảng 80% so với các đối tượng không được điều trị. Trong các phương án được ưu tiên nhất, lượng có hiệu quả điều trị bệnh hoặc liều của dược chất ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng tế bào hoặc sự sinh trưởng khối u, tức là tốt hơn là ức chế sự sinh trưởng tế bào hoặc sự sinh trưởng khối u xuống 100%. Khả năng của hợp chất để ức chế sự sinh trưởng khối u có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm được mô tả *dưới đây*. Sự ức chế sinh trưởng của khối u có thể không ngay lập tức sau khi điều trị, và có thể chỉ xảy ra sau một khoảng thời gian hoặc sau khi dùng lặp lại. Theo cách khác, đặc tính này của chế phẩm có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng của hợp chất để ức chế sự sinh trưởng tế bào, sự ức chế này có thể được đo *in vitro* bằng các thử nghiệm đã biết đối với bác sỹ điều trị. Trong các phương án ưu tiên khác được mô tả trong bản mô tả này, sự thoái triển khối u có thể được quan sát và có thể tiếp tục trong một khoảng thời gian ít nhất khoảng 20 ngày, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 40 ngày, hoặc tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 60 ngày.

Phép trị liệu “kết hợp”, được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi rõ ràng trong ngữ cảnh, dự định bao hàm việc dùng hai hoặc nhiều dược chất theo kiểu phối hợp, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc dùng liều đồng thời. Đặc biệt, phép trị liệu kết hợp bao gồm cả việc dùng phối hợp (ví dụ, việc dùng chế phẩm phối hợp hoặc việc dùng đồng thời các chế phẩm trị liệu riêng rẽ) và việc dùng theo thứ tự hoặc lần lượt, với điều

kiện là việc dùng một dược chất tùy thuộc theo một số cách vào việc dùng dược chất kia. Ví dụ, một dược chất có thể được sử dụng chỉ sau khi dược chất khác đã được sử dụng và cho phép tác động trong một khoảng thời gian quy định. Xem, ví dụ Kohrt *et al.* (2011) *Blood* 117:2423.

Các thuật ngữ “đối tượng bị bệnh” và “đối tượng” chỉ người hoặc động vật không phải là người bất kỳ mà nhận việc điều trị phòng bệnh hoặc trị liệu. Ví dụ, các phương pháp và chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị đối tượng có ung thư. Thuật ngữ “động vật không phải là người” bao gồm tất cả các động vật có xương sống, ví dụ động vật có vú và động vật không có vú, như động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, bò, gà, động vật lưỡng cư, bò sát, v.v..

Các khía cạnh khác nhau được mô tả trong bản mô tả này được mô tả chi tiết hơn trong các phần phụ sau đây.

### I. Kháng thể kháng TIGIT

Sáng chế bộc lộ hoàn toàn các kháng thể kháng huTIGIT của người có các đặc tính đáng mong muốn để sử dụng làm dược chất trong việc điều trị các bệnh như ung thư. Các đặc tính này bao gồm một hoặc nhiều khả năng gắn kết với TIGIT của người với ái lực cao, khả năng gắn kết với TIGIT của khỉ *Cynomolgus*, khả năng phong bế gắn kết PVR (và do đó, truyền tín hiệu), và sự vắng mặt của sự cản trở trình tự mà có thể làm giảm độ ổn định hóa học của kháng thể.

Các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này bởi trình tự gắn kết với các epitop đặc hiệu trên TIGIT của người được xác định như được mô tả trong ví dụ 4 và được thể hiện trên các Fig.2A – 2C. Ba kháng thể đặc hiệu mà các epitop được xác định gắn kết với nó ở các vùng tương tự TIGIT của người nhưng khác trong đó các gốc axit amin cụ thể được tiếp xúc. Các kháng thể có chung các đặc tính gắn kết với TIGIT của người với ái lực cao và có khả năng phong bế gắn kết PVR. Do đó, các kháng thể khác mà gắn kết với các epitop giống hoặc có liên quan gần sẽ có khả năng có chung các đặc tính đáng mong muốn này, và có thể được phát hiện bằng các thử nghiệm cạnh tranh.

Ngoài ra, kháng thể 22G2 gắn kết với TIGIT của khỉ *cynomolgus* với ái lực gần giống như nó gắn kết với TIGIT của người, điều này là thuận tiện khi cần phải tiến hành các nghiên cứu độc tính hỗ trợ việc phê chuẩn quản lý để sử dụng kháng thể làm dược chất cho người. Các kháng thể kháng TIGIT khác mà gắn kết với các epitop giống hoặc

tương tự như 15A6 và 22G2 có khả năng có chung đặc tính gắn kết với cyno TIGIT có lợi này. Các kháng thể gắn kết với các epitop tương tự có thể được phát hiện ra bằng cách thực hiện các thử nghiệm cạnh tranh hoặc bằng cách xác định các epitop của chúng một cách trực tiếp.

Các kháng thể kháng TIGIT cạnh tranh với các kháng thể kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này

Các kháng thể kháng huTIGIT mà cạnh tranh với các kháng thể theo sáng chế để gắn kết với huTIGIT, như 15A6 và 22G2, có thể được sinh ra bằng cách sử dụng các quy trình gây miễn dịch tương tự như các quy trình được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ 1). Các kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết với các kháng thể kháng huTIGIT được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột nhắt có thể bằng TIGIT của người hoặc cấu trúc chứa miền ngoại bào của nó (các gốc 22-141 của SEQ ID NO.1; NP\_776160.2), hoặc bằng cách gây miễn dịch bằng mảnh của TIGIT của người chứa epitop được liên kết bởi các kháng thể kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, 15A6, 22G2 và 11G11). Các kháng thể thu được có thể được sàng lọc đối với khả năng phong bế gắn kết của 15A6 hoặc 22G2 với TIGIT của người bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ phong bế gắn kết với protein dung hợp của miền ngoại bào của TIGIT và miền Fc globulin miễn dịch trong ELISA, hoặc phong bế khả năng gắn kết với các tế bào biểu hiện huTIGIT trên bề mặt của chúng, ví dụ bằng FACS. Theo các phương án khác nhau, kháng thể thử nghiệm được cho tiếp xúc với protein dung hợp TIGIT-Fc (hoặc với các tế bào biểu hiện huTIGIT trên bề mặt của chúng) trước, đồng thời, hoặc sau khi bổ sung 15A6 hoặc 22G2. Ví dụ, các thử nghiệm “phân loại (binning)” có thể được thực hiện (ví dụ 3) để xác định xem kháng thể có cùng “phân loại (bin)” như các kháng thể 15A6 hoặc 22G2 hay không, trong các thử nghiệm đó, các kháng thể 15A6 hoặc 22G2 được gọi là các kháng thể “tham chiếu”, và các kháng thể cần thử nghiệm được gọi là các kháng thể “thử nghiệm”. Các kháng thể mà làm giảm gắn kết của 15A6 và/hoặc 22G2 với TIGIT (dưới dạng thể dung hợp Fc hoặc trên tế bào), đặc biệt là ở các nồng độ gần như tỷ lệ, có khả năng gắn kết ở các epitop giống, chồng chéo, hoặc liền kề, và do đó, có thể có chung các đặc tính chức năng đáng mong muốn của 15A6 và 22G2.

Các kháng thể cạnh tranh cũng có thể được nhận diện bằng các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các thử nghiệm ELISA chuẩn hoặc các thử nghiệm

ELISA cạnh tranh có thể được sử dụng trong đó cấu trúc protein TIGIT của người tái tổ hợp được giữ cố định trên đĩa, các nồng độ khác nhau của kháng thể thử nghiệm không được đánh dấu được bổ sung vào, đĩa này được rửa, kháng thể tham chiếu được đánh dấu được bổ sung vào, được rửa, và lượng chất đánh dấu gắn vào được đo. Nếu nồng độ tăng dần của kháng thể thử nghiệm không được đánh dấu ức chế sự gắn kết của kháng thể tham chiếu được đánh dấu, thì kháng thể thử nghiệm này được cho là ức chế sự gắn kết của kháng thể tham chiếu với đích trên đĩa, hoặc được cho là cạnh tranh với sự gắn kết của kháng thể tham chiếu. Ngoài ra hoặc theo cách khác, phân tích BIACORE® SPR có thể được sử dụng để đánh giá khả năng cạnh tranh của các kháng thể. Khả năng của kháng thể thử nghiệm để ức chế sự gắn kết của kháng thể kháng huTIGIT được mô tả trong bản mô tả này với TIGIT thể hiện rằng kháng thể thử nghiệm có thể cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để gắn kết với TIGIT.

Do đó, được đề xuất trong bản mô tả này là các kháng thể kháng TIGIT mà ức chế gắn kết của các kháng thể kháng huTIGIT được mô tả trong bản mô tả này với TIGIT trên các tế bào, ví dụ các tế bào T hoạt hóa, xuống ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc xuống 100% và/hoặc gắn kết của chúng với TIGIT trên các tế bào, ví dụ các tế bào T hoạt hóa, được ức chế xuống ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc xuống 100% , ví dụ khi được đo bằng ELISA hoặc FACS, như bằng cách sử dụng thử nghiệm được mô tả trong đoạn sau.

Thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ để xác định xem kháng thể thử nghiệm có phong bế gắn kết của (tức là “cạnh tranh với”) kháng thể tham chiếu hay không, có thể được thực hiện như sau: các tế bào T hoạt hóa của người được chuẩn bị như sau: Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC) được phân lập từ máu toàn phần của người bằng cách sử dụng gradien Ficoll và được hoạt hóa bằng 10µg/mL phytohaemagglutinin (PHA-L) (USBiol#P3370-30) và 200IU/mL IL-2 tái tổ hợp (Peprotech#200-02) trong 3 ngày. Các tế bào T hoạt hóa được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS (PBS có 5% huyết thanh thai bò) và được cấy ở  $10^5$  tế bào trên mỗi lỗ mẫu trong đĩa 96 giếng. Kháng thể thử nghiệm không được tiếp hợp được bổ sung vào đĩa ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50µg/mL (hiệu giá gấp ba lần bắt đầu từ nồng độ cao nhất là 50µg/mL). IgG không liên quan có thể được sử dụng làm đối chứng

isotyp đối với kháng thể thử nghiệm và được bổ sung vào ở cùng nồng độ (hiệu giá gấp ba lần bắt đầu từ nồng độ cao nhất là 50 $\mu$ g/mL). Mẫu được ủ trước bằng 50 $\mu$ g/mL kháng thể tham chiếu không được đánh dấu có thể được bao gồm làm đối chứng dương tính để phong bế hoàn toàn (ức chế 100%) và mẫu mà không có kháng thể trong khi ủ ban đầu có thể được sử dụng làm đối chứng âm tính (không cạnh tranh; ức chế 0%). Sau 30 phút ủ, kháng thể tham chiếu được đánh dấu, ví dụ được biotin hóa, được bổ sung vào ở nồng độ 2 $\mu$ g/mL mỗi lỗ mà không cần rửa. Các mẫu được ủ trong 30 phút nữa. Các kháng thể không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa các tế bào này bằng dung dịch đệm FACS. Kháng thể tham chiếu được đánh dấu gắn vào tế bào được phát hiện bằng chất mà phát hiện chất đánh dấu, ví dụ streptavidin được tiếp hợp PE (Invitrogen, catalog#S21388) để phát hiện biotin. Các mẫu được tiếp nhận trên FACS Calibur Flow Cytometer (BD, San Jose) và được phân tích bằng phần mềm Flowjo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Các kết quả có thể được biểu diễn dưới dạng % ức chế (tức là lấy 100% trừ đi lượng chất đánh dấu ở mỗi nồng độ đã chia cho lượng chất đánh dấu thu được mà không có kháng thể phong bế).

Thông thường, sau đó thử nghiệm giống như vậy được thực hiện theo cách đảo ngược, tức là kháng thể thử nghiệm là kháng thể tham chiếu và kháng thể tham chiếu là kháng thể thử nghiệm. Theo các phương án nhất định, kháng thể phong bế ít nhất một phần (ví dụ, ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90%) hoặc hoàn toàn (100%) sự gắn kết của kháng thể khác với đích, ví dụ TIGIT của người hoặc mảnh của nó, và không phụ thuộc vào xem sự ức chế có xảy ra hay không khi một hoặc kháng thể kia là kháng thể thử nghiệm. Kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu “phong bế chéo” sự gắn kết của nhau với đích khi các kháng thể này cạnh tranh với nhau cả hai cách, tức là trong các thử nghiệm cạnh tranh trong đó trước tiên kháng thể thử nghiệm được bổ sung vào và trong các thử nghiệm cạnh tranh trong đó trước tiên kháng thể tham chiếu được bổ sung vào.

Các kháng thể kháng huTIGIT được coi là cạnh tranh với các kháng thể kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này nếu chúng ức chế sự gắn kết của 15A6 và/hoặc 22G2 với TIGIT của người xuống ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc xuống 100% khi có mặt ở các nồng độ gần bằng, ví dụ trong các thử nghiệm cạnh tranh giống như các thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 3. Trừ khi có chỉ dẫn khác, kháng thể sẽ được coi là cạnh tranh với kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm các kháng

thể kháng huTIGIT theo sáng chế nếu nó làm giảm gắn kết của kháng thể được chọn với TIGIT của người xuống ít nhất 20% khi được sử dụng ở nồng độ mol gần như bằng với kháng thể được chọn, khi được đo trong các thử nghiệm ELISA cạnh tranh như được nêu trong hai đoạn nêu trên.

#### Các kháng thể kháng TIGIT gắn kết với cùng epitop

Các kháng thể kháng huTIGIT mà gắn kết với các epitop giống hoặc tương tự với các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sinh ra bằng cách sử dụng các quy trình gây miễn dịch tương tự như quy trình được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ 1). Các kháng thể thu được có thể được sàng lọc đối với gắn kết ái lực cao với TIGIT của người (ví dụ 2). Sau đó, các kháng thể được chọn có thể được nghiên cứu trong thử nghiệm hiển thị trên nấm men trong đó các biến thể trình tự của huTIGIT được trình diện trên bề mặt của các tế bào nấm men (ví dụ 4) để xác định epitop chính xác được gắn bởi kháng thể này.

Việc xác định epitop có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các epitop được bộc lộ trong bản mô tả này được xác định bằng cách hiển thị trên nấm men, như được mô tả trong ví dụ 4 và được thể hiện trên các Fig.2A-2C. Theo các phương án khác nhau, các kháng thể kháng huTIGIT được coi là gắn kết với cùng epitop như mAb kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này, ví dụ 15A6 và/hoặc 22G2, nếu chúng tiếp xúc với một hoặc nhiều gốc giống trong ít nhất một vùng của huTIGIT được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2; nếu chúng tiếp xúc với phần lớn các gốc trong ít nhất một vùng của huTIGIT được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2; nếu chúng tiếp xúc với phần lớn các gốc trong mỗi vùng của huTIGIT được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2; nếu chúng tiếp xúc với phần lớn các tiếp xúc dọc theo toàn bộ chiều dài của huTIGIT được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2; nếu chúng tiếp xúc trong tất cả các vùng riêng biệt của TIGIT của người được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2; nếu chúng tiếp xúc với tất cả các gốc giống ở một vùng bất kỳ trên TIGIT của người được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2; hoặc nếu chúng tiếp xúc với tất cả các gốc ở tất cả các vùng được tiếp xúc bởi 15A6 hoặc 22G2. “Các vùng” epitop là các nhóm gốc dọc theo trình tự cơ sở mà được tiếp xúc bởi các kháng thể 15A6 hoặc 22G2, ví dụ như được nêu trong các SEQ ID NO.38 – 44.

Các kỹ thuật để xác định các kháng thể mà gắn kết với “cùng epitop trên TIGIT” với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này bao gồm phân tích bằng tia x các tinh thể của phức hợp kháng nguyên:kháng thể, mà cung cấp độ phân giải nguyên tử của epitop. Các phương pháp khác giám sát sự gắn kết của kháng thể với các mảnh kháng nguyên hoặc các biến đổi được gây đột biến của kháng nguyên trong đó mất sự gắn kết do cải biến của gốc axit amin trong trình tự của kháng nguyên thường được coi là thông tin biểu thị thành phần epitop. Các phương pháp cũng có thể dựa vào khả năng của kháng thể cần quan tâm để tách bằng ái lực các peptit ngắn cụ thể (ở dạng ba chiều nguyên thể hoặc ở dạng biến tính) từ thư viện peptit hiển thị thể thực khuẩn tổ hợp, hoặc từ quá trình phân giải proteaza của protein đích. Sau đó, các peptit này được coi là dẫn đầu để xác định epitop tương ứng với kháng thể được sử dụng để sàng lọc thư viện peptit. Để lập bản đồ epitop, các thuật toán bằng máy tính cũng đã được phát triển, đã lập bản đồ các epitop không liên tục cấu hình riêng.

Epitop hoặc vùng chứa epitop này cũng có thể được nhận diện bằng cách sàng lọc gắn kết với chuỗi các peptit chồng chéo kéo dài qua TIGIT. Theo cách khác, phương pháp của Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899 có thể được sử dụng để chỉ dẫn việc chọn lọc các kháng thể có cùng epitop và do đó, các đặc tính tương tự với các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này. Bằng cách hiển thị trên thể thực khuẩn, đầu tiên, chuỗi nặng của kháng thể kháng TIGIT được ghép cặp với danh mục các chuỗi nhẹ (tốt hơn là của người) để chọn kháng thể gắn kết TIGIT, và sau đó, chuỗi nhẹ mới được ghép cặp với danh mục các chuỗi nặng (tốt hơn là của người) để chọn kháng thể gắn kết TIGIT (tốt hơn là của người) có epitop hoặc vùng epitop giống như kháng thể kháng huTIGIT được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, các biến thể của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể thu được bằng cách gây đột biến cADN mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể.

Việc gây đột biến quét alanin, như được mô tả bởi Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081, hoặc một số dạng khác của việc gây đột biến điểm các gốc axit amin trong TIGIT (như phương pháp hiển thị trên nấm men được nêu trong ví dụ 4) cũng có thể được sử dụng để xác định epitop chức năng đối với kháng thể kháng TIGIT.

Epitop hoặc vùng epitop (“vùng epitop” là vùng chứa epitop hoặc chồng chéo với epitop) được liên kết bởi kháng thể cụ thể cũng có thể được xác định bằng cách đánh giá gắn kết của kháng thể này với các peptit chứa các mảnh của TIGIT. Một chuỗi các peptit

chồng chéo bao gồm trình tự của TIGIT (ví dụ, TIGIT của người) có thể được tổng hợp và được sàng lọc để gắn kết, ví dụ trong ELISA trực tiếp, ELISA cạnh tranh (trong đó peptit được đánh giá khả năng của nó để ngăn cản gắn kết của kháng thể với TIGIT được gắn vào lỗ của đĩa vi chuẩn), hoặc trên chip. Các phương pháp sàng lọc peptit như vậy có thể không có khả năng phát hiện một số epitop chức năng không liên tục, tức là các epitop chức năng liên quan đến các gốc axit amin không liên kế dọc theo trình tự cơ sở của chuỗi polypeptit TIGIT.

Epitop cũng có thể được nhận diện bằng cách tạo dấu chân protein trên cơ sở MS, như khối phổ trao đổi hydro/đơteri (hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry - HDX-MS) và sự oxy hóa quang hóa nhanh của protein (Fast Photochemical Oxidation of Protein - FPOP). HDX-MS có thể được thực hiện, ví dụ như được mô tả thêm trong Wei *et al.* (2014) *Drug Discovery Today* 19:95, các phương pháp trong đó được kết hợp cụ thể vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. FPOP có thể được thực hiện như được mô tả, ví dụ trong Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, các phương pháp trong đó được kết hợp cụ thể vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Epitop được gắn bởi các kháng thể kháng TIGIT cũng có thể được xác định bằng các phương pháp cấu trúc, như xác định cấu trúc tinh thể bằng tia X (ví dụ, WO2005/044853), mô hình hóa phân tử và quang phổ học cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance - NMR), bao gồm việc xác định NMR của mức độ trao đổi H-D của amit hydro không bền trong TIGIT khi tự do và khi được gắn trong phức hợp với kháng thể cần quan tâm (Zinn-Justin *et al.* (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin *et al.* (1993) *Biochemistry* 32:6884).

Liên quan đến tinh thể học tia X, việc kết tinh có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Giege *et al.* (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1), bao gồm vi mẻ (ví dụ, Chayen (1997) *Structure* 5:1269), khuếch tán hơi nước giọt treo (ví dụ, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300), tạo mầm và thẩm tách. Mong muốn sử dụng chế phẩm protein có nồng độ ít nhất khoảng 1mg/mL và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10mg/mL đến 20mg/mL. Việc kết tinh có thể đạt được tốt nhất trong dung dịch chất làm kết tủa chứa polyetylen glycol 1000-20.000 (PEG; khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 20.000 Da), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5000 đến 7000 Da, tốt hơn nữa là khoảng 6000 Da, với nồng độ nằm trong

khoảng từ 10% đến 30% (khối lượng/thể tích - w/v). Cũng có thể đáng mong muốn khi bao gồm chất làm ổn định protein, ví dụ glyxerol ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5% đến 20%. Muối thích hợp, như natri clorua, lithi clorua hoặc natri xitrat cũng có thể đáng mong muốn trong dung dịch chất làm kết tủa, tốt hơn là với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 1000 mM. Chất làm kết tủa tốt hơn là được đệm đến độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0, tốt hơn là khoảng 4,0. Các dung dịch đệm cụ thể hữu ích trong dung dịch chất làm kết tủa có thể thay đổi và đã biết trong lĩnh vực này (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Các ví dụ về các dung dịch đệm hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, HEPES, Tris, MES và axetat. Các tinh thể có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ rộng, bao gồm 2°C, 4°C, 8°C và 26°C.

Các tinh thể kháng thể:kháng nguyên có thể được nghiên cứu bằng cách sử dụng các kỹ thuật nhiễu xạ tia X đã biết và có thể được tinh chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm máy tính như X-PLOR (Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.; xem ví dụ, Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff *et al.*, eds., Academic Press; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0014194), và BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi *et al.* (2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323), nội dung của chúng được kết hợp toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Các kháng thể kháng TIGIT gắn kết với ái lực cao

Theo một số phương án, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế gắn kết với huTIGIT với ái lực cao, như các kháng thể kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này, làm tăng khả năng của chúng làm các dược chất có hiệu quả. Theo các phương án khác nhau, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế gắn kết với huTIGIT với  $K_D$  nhỏ hơn 10nM, 5nM, 2nM, 1nM, 300pM, 100pM hoặc 60 pM. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế gắn kết với huTIGIT với  $K_D$  nằm trong khoảng từ 2nM đến 60pM. Các thử nghiệm chuẩn để đánh giá khả năng gắn kết của các kháng thể với huTIGIT bao gồm ELISA, RIA, thẩm tách Tây, đo giao thoa lớp sinh học (biolayer interferometry - BLI) và phân tích BIACORE® SPR (xem ví dụ 2).

### Các biến thể trình tự của kháng thể kháng TIGIT

Một số biến đổi trong trình tự kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được cho phép và vẫn duy trì được các đặc tính đáng mong muốn của kháng thể. Các vùng CDR được chỉ ra bằng hệ thống Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Do đó, sáng chế còn đề xuất các kháng thể kháng huTIGIT chứa các trình tự CDR mà có độ đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với các trình tự CDR của các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, 15A6, 22G2 và 11G11). Sáng chế còn đề xuất các kháng thể kháng huTIGIT chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ mà có độ đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, 15A6, 22G2 và 11G11).

### Các kháng thể kháng TIGIT có nguồn gốc từ cùng dòng mầm

Do tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên được xác định chủ yếu bằng các CDR, các kháng thể có chung các trình tự CDR với các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, 15A6, 22G2 và 11G11) có khả năng có chung các đặc tính đáng mong muốn của chúng. Ngoài ra, các kháng thể được chọn được bộc lộ trong bản mô tả này (15A6, 22G2 và 11G11) gắn kết với các vùng tương tự dọc theo trình tự cơ sở của huTIGIT, và một số chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ cùng trình tự dòng mầm. Do đó, các kháng thể kết hợp (“trộn và làm tương hợp”) các vùng CDR từ các kháng thể với 15A6, 22G2 và 11G11 cũng có thể được kỳ vọng là gắn kết với huTIGIT và giữ được các đặc tính đáng mong muốn của chúng. Các kháng thể “được trộn và được làm tương hợp” có ái lực gắn kết, hoạt tính sinh học và/hoặc các đặc tính khác đương lượng hoặc nổi trội hơn so với các kháng thể cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được chọn để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng có nguồn gốc từ gen globulin miễn dịch của chuỗi nặng dòng mầm cụ thể của người và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ từ gen globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ dòng mầm cụ thể của người. Kháng thể 15A6 có chuỗi nặng có nguồn gốc từ các dòng mầm của người V4-39, D6-19 và JH4b, và các dòng mầm của chuỗi nhẹ

VA27 và JK2. Kháng thể 22G2 có chuỗi nặng có nguồn gốc từ các dòng mầm của người V4-61, D3-10 và JH6b, và các dòng mầm của chuỗi nhẹ VL6 và JK3. Kháng thể 11G11 có chuỗi nặng có nguồn gốc từ các dòng mầm của người V4-39, D3-10 và JH4b, và các dòng mầm của chuỗi nhẹ VL6 và JK2. Kháng thể 10D7 có chuỗi nặng có nguồn gốc từ các dòng mầm của người V1-69, D6-13 và JH6b, và các dòng mầm của chuỗi nhẹ VL15 và JK5. Các kháng thể khác mà gắn kết với TIGIT của người và có nguồn gốc từ một số hoặc tất cả các trình tự dòng mầm này là có khả năng có liên quan gần về trình tự, đặc biệt là các kháng thể có nguồn gốc từ cùng các gen vùng V, và do đó, được mong đợi là có chung các đặc tính đáng mong muốn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể của người chứa các vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ mà “có nguồn gốc từ” trình tự dòng mầm cụ thể nếu các vùng biến đổi của kháng thể này thu được từ hệ mà sử dụng các gen globulin miễn dịch dòng mầm của người, và trình tự kháng thể này có liên quan đầy đủ đến dòng mầm mà nó có khả năng có nguồn gốc từ dòng mầm đã định đó chứ không phải từ dòng mầm khác bất kỳ. Các hệ này bao gồm gây miễn dịch chuột nhắt chuyển gen mang các gen globulin miễn dịch của người bằng kháng nguyên cần quan tâm hoặc sàng lọc thư viện gen globulin miễn dịch của người được hiển thị trên thể thực khuẩn bằng kháng nguyên cần quan tâm. (Các) trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người mà trình tự của kháng thể “có nguồn gốc từ đó” có thể được nhận diện bằng cách so sánh trình tự axit amin của kháng thể của người với các trình tự axit amin của globulin miễn dịch dòng mầm của người và lựa chọn trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người mà gần nhất về trình tự (tức là % độ đồng nhất lớn nhất) với trình tự của kháng thể của người. Kháng thể của người mà “có nguồn gốc từ” trình tự globulin miễn dịch dòng mầm cụ thể của người có thể chứa các khác biệt axit amin so với trình tự dòng mầm do, ví dụ các đột biến sinh dưỡng có trong tự nhiên hoặc việc đưa đột biến định hướng vị trí định trước. Tuy nhiên, kháng thể của người được chọn thường có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất 90% so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, vùng V) và chứa các gốc axit amin mà nhận diện kháng thể của người là người khi so sánh với các trình tự axit amin globulin miễn dịch dòng mầm của loài khác (ví dụ, trình tự dòng mầm của chuột). Trong một số trường hợp, kháng thể của người có thể có độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 95%, hoặc thậm chí ít nhất là 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn

dịch dòng mầm (ví dụ, vùng V). Thông thường, kháng thể của người có nguồn gốc từ trình tự dòng mầm cụ thể của người sẽ biểu hiện sự khác biệt axit amin không quá 10 so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, vùng V). Trong một số trường hợp, kháng thể của người có thể biểu hiện sự khác biệt axit amin không quá 5, hoặc thậm chí không quá 4, 3, 2, hoặc 1 so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm (ví dụ, V các vùng).

## II. Các kháng thể được xử lý kỹ thuật và được cải biến

### Các vùng V<sub>H</sub> và V<sub>L</sub>

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể được xử lý kỹ thuật và được cải biến mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kháng thể có một hoặc nhiều trình tự V<sub>H</sub> và/hoặc V<sub>L</sub> được bộc lộ trong bản mô tả này làm nguyên liệu ban đầu để xử lý kỹ thuật kháng thể cải biến, kháng thể cải biến này có thể có các đặc tính biến đổi so với kháng thể ban đầu. Kháng thể có thể được xử lý kỹ thuật bằng cách biến đổi một hoặc nhiều gốc trong một hoặc cả hai vùng biến đổi (tức là V<sub>H</sub> và/hoặc V<sub>L</sub>), ví dụ trong một hoặc nhiều vùng CDR và/hoặc trong một hoặc nhiều vùng khung. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể có thể được xử lý kỹ thuật bằng cách cải biến các gốc trong (các) vùng hằng định, ví dụ để thay đổi (các) chức năng hiệu ứng của kháng thể này.

Một loại xử lý kỹ thuật vùng biến đổi mà có thể được thực hiện là ghép CDR. Việc ghép này được sử dụng cụ thể trong việc làm giống như của người đối với các kháng thể kháng TIGIT không phải của người mà cạnh tranh để gắn kết với các kháng thể kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này và/hoặc gắn kết với cùng epitop như các kháng thể kháng huTIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này. Các kháng thể tương tác với các kháng nguyên đích chủ yếu là qua các gốc axit amin nằm trong sáu vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vì lý do này, các trình tự axit amin trong CDR đa dạng hơn các trình tự bên ngoài CDR trong từng kháng thể. Do các trình tự CDR chịu trách nhiệm về hầu hết các tương tác kháng thể-kháng nguyên, nên có thể biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp bất chước các đặc tính của các kháng thể tham chiếu cụ thể bằng cách tạo cấu trúc các vector biểu hiện mà chứa trình tự CDR từ kháng thể tham chiếu cụ thể được ghép vào trình tự khung từ kháng thể khác có các đặc tính khác (xem, ví dụ Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl.*

*Acad. Xem U.S.A.* 86:10029-10033; Patent Mỹ số 5,225,539 của Winter, và patent Mỹ các số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của Queen *et al*)

Các trình tự khung này có thể thu được từ các cơ sở dữ liệu ADN công cộng hoặc các tài liệu được công bố bao gồm các trình tự gen của kháng thể dòng mầm. Ví dụ, trình tự ADN dòng mầm của các gen của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người “VBase”, cũng như trong Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) “The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops” *J. Mol. Biol.* 227:776-798; và Cox, J. P. L. *et al.* (1994) “A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp rõ ràng vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Các trình tự khung được ưu tiên để sử dụng trong các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là các trình tự mà tương tự về mặt cấu trúc với các trình tự khung được sử dụng bởi các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Các trình tự V<sub>H</sub> CDR1, 2 và 3, và các trình tự V<sub>L</sub> CDR1, 2 và 3, có thể được ghép trên các vùng khung mà có trình tự giống như trình tự được tìm thấy trong gen globulin miễn dịch dòng mầm mà trình tự khung có nguồn gốc từ đó, hoặc các trình tự CDR có thể được ghép trên các vùng khung mà chứa các thay thế axit amin lên đến 20, tốt hơn là bảo toàn, so với các trình tự dòng mầm. Ví dụ, đã phát hiện ra rằng trong một số trường hợp, sẽ có lợi nếu gây đột biến các gốc trong vùng khung để duy trì hoặc tăng cường khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể này (*xem ví dụ*, patent Mỹ các số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của Queen *et al*).

Các kháng thể được xử lý kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể trong đó các cải biến được thực hiện đối với các gốc khung trong V<sub>H</sub> và/hoặc V<sub>L</sub>, ví dụ để cải thiện các đặc tính của kháng thể. Thông thường, các cải biến ở khung như vậy được thực hiện để làm giảm khả năng sinh miễn dịch của kháng thể. Ví dụ, một phương pháp là “gây đột biến ngược” một hoặc nhiều gốc khung vào trình tự dòng mầm tương ứng. Cụ thể hơn, kháng thể mà đã trải qua sự đột biến sinh dưỡng có thể chứa các gốc khung khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Các gốc này có thể được nhận diện bằng cách so sánh trình tự khung của kháng thể với trình tự dòng

mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Để đưa các trình tự vùng khung trở lại cấu hình dòng mầm của chúng, các đột biến sinh dưỡng có thể “được gây đột biến ngược” vào trình tự dòng mầm bằng cách, ví dụ gây đột biến định hướng vị trí hoặc gây đột biến gián tiếp qua PCR. Các kháng thể “được gây đột biến ngược” này cũng dự định được bao gồm.

Một loại cải biến khung khác bao gồm gây đột biến một hoặc nhiều gốc trong vùng khung, hoặc thậm chí trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ các epitop tế bào T từ đó làm giảm khả năng sinh miễn dịch tiềm tàng của kháng thể này. Phương pháp này còn được gọi là “khử miễn dịch” (deimmunization) và được mô tả chi tiết hơn trong công bố patent Mỹ số 20030153043 của Carr *et al.*

Một loại cải biến vùng biến đổi khác là gây đột biến các gốc axit amin trong vùng CDR để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính gắn kết (ví dụ, ái lực) của kháng thể cần quan tâm. Việc gây đột biến định hướng vị trí hoặc gây đột biến gián tiếp qua PCR có thể được thực hiện để đưa (các) đột biến vào và tác dụng lên việc gắn kết kháng thể, hoặc đặc tính chức năng cần quan tâm khác. Tốt hơn là các cải biến bảo toàn được đưa vào. Các đột biến này có thể là thêm đoạn, làm mất đoạn, hoặc tốt hơn là thay thế axit amin. Ngoài ra, thông thường không quá một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc trong vùng CDR được thay đổi.

Các gốc metionin trong các CDR của kháng thể có thể được oxy hóa, dẫn đến sự phân hủy hóa học tiềm tàng và tiếp theo là giảm hiệu lực của kháng thể. Do đó, cũng được đề xuất là các kháng thể kháng TIGIT mà có một hoặc nhiều gốc metionin trong các CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được thay thế bằng các gốc axit amin mà không bị phân hủy oxy hóa.

Tương tự, các vị trí khử amit có thể được loại bỏ khỏi các kháng thể kháng TIGIT, đặc biệt là trong các CDR.

Các vị trí glycosyl hóa tiềm năng trong miền gắn kết kháng nguyên tốt hơn là được làm mất để ngăn ngừa sự glycosyl hóa mà có thể cản trở việc gắn kết kháng nguyên. Xem, ví dụ patent Mỹ số 5,714,350.

#### Gắn kết kháng nguyên đích

Theo các phương án khác nhau, kháng thể theo sáng chế được cải biến để phong bế chọn lọc việc gắn kết kháng nguyên trong các mô và các môi trường trong đó việc gắn

kết kháng nguyên sẽ tạo bất lợi, nhưng cho phép gắn kết kháng nguyên khi nó có lợi. Theo một phương án, “mặt nạ” peptit phong bế được tạo ra mà gắn kết đặc hiệu với bề mặt gắn kết kháng nguyên của kháng thể và cản trở việc gắn kết kháng nguyên, mặt nạ này được liên kết với mỗi nhánh gắn kết của kháng thể bằng cầu nối peptidaza dễ phân cắt. Xem, ví dụ patent Mỹ số 8,518,404 của CytomX. Các cấu trúc này là hữu ích để điều trị các ung thư trong đó hàm lượng proteaza được tăng mạnh trong vi môi trường khối u so với các mô không phải khối u. Việc phân cắt chọn lọc của cầu nối dễ phân cắt trong vi môi trường khối u cho phép sự phân ly của peptit che giấu/phong bế, làm cho kháng nguyên gắn kết chọn lọc trong khối u, chứ không phải trong các mô ngoại biên trong đó việc gắn kết kháng nguyên có thể tạo ra các tác dụng phụ không mong muốn.

Theo cách khác, trong phương án liên quan, hợp chất gắn kết có hóa trị hai (“phối tử che giấu”) chứa hai miền gắn kết kháng nguyên được phát triển mà gắn kết với cả hai bề mặt gắn kết kháng nguyên của kháng thể (có hóa trị hai) này và cản trở việc gắn kết kháng nguyên, trong đó mặt nạ của hai miền gắn kết được liên kết với nhau (nhưng không với kháng thể) bằng cầu nối dễ phân cắt, ví dụ dễ phân cắt bởi peptidaza. Xem, ví dụ công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2010/077643 của Tegopharm Corp. Các phối tử che giấu có thể chứa, hoặc có nguồn gốc từ, kháng nguyên mà kháng thể này được dự định gắn vào, hoặc có thể được tạo ra một cách độc lập. Các phối tử che giấu này là hữu ích để điều trị các ung thư trong đó hàm lượng proteaza được tăng mạnh trong vi môi trường khối u so với các mô không phải khối u. Việc phân cắt chọn lọc của cầu nối dễ phân cắt trong vi môi trường khối u cho phép sự phân ly của hai miền gắn kết khỏi nhau, làm giảm khả lực đối với các bề mặt gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Sự phân ly thu được của phối tử che giấu khỏi kháng thể cho phép việc gắn kết kháng nguyên chọn lọc trong khối u, chứ không phải trong các mô ngoại biên trong đó việc gắn kết kháng nguyên có thể tạo ra các tác dụng phụ không mong muốn.

#### Fc và Fc cải biến

Ngoài hoạt tính của kháng thể trị liệu tạo ra từ việc gắn kết của miền gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên (ví dụ, phong bế của phối tử tương tự hoặc protein thụ thể trong trường hợp kháng thể đối kháng, hoặc truyền tín hiệu giảm trong trường hợp kháng thể chủ vận), phần Fc của kháng thể tương tác với hệ miễn dịch nói chung theo các cách phức tạp để gây ra một số bất kỳ các tác dụng sinh học. Chức năng hiệu ứng, như vùng Fc của globulin miễn dịch chịu trách nhiệm đối với nhiều chức năng kháng thể quan

trọng, như tính độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên (antigen-dependent cellular cytotoxicity - ADCC), tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), và sự thực bào gián tiếp qua tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP), dẫn đến tiêu diệt các tế bào đích, mặc dù bằng các cơ chế khác nhau. Có năm nhóm, hoặc các isotyp, chủ yếu của vùng hằng định của chuỗi nặng (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM), mỗi nhóm có chức năng hiệu ứng đặc trưng. Các isotyp này có thể được chia nhỏ hơn thành các phân nhóm, ví dụ IgG được tách thành bốn phân nhóm được gọi là IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Các phân tử IgG tương tác với ba nhóm của thụ thể Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) đặc hiệu đối với nhóm IgG của kháng thể, cụ thể là Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, và Fc $\gamma$ RIII. Các trình tự quan trọng đối với việc gắn kết của IgG với các thụ thể Fc $\gamma$ R đã được báo cáo là nằm trong các miền CH2 và CH3. Thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể bị ảnh hưởng bởi khả năng của kháng thể đó gắn kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn).

Các kháng thể theo sáng chế có thể chứa các miền biến đổi theo sáng chế được kết hợp với các miền ổn định chứa các vùng Fc khác nhau, được chọn trên cơ sở hoạt tính sinh học (nếu có) của kháng thể đối với mục đích sử dụng được dự định. Salfeld (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1369. Các IgG của người, ví dụ có thể được phân loại thành bốn phân nhóm, IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, và mỗi phân nhóm của các phân nhóm này chứa vùng Fc có kiểu duy nhất để gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc $\gamma$  (các thụ thể hoạt hóa Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIC (CD32); Fc $\gamma$ RIIIA và Fc $\gamma$ RIIIB (CD16) và thụ thể ức chế Fc $\gamma$ RIIIB), và đối với thành phần thứ nhất của bổ thể (C1q). IgG1 và IgG3 của người gắn kết với tất cả các thụ thể Fc $\gamma$ ; IgG2 gắn kết với Fc $\gamma$ RIIA<sub>H131</sub>, và với ái lực thấp hơn với Fc $\gamma$ RIIA<sub>R131</sub> Fc $\gamma$ RIIIA<sub>V158</sub>; IgG4 gắn kết với Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, và Fc $\gamma$ RIIIA<sub>V158</sub>; và thụ thể ức chế Fc $\gamma$ RIIIB có ái lực thấp hơn đối với IgG1, IgG2 và IgG3 so với tất cả các thụ thể Fc $\gamma$  khác. Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113:3716. Các nghiên cứu đã thể hiện rằng Fc $\gamma$ RI không gắn kết với IgG2, và Fc $\gamma$ RIIIB không gắn kết với IgG2 hoặc IgG4. *Id.* Nói chung, về hoạt tính ADCC, IgG1  $\geq$  IgG3  $\gg$  IgG4  $\geq$  IgG2 của người. Kết quả là, ví dụ miền ổn định IgG1, không phải là IgG2 hoặc IgG4, có thể được chọn để sử dụng trong thuốc trong đó ADCC là mong muốn; IgG3 có thể được chọn nếu sự hoạt hóa của tế bào NK biểu hiện Fc $\gamma$ RIIIA, bạch cầu đơn nhân của đại thực bào; và IgG4 có thể được chọn nếu kháng thể được sử dụng để làm bớt nhạy cho các đối tượng bị bệnh dị

ứng. IgG4 cũng có thể được chọn nếu mong muốn rằng kháng thể này thiếu tất cả chức năng hiệu ứng.

Các vùng biến đổi kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được liên kết (ví dụ, được liên kết cộng hóa trị hoặc được dung hợp) với Fc, ví dụ Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, mà có thể là alotyp hoặc isoalotyp bất kỳ, ví dụ đối với IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); đối với IgG2: G2m, G2m23(n); đối với IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). Xem, ví dụ Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1). Sự chọn lọc alotyp có thể bị ảnh hưởng bởi khả năng sinh miễn dịch tiềm tàng liên quan đến, ví dụ việc làm giảm đến mức tối thiểu sự tạo thành các kháng thể kháng thuốc.

Theo các phương án nhất định, các vùng biến đổi kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này được liên kết với Fc mà gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc hoạt hóa (FcγRI/CD64, FcγRIIa/CD32 hoặc FcγRIIIa/CD16), và nhờ đó kích thích ADCC và có thể gây ra việc làm suy kiệt tế bào T. Theo các phương án nhất định, các vùng biến đổi kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này được liên kết với Fc IgG1 hoặc IgG3 của người, tức là các kháng thể này thuộc isotyp IgG1 hoặc IgG3. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT là các kháng thể làm suy kiệt, đặc biệt là, chúng làm suy kiệt các tế bào  $T_{reg}$ , nhưng không phải các tế bào  $T_{eff}$ , trong vi môi trường khối u (và nhờ đó tăng cường hoạt tính kháng khối u), nhưng không làm suy kiệt đáng kể các tế bào  $T_{reg}$  và  $T_{eff}$  bên ngoài vi môi trường khối u, ví dụ ở ngoại biên. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT là thuộc isotyp, có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên (ví dụ, bao gồm (các) đột biến) mà kích thích sự làm suy kiệt hoặc tiêu diệt tế bào  $T_{reg}$  tại vị trí khối u và sự hoạt hóa đi kèm của các tế bào  $T_{eff}$ . Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT tạo ra tỷ lệ  $T_{eff}$  và  $T_{reg}$  tăng tại vị trí khối u, điều này biểu thị hoạt tính kháng khối u có hiệu lực, tốt hơn là không làm suy kiệt đáng kể các tế bào  $T_{reg}$  và  $T_{eff}$  mà ở bên ngoài vi môi trường khối u, ví dụ ở ngoại biên.

Theo các phương án khác, các kháng thể kháng TIGIT phong bế hoạt tính ức chế miễn dịch của  $T_{regs}$ . Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT có Fc có gắn kết FcR được giảm hoặc loại bỏ, ví dụ gắn kết với FcR hoạt hóa giảm.

Các vùng biến đổi kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được liên kết với vùng Fc không có trong tự nhiên, ví dụ Fc không hiệu ứng hoặc hầu như không hiệu ứng (ví dụ, IgG2 hoặc IgG4 của người) hoặc, theo cách khác, Fc có gắn kết tăng với một hoặc nhiều thụ thể Fc hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa hoặc FcγRIIIa), như để tăng cường sự làm suy kiệt T<sub>reg</sub> trong môi trường khối u.

Các vùng biến đổi được mô tả trong bản mô tả này có thể được liên kết với Fc chứa một hoặc nhiều cải biến, thường là để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể, như thời gian bán thải trong huyết thanh, cố định bổ thể, gắn kết thụ thể Fc, và/hoặc tính độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Hơn thế nữa, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được biến đổi hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc nó có thể được cải biến để thay đổi sự glycosyl hóa của nó, để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể này. Mỗi trong số các phương án này được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Việc đánh số các gốc trong vùng Fc là đánh số theo chỉ số EU của Kabat. Các biến thể trình tự được bộc lộ trong bản mô tả này được đưa ra dựa vào số gốc tiếp theo axit amin mà được thay thế thay cho axit amin có trong tự nhiên, tùy ý được đứng trước bởi gốc có trong tự nhiên ở vị trí đó. Khi nhiều axit amin có thể có mặt ở vị trí đã định, ví dụ nếu các trình tự khác nhau giữa các isotyp có trong tự nhiên, hoặc nếu nhiều đột biến có thể được thay thế ở vị trí này, thì chúng được tách ra bằng dấu gạch chéo (ví dụ, "X/Y/Z").

Ví dụ, có thể tiến hành các cải biến trong vùng Fc để tạo ra biến thể Fc có (a) tính độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) tăng hoặc giảm, (b) tính độc tế bào gián tiếp qua bổ thể (complement mediated cytotoxicity - CDC) tăng hoặc giảm, (c) ái lực đối với C1q tăng hoặc giảm và/hoặc (d) ái lực đối với thụ thể Fc tăng hoặc giảm so với Fc bố mẹ. Các biến thể vùng Fc này nói chung sẽ chứa ít nhất một cải biến axit amin trong vùng Fc. Việc kết hợp các cải biến axit amin được cho là đặc biệt đáng mong muốn. Ví dụ, vùng Fc biến thể có thể bao gồm hai, ba, bốn, năm, v.v. thay thế trong đó, ví dụ của các vị trí vùng Fc đặc hiệu được nhận diện trong bản mô tả này. Các biến thể trình tự Fc làm ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này, và còn được đề xuất trong patent Mỹ các số 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; 6,194,551; 7,317,091; 8,101,720; công bố đơn PCT các số WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 và WO 06/020114.

### Làm giảm chức năng hiệu ứng

Hoạt tính ADCC có thể được làm giảm bằng cách cải biến vùng Fc. Theo các phương án nhất định, các vị trí mà ảnh hưởng đến việc gắn kết với các thụ thể Fc có thể được loại bỏ, tốt hơn là các vị trí không phải là các vị trí gắn kết thụ thể cứu. Theo các phương án khác, vùng Fc có thể được cải biến để loại bỏ vị trí ADCC. Các vị trí ADCC là đã biết trong lĩnh vực này; xem, ví dụ Sarmay *et al.* (1992) *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 về các vị trí ADCC trong IgG1. Theo một phương án, biến thể G236R và L328R của IgG1 của người làm mất một cách có hiệu quả gắn kết FcγR. Horton *et al.* (2011) *J. Immunol.* 186:4223 và Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. Theo các phương án khác, Fc có gắn kết giảm với FcγR chứa các thay thế axit amin L234A, L235E và G237A. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289.

Hoạt tính CDC cũng có thể được làm giảm bằng cách cải biến vùng Fc. Các đột biến ở các vị trí IgG1 D270, K322, P329 và P331, đặc biệt, các đột biến alanin D270A, K322A, P329A và P331A, làm giảm đáng kể khả năng của kháng thể tương ứng để gắn kết C1q và hoạt hóa bổ thể. Idusogie *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4178; WO 99/51642. Cải biến của vị trí 331 của IgG1 (ví dụ, P331S) đã được thể hiện là làm giảm gắn kết bổ thể. Tao *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:661 và Canfield & Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483. Theo một ví dụ khác, một hoặc nhiều gốc axit amin trong các vị trí axit amin 231 đến 239 được thay đổi để từ đó làm giảm khả năng cố định bổ thể của kháng thể. WO 94/29351.

Theo một số phương án, Fc có sự cố định bổ thể giảm có các thay thế axit amin A330S và P331S. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289.

Đối với việc sử dụng trong đó chức năng hiệu ứng được tránh hoàn toàn, ví dụ khi việc gắn kết kháng nguyên riêng rẽ là đủ để tạo ra lợi ích trị liệu mong muốn, và chức năng hiệu ứng chỉ dẫn đến (hoặc làm tăng nguy cơ của) các tác dụng phụ không mong muốn, các kháng thể IgG4 có thể được sử dụng, hoặc các kháng thể hoặc các mảnh không có vùng Fc hoặc phần cơ bản của nó có thể được tạo ra, hoặc Fc có thể được gây đột biến để làm mất sự glycosyl hóa hoàn toàn (ví dụ, N297A). Theo cách khác, cấu trúc lai của IgG2 của người (miền C<sub>H1</sub> và vùng bản lề) và IgG4 của người (các miền C<sub>H2</sub> và C<sub>H3</sub>) đã được tạo ra mà không có chức năng hiệu ứng, không có khả năng gắn kết FcγR (như IgG2) và không thể hoạt hóa bổ thể (như IgG4). Rother *et al.* (2007) *Nat.*

*Biotechnol.* 25:1256. Cũng xem Mueller *et al.* (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479 (bàn luận các cải biến Fc để làm giảm chức năng hiệu ứng nói chung).

Theo các phương án khác, vùng Fc được thay đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để làm giảm tất cả (các) chức năng hiệu ứng của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 và 322 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể này có ái lực giảm đối với phối tử hiệu ứng nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể bố mẹ. Phối tử hiệu ứng mà ái lực với nó được biến đổi có thể là, ví dụ thụ thể Fc (các gốc 234, 235, 236, 237, 297) hoặc thành phần C1 của bổ thể (các gốc 297, 318, 320, 322). Patent Mỹ các số 5,624,821 và 5,648,260, cả hai đều của Winter *et al.*

Một đơn sáng chế sớm đã đề xuất các cải biến trong vùng Fc IgG để làm giảm gắn kết với FcγRI để làm giảm ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) hoặc phong bế gắn kết với thành phần C1q của bổ thể để làm mất CDC (E318A hoặc V/K320A và K322A/Q). WO 88/007089. Cũng xem Duncan & Winter (1988) *Nature* 332:563; Chappel *et al.* (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 88:9036; và Sonderrmann *et al.* (2000) *Nature* 406:267 (bàn luận các tác dụng của các đột biến này lên việc gắn kết FcγRIII).

Các cải biến Fc làm giảm chức năng hiệu ứng cũng bao gồm các thay thế, xen đoạn, và mất đoạn ở các vị trí 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, và 328, như 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L, và 328R. Biến thể Fc có thể bao gồm 236R/328R. Các cải biến khác để làm giảm FcγR và các tương tác bổ thể bao gồm các thay thế 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P, và 234V. Các cải biến này và các cải biến khác được xem xét trong Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Các chức năng hiệu ứng (cả ADCC và sự hoạt hóa bổ thể) có thể được làm giảm, đồng thời duy trì được sự gắn kết FcR sơ sinh (duy trì thời gian bán thải), bằng cách gây đột biến các gốc IgG ở một hoặc nhiều vị trí 233 – 236 và 327 – 331, như E233P, L234V, L235A, tùy ý G236Δ, A327G, A330S và P331S trong IgG1; E233P, F234V, L235A, tùy ý G236Δ trong IgG4; và A330S và P331S trong IgG2. Xem Armour *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613; WO 99/58572. Các đột biến khác mà làm giảm chức năng hiệu ứng bao gồm L234A và L235A trong IgG1 (Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537); V234A và G237A

trong IgG2 (Cole *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:3613; cũng xem patent Mỹ số 5,834,597); và S228P và L235E đối với IgG4 (Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925). Một kết hợp khác của các đột biến để làm giảm chức năng hiệu ứng trong IgG1 của người bao gồm L234F, L235E và P331S. Oganessian *et al.* (2008) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64:700. Nói chung xem Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479. Các đột biến bổ sung được tìm ra là làm giảm chức năng hiệu ứng trong trường hợp protein dung hợp Fc (IgG1) (abatacept) là C226S, C229S và P238S (đánh số gốc theo EU). Davis *et al.* (2007) *J. Immunol.* 34:2204.

Các biến thể Fc khác có ADCC và/hoặc CDC giảm được bộc lộ trong Glaesner *et al.* (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (F234A và L235A để làm giảm ADCC và ADCP trong IgG4); Hutchins *et al.* (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 92:11980 (F234A, G237A và E318A trong IgG4); An *et al.* (2009) *MAbs* 1:572 và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S và P331S trong IgG2); McEarchern *et al.* (2007) *Blood* 109:1185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A trong IgG1); Vafa *et al.* (2014) *Methods* 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S trong IgG2).

Theo các phương án nhất định, Fc được chọn sao cho về cơ bản không có chức năng hiệu ứng, tức là nó có gắn kết với FcγR giảm và sự cố định bổ thể giảm. Fc làm ví dụ, ví dụ IgG1 Fc, mà không hiệu ứng bao gồm năm đột biến sau: L234A, L235E, G237A, A330S và P331S. Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289. Năm thay thế này có thể được kết hợp với N297A để còn làm mất sự glycosyl hóa.

#### Tăng cường chức năng hiệu ứng

Theo cách khác, hoạt tính ADCC có thể được làm tăng bằng cách cải biến vùng Fc. Về hoạt tính ADCC,  $\text{IgG1} \geq \text{IgG3} \gg \text{IgG4} \geq \text{IgG2}$  của người, vì vậy miễn ổn định IgG1, chứ không phải là IgG2 hoặc IgG4, có thể được chọn để sử dụng trong thuốc khi ADCC là mong muốn. Theo cách khác, vùng Fc có thể được cải biến để làm tăng tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc để làm tăng ái lực đối với thụ thể Fcγ bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí sau: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331,

332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 hoặc 439. Xem WO 2012/142515; cũng xem WO 00/42072. Các thay thế làm ví dụ bao gồm 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D, và 332E. Các biến thể làm ví dụ bao gồm 239D-332E, 236A-332E, 236A-239D-332E, 268F-324T, 267E-268F, 267E-324T, và 267E-268F-324T. Ví dụ, các Fc IgG1 của người bao gồm biến thể G236A, mà có thể tùy ý được kết hợp với I332E, đã được thể hiện là làm tăng tỷ lệ ái lực gắn kết FcγRIIA / FcγRIIB xấp xỉ 15 lần. Richards *et al.* (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Các cải biến khác để tăng cường FcγR và các tương tác bổ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thay thế 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I, và 396L. Các cải biến này và các cải biến khác được xem xét trong Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Đặc biệt, cả ADCC và CDC có thể được tăng cường bằng các thay đổi ở vị trí E333 của IgG1, ví dụ E333A. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. Việc sử dụng các đột biến P247I và A339D/Q để tăng cường chức năng hiệu ứng trong IgG1 được bộc lộ trong WO 2006/020114, và D280H, K290S ± S298D/V được bộc lộ trong WO 2004/074455. Các biến thể K326A/W và E333A/S đã được thể hiện là làm tăng chức năng hiệu ứng trong IgG1 của người, và E333S trong IgG2. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571.

Đặc biệt, các vị trí gắn kết trên IgG1 của người đối với FcγR1, FcγRII, FcγRIII và FcRn đã được lập bản đồ và các biến thể có gắn kết được cải thiện đã được mô tả. Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Các đột biến cụ thể ở các vị trí 256, 290, 298, 333, 334 và 339 được thể hiện là cải thiện gắn kết với FcγRIII, bao gồm các thể đột biến kết hợp T256A-S298A, S298A-E333A, S298A-K224A và S298A-E333A-K334A (có gắn kết FcγRIIIa và hoạt tính ADCC được tăng cường). Các biến thể IgG1 khác có gắn kết với FcγRIIIa được tăng cường mạnh đã được nhận diện, bao gồm các biến thể có các đột biến S239D-I332E và S239D-I332E-A330L, cho thấy mức tăng lớn nhất về ái lực đối với FcγRIIIa, sự giảm gắn kết FcγRIIb, và hoạt tính gây độc tế bào mạnh ở khỉ cynomolgus. Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005; Awan *et al.* (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278. . Việc đưa các đột biến bộ ba vào trong các kháng thể như alemtuzumab (đặc hiệu CD52), trastuzumab (đặc hiệu HER2/neu), rituximab (đặc hiệu CD20), và cetuximab (đặc hiệu

EGFR) được dịch mã thành hoạt tính ADCC được tăng cường lớn *in vitro*, và biến thể S239D-I332E cho thấy khả năng làm suy kiệt tế bào B được tăng cường ở khỉ. Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005. Ngoài ra, các thể đột biến IgG1 chứa các đột biến L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L, mà thể hiện gắn kết tăng cường với FcγRIIIa và hoạt tính ADCC được tăng cường đồng thời ở chuột chuyển gen biểu hiện FcγRIIIa của người trong các mô hình khối u ác tính tế bào B và bệnh ung thư vú đã được nhận diện. Stavenhagen *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:8882; patent Mỹ số 8,652,466; Nordstrom *et al.* (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123.

Các isotyp IgG khác nhau cũng thể hiện hoạt tính CDC phân biệt (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4). Dangl *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1989. Đối với việc sử dụng trong đó CDC được tăng cường là mong muốn, cũng có thể đưa các đột biến mà làm tăng gắn kết với C1q. Khả năng để tuyển chọn bỏ thể (CDC) có thể được tăng cường bằng các đột biến ở K326 và/hoặc E333 trong IgG2, như K326W (mà làm giảm hoạt tính ADCC) và E333S, để làm tăng gắn kết với C1q, thành phần thứ nhất của đọt bỏ thể. Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571. Việc đưa S267E / H268F / S324T (riêng rẽ hoặc trong kết hợp bất kỳ) vào IgG1 của người tăng cường gắn kết C1q. Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181. Vùng Fc của kháng thể isotyp lai IgG1/IgG3 “113F” của Natsume *et al.* (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (Fig.1 trong đó) còn tạo ra CDC được tăng cường. Cũng xem Michaelsen *et al.* (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553 và Redpath *et al.* (1998) *Immunology* 93:595.

Các đột biến bổ sung mà có thể làm tăng hoặc giảm chức năng hiệu ứng được bộc lộ trong Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177:1129. Cũng xem Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460.

Mặc dù không nhất thiết liên quan đến các MAb kháng TIGIT đối kháng theo sáng chế, các biến thể Fc mà tăng cường ái lực đối với thụ thể ức chế FcγRIIb có thể tăng cường hoạt tính do sự chết tế bào theo chương trình gây ra hoặc hoạt tính hỗ trợ. Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:10966; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2014/0010812. Các biến thể này có thể tạo ra kháng thể có hoạt tính điều biến miễn dịch liên quan đến các tế bào FcγRIIb<sup>+</sup>, bao gồm, ví dụ tế bào B và bạch cầu đơn nhân. Theo một phương án, các biến thể Fc tạo ra ái lực được tăng cường chọn lọc với FcγRIIb so với một hoặc nhiều thụ thể hoạt hóa. Các cải biến để thay đổi gắn kết với FcγRIIb bao gồm một hoặc nhiều cải biến ở vị trí

được chọn từ nhóm bao gồm 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, và 332, theo chỉ số EU. Các thay thế làm ví dụ để tăng cường ái lực FcγRIIb bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, và 332E. Các thay thế làm ví dụ bao gồm 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, và 328Y. Các biến thể Fc khác để tăng cường gắn kết với FcγRIIb bao gồm 235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E, và 267E-328F. Đặc biệt, các biến thể S267E, G236D, S239D, L328F và I332E, bao gồm biến thể kép S267E-L328F, của IgG1 của người là có giá trị cụ thể trong việc tăng cường đặc biệt ái lực đối với thụ thể FcγRIIb ức chế. Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số công bố 2006/024298; WO 2012/087928. Tính đặc hiệu được tăng cường đối với FcγRIIb (như được phân biệt với FcγRIIa<sup>R131</sup>) có thể thu được bằng cách bổ sung thay thế P238D và các đột biến khác (Mimoto *et al.* (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; WO 2012/115241), cũng như V262E và V264E (Yu *et al.* (2013) *J. Am. Chem. Soc.* 135:9723, và WO 2014/184545).

#### Kéo dài thời gian bán thải

Theo các phương án nhất định, kháng thể này được cải biến để làm tăng thời gian bán thải sinh học của nó. Các phương pháp khác nhau có thể được áp dụng. Ví dụ, điều này có thể được thực hiện bằng cách làm tăng ái lực gắn kết của vùng Fc đối với FcRn. Theo một phương án, kháng thể này được biến đổi trong vùng CH1 hoặc CL để chứa thụ thể cứu gắn kết epitop được lấy từ hai vòng lặp của miền CH2 của vùng Fc của IgG, như được mô tả trong patent Mỹ các số 5,869,046 và 6,121,022 của Presta *et al.* Các biến thể Fc làm ví dụ khác mà làm tăng gắn kết với FcRn và/hoặc cải thiện các đặc tính dược động học bao gồm các thay thế ở các vị trí 259, 308, và 434, bao gồm, ví dụ 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y, và 434M. Các biến thể khác mà làm tăng gắn kết của Fc với FcRn bao gồm: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall'Acqua

*et al.* Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua *et al.*, 2006, Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524). Xem patent Mỹ số 8,367,805.

Cải biến của các gốc bảo toàn nhất định trong Fc IgG (I253, H310, Q311, H433, N434), như biến thể N434A (Yeung *et al.* (2009) *J. Immunol.* 182:7663), đã được đề xuất là cách để làm tăng ái lực FcRn, do đó, làm tăng thời gian bán thải của kháng thể trong tuần hoàn. WO 98/023289. Biến thể Fc kết hợp bao gồm M428L và N434S đã được thể hiện là làm tăng gắn kết FcRn và làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh lên đến năm lần. Zalevsky *et al.* (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. Biến thể Fc kết hợp bao gồm các cải biến T307A, E380A và N434A còn kéo dài thời gian bán thải của các kháng thể IgG1. Petkova *et al.* (2006) *Int. Immunol.* 18:1759. Ngoài ra, các biến thể Fc kết hợp bao gồm các biến thể M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M, và M428L-N434S còn được thể hiện là kéo dài thời gian bán thải. WO 2009/086320.

Hơn nữa, biến thể Fc kết hợp bao gồm M252Y, S254T và T256E, làm tăng thời gian bán thải lên gần 4 lần. Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Cải biến IgG1 liên quan tạo ra ái lực FcRn tăng nhưng giảm sự phụ thuộc độ pH (M252Y-S254T-T256E- H433K- N434F) đã được sử dụng để tạo ra cấu trúc IgG1 ("MST-HN Abdeg") để sử dụng làm chất cạnh tranh để ngăn ngừa gắn kết của các kháng thể khác với FcRn, dẫn đến tăng độ thanh thải của kháng thể khác đó, mAb IgG nội sinh (ví dụ, trong môi trường tự miễn) hoặc ngoại sinh khác (trị liệu). Vaccaro *et al.* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; WO 2006/130834.

Các cải biến khác để làm tăng gắn kết FcRn được mô tả trong Yeung *et al.* (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6,277,375; 6,821,505; WO 97/34631; WO 2002/060919.

Theo các phương án nhất định, các isotyp IgG lai có thể được sử dụng để làm tăng gắn kết FcRn, và làm tăng tiềm tàng thời gian bán thải. Ví dụ, biến thể lai IgG1/IgG3 có thể được cấu trúc bằng cách thay thế các vị trí IgG1 trong vùng CH2 và/hoặc CH3 bằng các axit amin từ IgG3 ở các vị trí trong đó hai isotyp khác nhau. Do đó, kháng thể IgG biến thể lai có thể được cấu trúc mà chứa một hoặc nhiều thay thế, ví dụ 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, và 436F. Theo các phương án khác được mô tả trong bản mô tả này, biến thể lai IgG1/IgG2 có thể được cấu trúc bằng cách thay thế các vị trí IgG2 trong vùng CH2 và/hoặc CH3 bằng các axit amin từ IgG1 ở

các vị trí trong đó hai isotyp khác nhau. Do đó, kháng thể IgG biến thể lai có thể được cấu trúc mà chứa một hoặc nhiều thay thế, ví dụ một hoặc nhiều thay thế axit amin sau: 233E, 234L, 235L, –236G (chỉ sự cài xen của glyxin ở vị trí 236), và 327A. Xem patent Mỹ số 8,629,113. Thể lai của các trình tự IgG1/IgG2/IgG4 đã được tạo ra mà làm tăng công khai thời gian bán thải trong huyết thanh và cải thiện sự biểu hiện. Patent Mỹ số 7,867,491 (số trình tự 18 trong đó).

Thời gian bán thải trong huyết thanh của các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được làm tăng bằng cách PEG hóa. Kháng thể có thể được PEG hóa để, ví dụ làm tăng thời gian bán thải sinh học (ví dụ, trong huyết thanh) của kháng thể này. Để PEG hóa kháng thể, kháng thể này, hoặc mảnh của nó, thường được cho phản ứng với chất phản ứng polyetylen glycol (PEG), như este phản ứng hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG, trong các điều kiện trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG được gắn với kháng thể hoặc mảnh kháng thể này. Tốt hơn là, sự PEG hóa được thực hiện thông qua phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme tan trong nước phản ứng tương tự). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polyetylen glycol” được dự định bao gồm dạng bất kỳ trong số các dạng của PEG đã được sử dụng để tạo dẫn xuất các protein khác, như mono (C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimit. Theo một số phương án, kháng thể được PEG hóa này là kháng thể không glycosyl hóa. Các phương pháp PEG hóa protein là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được áp dụng cho các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Xem, ví dụ EP 0154316 của Nishimura *et al* và EP 0401384 của Ishikawa *et al*.

Theo cách khác, trong một số trường hợp, có thể mong muốn làm giảm thời gian bán thải của kháng thể theo sáng chế, chứ không phải làm tăng nó. Các cải biến như I253A (Hornick *et al.* (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) và H435A/R, I253A hoặc H310A (Kim *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) trong Fc của IgG1 của người có thể làm giảm gắn kết FcRn, do đó, làm giảm thời gian bán thải (tăng độ thanh thải) để sử dụng trong các trường hợp trong đó độ thanh thải nhanh được ưu tiên, như tạo ảnh y học. Cũng xem Kenanova *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:622. Các cách khác để tăng cường độ thanh thải bao gồm định dạng các miền gắn kết kháng nguyên theo sáng chế dưới dạng các mảnh kháng thể không có khả năng gắn kết FcRn, như các mảnh Fab. Cải biến này có thể làm giảm thời gian bán thải tuần hoàn của kháng thể từ hai tuần xuống khoảng vài giờ. Sau đó, sự PEG hóa chọn lọc của các mảnh kháng thể có thể được sử dụng để điều chỉnh

ting (làm tăng) thời gian bán thải của các mảnh kháng thể nếu cần. Chapman *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Các mảnh kháng thể cũng có thể được dung hợp với albumin huyết thanh người, ví dụ trong cấu trúc protein dung hợp, để làm tăng thời gian bán thải. Yeh *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904. Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được cấu trúc với miền gắn kết kháng nguyên thứ nhất theo sáng chế và miền gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết với albumin huyết thanh người (HSA). Xem đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO 2009/127691 và các tài liệu patent tham khảo được trích dẫn trong đó. Theo cách khác, trình tự polypeptit chuyên môn hóa có thể được bổ sung vào các mảnh kháng thể để làm tăng thời gian bán thải, ví dụ trình tự polypeptit "XTEN". Schellenberger *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số công bố WO 2010/091122.

#### Các biến thể Fc bổ sung

Khi sử dụng miền ổn định IgG4, thường ưu tiên bao gồm sự thay thế S228P, mà bắt chước trình tự bản lề trong IgG1 và nhờ đó, làm ổn định các phân tử IgG4, ví dụ làm giảm sự trao đổi nhánh Fab giữa kháng thể trị liệu và IgG4 nội sinh ở đối tượng bị bệnh cần điều trị. Labrijn *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925.

Vị trí phân cắt proteaza tiềm năng trong bản lề của các cấu trúc IgG1 có thể được làm mất bằng các cải biến D221G và K222S, làm tăng độ ổn định của kháng thể. WO 2014/043344.

Ái lực và các đặc tính gắn kết của biến thể Fc đối với phối tử của nó (các thụ thể Fc) có thể được xác định bằng nhiều phương pháp thử nghiệm *in vitro* (các thử nghiệm trên cơ sở hóa sinh hoặc miễn dịch) đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp cân bằng (ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA), hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA)), hoặc động học (ví dụ, phân tích BIACORE® SPR), và các phương pháp khác như thử nghiệm gắn kết gián tiếp, thử nghiệm ức chế cạnh tranh, chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (fluorescence resonance energy transfer - FRET), điện di trên gel và sắc ký (ví dụ, lọc gel). Các phương pháp này và các phương pháp khác có thể sử dụng chất đánh dấu trên một hoặc nhiều thành phần được kiểm tra và/hoặc sử dụng nhiều phương pháp phát hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đánh dấu sinh màu, huỳnh quang, phát quang,

hoặc đồng vị. Phần mô tả chi tiết về ái lực gắn kết và động học có thể được tìm thấy trong Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), mà tập trung vào các tương tác kháng thể-chất kháng nguyên.

Theo các phương án khác nữa, sự glycosyl hóa của kháng thể được cải biến để làm tăng hoặc làm giảm chức năng hiệu ứng. Ví dụ, kháng thể không glycosyl hóa có thể được tạo ra mà thiếu tất cả chức năng hiệu ứng bằng cách gây đột biến gốc asparagin bảo toàn ở vị trí 297 (ví dụ, N297A), do đó, làm mất bỏ thể và gắn kết Fc $\gamma$ RI. Bolt *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. Cũng xem Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (sử dụng N297Q trong IgG1 để làm mất sự glycosyl hóa ở vị trí 297).

Mặc dù các kháng thể không glycosyl hóa nói chung thiếu chức năng hiệu ứng, các đột biến có thể được đưa vào để phục hồi chức năng đó. Các kháng thể không glycosyl hóa, ví dụ các kháng thể thu được từ các đột biến N297A/C/D/hoặc H hoặc được tạo ra trong các hệ (ví dụ, *E. coli*) mà không glycosyl hóa các protein, có thể được gây đột biến tiếp để phục hồi gắn kết Fc $\gamma$ R, ví dụ S298G và/hoặc T299A/G/hoặc H (WO 2009/079242), hoặc E382V và M428I (Jung *et al.* (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 107:604).

Ngoài ra, kháng thể có ADCC được tăng cường có thể được tạo ra bằng cách thay đổi sự glycosyl hóa. Ví dụ, việc loại bỏ fucosa từ các oligosacarit được liên kết Asn297 của chuỗi nặng đã được thể hiện là tăng cường ADCC, dựa trên gắn kết cải thiện với Fc $\gamma$ RIIIa. Shields *et al.* (2002) *JBC* 277:26733; Niwa *et al.* (2005) *J. Immunol. Methods* 306: 151; Cardarelli *et al.* (2009) *Clin. Cancer Res.*15:3376 (MDX-1401); Cardarelli *et al.* (2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257 (MDX-1342). Các kháng thể fucosa thấp này có thể được tạo ra, ví dụ trong các tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO) bất hoạt gen không có fucosyltransferaza (*FUT8*) (Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614), hoặc trong các tế bào khác mà tạo ra các kháng thể không fucosyl hóa. Xem, ví dụ Zhang *et al.* (2011) *mAbs* 3:289 và Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210 (cả hai mô tả việc tạo ra kháng thể trong *Pichia pastoris*, được xử lý glyco); Mossner *et al.* (2010) *Blood* 115:4393; Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; EP 1176195B1. ADCC cũng có thể được tăng cường như được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 03/035835, mà bộc lộ việc sử dụng dòng tế bào CHO biến thể, Lec13, có khả năng gắn fucosa giảm cho các hydrat cacbon được liên kết Asn(297), còn dẫn đến sự

giảm fucosyl hóa của các kháng thể được biểu hiện trong tế bào vật chủ đó. *Cũng xem* Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740. Theo cách khác, chất tương tự fucoza có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong quá trình sản xuất kháng thể để ức chế sự hợp nhất của fucoza vào trong hydrat cacbon trên kháng thể này. WO 2009/135181.

Các cấu trúc GlcNac tách đôi tăng dần trong các oligosacarit được liên kết kháng thể cũng tăng cường ADCC. Công bố đơn PCT số WO 99/54342 của Umana *et al* mô tả các dòng tế bào được xử lý kỹ thuật để biểu hiện glycosyl transferaza cải biến glycoprotein (ví dụ, beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) vì vậy các kháng thể được biểu hiện trong các dòng tế bào được xử lý kỹ thuật này có cấu trúc GlcNac tách đôi tăng dần đến tăng hoạt tính ADCC của kháng thể (*cũng xem* Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Các biến thể glycosyl hóa bổ sung đã được phát triển mà không có các gốc galactosa, axit sialic, fucoza và xyloza (được gọi là các dạng glyco GNGN), mà biểu hiện ADCC và ADCP tăng nhưng CDC giảm, cũng như các biến thể khác mà không có axit sialic, fucoza và xyloza (được gọi là các dạng glyco G1/G2), mà biểu hiện ADCC, ADCP và CDC tăng. Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số công bố 2013/0149300. Các kháng thể có các kiểu glycosyl hóa này tùy ý được tạo ra trong các cây *N. benthamiana* được cải biến di truyền trong đó các gen xylosyl và fucosyl transferaza nội sinh đã được làm bất hoạt.

Việc xử lý glyco cũng có thể được sử dụng để cải biến đặc tính chống viêm của cấu trúc IgG bằng cách thay đổi hàm lượng  $\alpha$ 2,6 sialyl của các chuỗi hydrat cacbon được gắn vào Asn297 của vùng Fc, trong đó tỷ lệ của dạng được  $\alpha$ 2,6 sialyl hóa tăng dần đến tăng cường tác dụng chống viêm. *Xem* Nimmerjahn *et al.* (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513. Ngược lại, sự giảm tỷ lệ của các kháng thể có hydrat cacbon được  $\alpha$ 2,6 sialyl hóa có thể hữu ích trong trường hợp mà không cần đặc tính chống viêm. Các phương pháp biến đổi hàm lượng  $\alpha$ 2,6 sialyl hóa của kháng thể, ví dụ bằng cách tinh chế chọn lọc các dạng được  $\alpha$ 2,6 sialyl hóa hoặc bằng cách cải biến bằng enzym, được nêu trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số công bố 2008/0206246. Theo các phương án khác, trình tự axit amin của vùng Fc có thể được cải biến để bất chức tác dụng  $\alpha$ 2,6 sialyl hóa, ví dụ bằng cách bao gồm cải biến F241A. WO 2013/095966.

### III. Các đặc tính vật lý của kháng thể

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Các vị trí glycosyl hóa này có thể dẫn đến làm tăng khả năng sinh miễn dịch của kháng thể hoặc thay đổi pK của kháng thể do thay đổi việc gắn kết kháng nguyên (Marshall *et al.* (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol. Immunol.* 37:697-706). Việc glycosyl hóa đã biết là xảy ra ở các môtip chứa trình tự N-X-S/T. Trong một số trường hợp, ưu tiên có kháng thể kháng TIGIT mà không chứa sự glycosyl hóa vùng biến đổi. Điều này có thể đạt được bằng cách lựa chọn các kháng thể không chứa môtip glycosyl hóa trong vùng biến đổi hoặc bằng cách gây đột biến các gốc trong vùng glycosyl hóa.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này không chứa vị trí đồng phân asparagin. Việc khử amit của asparagin có thể xảy ra trên trình tự N-G hoặc D-G và dẫn đến tạo ra gốc axit isoaspartic đưa nút xoắn vào chuỗi polypeptit và làm giảm độ ổn định của nó (tác dụng axit isoaspartic).

Mỗi kháng thể sẽ có duy nhất một điểm đẳng điện (pI), điểm này thường nằm ở khoảng độ pH từ 6 đến 9,5. pI của kháng thể IgG1 thường nằm trong khoảng độ pH từ 7-9,5 và pI của kháng thể IgG4 thường nằm trong khoảng độ pH từ 6-8. Có suy đoán rằng các kháng thể có pI nằm ngoài khoảng bình thường có thể có một số không gấp cuộn và không ổn định trong các điều kiện in vivo. Do đó, ưu tiên có kháng thể kháng TIGIT mà có giá trị pI nằm trong khoảng bình thường. Điều này có thể đạt được bằng cách lựa chọn các kháng thể có pI trong khoảng bình thường hoặc bằng cách gây đột biến các gốc bề mặt được tích điện.

Mỗi kháng thể sẽ có nhiệt độ nóng chảy đặc trưng, với nhiệt độ nóng chảy cao hơn biểu thị độ ổn định in vivo nói chung lớn hơn (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Nói chung, ưu tiên rằng T<sub>M1</sub> (nhiệt độ duỗi mạch ban đầu) lớn hơn 60°C, tốt hơn là lớn hơn 65°C, tốt hơn nữa là lớn hơn 70°C. Điểm nóng chảy của kháng thể có thể được đo bằng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (Chen *et al.* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al.* (1999) *Immunol Lett.* 68:47-52) hoặc phổ lưỡng cực vòng (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể được chọn sao cho không phân hủy nhanh chóng. Mức độ phân hủy của kháng thể có thể được đo bằng cách điện di mao quản (capillary electrophoresis - CE) và MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

Theo một phương án được ưu tiên khác, các kháng thể được chọn sao cho có tác dụng kết tụ được làm giảm đến mức tối thiểu, tác dụng này vốn có thể dẫn đến việc kích hoạt đáp ứng miễn dịch không mong muốn và/hoặc các đặc tính được động học bất lợi hoặc biến đổi. Nói chung, các kháng thể là chấp nhận được với mức độ kết tụ là 25% hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 20% hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 15% hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 10% hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nữa là 5% hoặc nhỏ hơn. Mức độ kết tụ có thể được đo bằng một số kỹ thuật, bao gồm cột loại cỡ (size-exclusion column - SEC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC), và tán xạ ánh sáng.

#### IV. Phân tử axit nucleic

Một khía cạnh khác được mô tả trong bản mô tả này đề cập đến các phân tử axit nucleic mà mã hóa các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Các axit nucleic này có thể có mặt trong các tế bào nguyên vẹn, trong dịch tan tế bào, hoặc ở dạng được làm sạch một phần hoặc gần như tinh khiết. Axit nucleic là “được phân lập” hoặc “được làm gần như tinh khiết” khi được làm sạch khỏi các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ các axit nucleic khác của tế bào (ví dụ, ADN nhiễm sắc thể khác, ví dụ ADN nhiễm sắc thể mà được liên kết với ADN được phân lập trong tự nhiên) hoặc protein, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý bằng kiềm/SDS, tạo dải CsCl, sắc ký cột, enzym giới hạn, điện di trên gel agarosa và các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực này. Xem, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Axit nucleic được mô tả trong bản mô tả này có thể là, ví dụ ADN hoặc ARN và có hoặc không chứa các trình tự intron. Theo các phương án nhất định, axit nucleic này là phân tử cADN (ADN bổ trợ).

Các axit nucleic được mô tả trong bản mô tả này có thể thu được bằng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Đối với các kháng thể được biểu hiện bởi các tế bào lai (ví dụ, các tế bào lai được tạo ra từ chuột chuyển gen mang gen globulin miễn dịch của người như được mô tả thêm dưới đây), thì các cADN mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai này có thể thu được bằng kỹ thuật khuếch đại PCR

hoặc tách dòng cADN chuẩn. Đối với các kháng thể thu được từ thư viện gen globulin miễn dịch (ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật hiển thị trên thể thực khuẩn), thì axit nucleic mã hóa kháng thể này có thể được khôi phục từ thư viện này.

Khi các đoạn ADN mã hóa các đoạn VH và VL thu được, thì các đoạn ADN này có thể được thao tác tiếp bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn, ví dụ để chuyển các gen vùng biến đổi sang các gen của chuỗi kháng thể có chiều dài đầy đủ, sang các gen của mảnh Fab hoặc gen scFv. Trong các thao tác này, mảnh ADN mã hóa VL hoặc VH được liên kết có điều khiển với một mảnh ADN khác mã hóa một protein khác, như vùng hằng định của kháng thể hoặc cầu nối linh hoạt. Thuật ngữ “được liên kết có điều khiển”, được sử dụng trong trường hợp này, được dự định có nghĩa là hai đoạn ADN được nối sao cho các trình tự axit amin được mã hóa bởi hai đoạn ADN này vẫn ở trong khung.

ADN được phân lập mã hóa vùng VH có thể được chuyển sang gen của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết có điều khiển ADN mã hóa VH với một phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định của chuỗi nặng (bản lề, CH1, CH2 và/hoặc CH3). Các trình tự của các gen vùng hằng định của chuỗi nặng của người là đã biết trong lĩnh vực này (xem *ví dụ*, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các mảnh ADN chứa các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn. Vùng hằng định của chuỗi nặng có thể là vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD, ví dụ vùng IgG1. Đối với gen của chuỗi nặng của mảnh Fab, ADN mã hóa VH có thể được liên kết có điều khiển với một phân tử ADN khác chỉ mã hóa vùng hằng định CH1 của chuỗi nặng.

ADN được phân lập mã hóa vùng VL có thể được chuyển sang gen của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (cũng như gen của chuỗi nhẹ Fab) bằng cách liên kết có điều khiển ADN mã hóa VL với một phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định của chuỗi nhẹ, CL. Các trình tự của các gen vùng hằng định của chuỗi nhẹ của người là đã biết trong lĩnh vực này (xem *ví dụ*, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các mảnh ADN chứa các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là vùng hằng định kappa hoặc lamda.

Để tạo ra gen scFv, các mảnh ADN mã hóa VH và VL được liên kết có điều khiển với một mảnh khác mã hóa cầu nối linh hoạt, ví dụ mã hóa trình tự axit amin (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, sao cho các trình tự VH và VL có thể được biểu hiện dưới dạng protein đơn chuỗi liên kết, với các vùng VL và VH được nối bằng cầu nối linh hoạt (xem ví dụ, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

#### V. Sản xuất kháng thể

Các kháng thể khác nhau theo sáng chế, ví dụ các kháng thể mà cạnh tranh với hoặc gắn kết với cùng epitop như kháng thể kháng TIGIT của người được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết, như kỹ thuật lai tế bào sinh dưỡng chuẩn được mô tả bởi Kohler và Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Mặc dù các quy trình lai tế bào sinh dưỡng là được ưu tiên, về nguyên tắc, các kỹ thuật khác để tạo ra kháng thể đơn dòng cũng có thể được sử dụng, ví dụ sự biến nạp tế bào limphô B virus hoặc gây ung thư, kỹ thuật hiển thị trên thể thực khuẩn bằng cách sử dụng thư viện các gen kháng thể của người.

Hệ động vật được ưu tiên để tạo ra các tế bào lai là hệ của chuột. Việc tạo ra tế bào lai trong chuột nhất là quy trình đã biết rõ. Các quy trình và kỹ thuật gây miễn dịch để phân lập các tế bào lách được gây miễn dịch để dung hợp là đã biết trong lĩnh vực này. Các đối tác dung hợp (ví dụ, các tế bào u tủy của chuột) và các quy trình dung hợp cũng đã biết.

Các kháng thể khảm hoặc được làm giống như của người được mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo ra trên cơ sở trình tự của kháng thể đơn dòng của chuột tạo được như đã được mô tả trên đây. ADN mã hóa globulin miễn dịch của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể thu được từ tế bào lai cần quan tâm của chuột và được xử lý kỹ thuật để chứa trình tự globulin miễn dịch không phải của chuột (ví dụ, của người) bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Ví dụ, để tạo ra kháng thể khảm, các vùng biến đổi của chuột có thể được liên kết với các vùng hằng định của người bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567 của Cabilly *et al.*). Để tạo ra kháng thể được làm giống như của người, các vùng CDR của chuột có thể được cài xen vào khung của người bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ,

patent Mỹ số 5,225,539 của Winter, và patent Mỹ các số 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 của Queen *et al*).

Theo một phương án, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là các kháng thể đơn dòng của người. Các kháng thể đơn dòng của người này nhằm kháng TIGIT có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể mang các phần của hệ miễn dịch của người chứ không mang hệ miễn dịch của chuột. Chuột nhắt chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể này bao gồm chuột nhắt được gọi trong bản mô tả này lần lượt là chuột nhắt HuMAb và chuột nhắt KM, và được gọi chung trong bản mô tả này là “chuột Ig của người.”

HuMAb mouse<sup>®</sup> (Medarex, Inc.) chứa locut nhỏ gen globulin miễn dịch của người mã hóa trình tự globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ  $\kappa$  và chuỗi nặng ( $\mu$  và  $\gamma$ ) của người không được sắp xếp lại, cùng với các đột biến đích làm bất hoạt các locut chuỗi  $\mu$  và  $\kappa$  nội sinh (xem ví dụ, Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Do đó, chuột có biểu hiện IgM hoặc  $\kappa$  của chuột, và đáp ứng với việc gây miễn dịch giảm, các gen chuyển của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào trải qua quá trình chuyển nhóm và đột biến sinh dưỡng để tạo ra kháng thể đơn dòng IgG $\kappa$  của người có ái lực cao (Lonberg, N. *et al.* (1994), *nêu trên*; được xem xét trong Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, và Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Việc tạo và sử dụng chuột nhắt HuMAb, và các cải biến hệ gen được mang bởi chuột này, được mô tả thêm trong Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; và Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, nội dung của tất cả các tài liệu này được hợp nhất cụ thể vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ. Xem thêm, patent Mỹ các số 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; và 5,770,429; tất cả đều của Lonberg và Kay; patent Mỹ số 5,545,807 của Surani *et al*; công bố đơn PCT các số WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 và WO 99/45962, tất cả đều của Lonberg và Kay; và công bố đơn PCT số WO 01/14424 của Korman *et al.*

Theo các phương án nhất định, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được sinh ra bằng cách sử dụng chuột nhất mang các trình tự globulin miễn dịch của người trên các gen chuyển và các nhiễm sắc thể chuyển, như chuột nhất mang gen chuyển của chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nhẹ của người. Chuột nhất này, trong bản mô tả này được gọi là “chuột nhất KM”, được mô tả chi tiết trong công bố đơn PCT số WO 02/43478 của Ishida *et al.*

Hơn nữa, các hệ động vật chuyển gen khác biểu hiện các gen globulin miễn dịch của người là có sẵn trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để sinh ra các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, hệ chuyển gen khác được gọi là Xenomouse (Abgenix, Inc.) có thể được sử dụng; chuột nhất như vậy được mô tả trong, ví dụ patent Mỹ các số 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 và 6,162,963 của Kucherlapati *et al.*

Hơn nữa, hệ động vật chuyển nhiễm sắc thể khác biểu hiện các gen globulin miễn dịch của người là có sẵn trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để sinh ra các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, chuột nhất mang cả nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nhẹ của người, được gọi là “chuột nhất TC” có thể được sử dụng; chuột nhất như vậy được mô tả trong Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Hơn thế nữa, bò mang các nhiễm sắc thể chuyển của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người đã được mô tả trong lĩnh vực này (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) và có thể được sử dụng để sinh ra các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này.

Các hệ chuột nhất khác được mô tả trong lĩnh vực này nhằm sinh ra kháng thể của người, ví dụ các kháng thể kháng TIGIT của người, bao gồm (i) chuột nhất VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nội sinh của chuột nhất đã được thay thế, thông qua sự tái tổ hợp tương đồng, bằng các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người, được liên kết có điều khiển với các vùng hằng định nội sinh của chuột nhất, sao cho kháng thể khảm (V của người/C của chuột nhất) được sinh ra ở chuột nhất, và sau đó, được chuyển hóa tiếp thành kháng thể đầy đủ của người bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn; và (ii) chuột nhất MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), trong đó chuột nhất này chứa các vùng biến đổi của chuỗi nặng của người chưa được sắp xếp lại nhưng một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chung của người được sắp xếp lại. Chuột nhất này, và

sử dụng nó để sinh ra kháng thể, được mô tả trong, ví dụ WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 và US 2012/0073004.

Các kháng thể đơn dòng của người được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp hiển thị trên thể thực khuẩn để sàng lọc thư viện của các gen globulin miễn dịch của người. Các phương pháp hiển thị trên thể thực khuẩn như vậy để phân lập các kháng thể của người đã được thiết lập trong lĩnh vực này. Xem ví dụ: patent Mỹ các số 5,223,409; 5,403,484; và 5,571,698 của Ladner *et al*; patent Mỹ các số 5,427,908 và 5,580,717 của Dower *et al*; patent Mỹ các số 5,969,108 và 6,172,197 của McCafferty *et al*; và patent Mỹ các số 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081 của Griffiths *et al*.

Các kháng thể đơn dòng của người được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột SCID trong đó các tế bào miễn dịch của người được hoàn nguyên sao cho đáp ứng kháng thể của người có thể được tạo ra khi gây miễn dịch. Chuột nhất này được mô tả trong, ví dụ patent Mỹ các số 5,476,996 và 5,698,767 của Wilson *et al*.

#### Gây miễn dịch

Để tạo ra các kháng thể đầy đủ của người với TIGIT của người, chuột nhất chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể chứa các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, chuột nhất HCo12, HCo7 hoặc KM) có thể được gây miễn dịch bằng chế phẩm đã được tinh chế hoặc được làm giàu chứa kháng nguyên TIGIT và/hoặc các tế bào biểu hiện TIGIT, như được mô tả đối với các kháng nguyên khác, ví dụ bởi Lonberg *et al*. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al*. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 và WO 98/24884. Theo cách khác, chuột nhất có thể được gây miễn dịch bằng ADN mã hóa TIGIT của người. Tốt hơn là, chuột này sẽ có độ tuổi 6-16 tuần tuổi khi truyền lần thứ nhất. Ví dụ, chế phẩm đã được tinh chế hoặc được làm giàu (5-50  $\mu$ g) chứa kháng nguyên TIGIT tái tổ hợp có thể được sử dụng để gây miễn dịch chuột nhất HuMAb vào trong màng bụng. Trong trường hợp mà sự gây miễn dịch bằng cách sử dụng chế phẩm đã được tinh chế hoặc được làm giàu chứa kháng nguyên TIGIT không gây ra kháng thể, chuột nhất cũng có thể được gây miễn dịch bằng các tế bào biểu hiện TIGIT, ví dụ dòng

tế bào, để thúc đẩy đáp ứng miễn dịch. Các dòng tế bào làm ví dụ bao gồm các dòng tế bào CHO và Raji ổn định biểu hiện quá mức TIGIT.

Trải nghiệm lũy tích với các kháng nguyên khác nhau đã thể hiện rằng chuột chuyển gen HuMAb đáp ứng tốt nhất khi được gây miễn dịch ban đầu trong màng bụng (IP) hoặc dưới da (SC) bằng kháng nguyên trong tá dược Ribi, tiếp theo là mỗi lần gây miễn dịch IP/SC mỗi tuần khác (lên đến tối đa là 10) bằng kháng nguyên trong tá dược Ribi. Đáp ứng miễn dịch có thể được giám sát theo tiến trình của quy trình gây miễn dịch bằng các mẫu huyết tương thu được bằng cách lấy máu sau ổ mắt. Huyết tương có thể được sàng lọc bằng ELISA và FACS (như được mô tả dưới đây), và chuột nhất có đủ hiệu giá của globulin miễn dịch của người kháng TIGIT có thể được sử dụng để dung hợp. Chuột nhất có thể được tăng cường trong tĩnh mạch bằng kháng nguyên 3 ngày trước khi làm chết và lấy lá lách và hạch bạch huyết. Mong muốn rằng 2-3 thể dung hợp đối với mỗi lần gây miễn dịch có thể cần phải được thực hiện. Khoảng 6 đến 24 con chuột thường được gây miễn dịch đối với mỗi kháng nguyên. Thông thường, các chủng HCo7, HCo12, và KM được sử dụng. Ngoài ra, cả hai gen chuyển HCo7 và HCo12 có thể được sinh ra cùng nhau trong một con chuột có hai gen chuyển khác nhau của chuỗi nặng của người (HCo7/HCo12).

#### Sản xuất tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng kháng TIGIT

Để sản xuất tế bào lai sản sinh kháng thể đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này, các tế bào lách và/hoặc tế bào hạch bạch huyết từ chuột được gây miễn dịch có thể được phân lập và được dung hợp với dòng tế bào được làm bất tử thích hợp, như dòng tế bào u tủy của chuột nhất. Tế bào lai thu được có thể được sàng lọc về việc sản sinh các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Ví dụ, các huyền phù đơn bào chứa tế bào limphô lách từ chuột nhất được gây miễn dịch có thể được dung hợp với các tế bào u tủy không tiết của chuột nhất Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) bằng 50% PEG. Các tế bào được đưa vào đĩa ở xấp xỉ  $2 \times 10^5$  trong đĩa vi chuẩn đáy bằng, tiếp theo ủ trong hai tuần trong môi trường chọn lọc chứa 10% huyết thanh bào thai dòng vô tính, 18% môi trường được làm thích nghi với điều kiện “653”, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamin, 1 mM natri pyruvat, 5mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 đơn vị/mL penicillin, 50mg/mL streptomycin, 50mg/mL gentamycin và 1X HAT (Sigma). Sau khoảng hai tuần, các tế bào có thể được nuôi cấy trong môi trường trong đó HAT được thay thế bằng HT. Sau đó, các lỗ riêng có thể được sàng lọc bằng ELISA đối với các kháng thể IgM và IgG đơn

dòng của người. Ngay khi sự sinh trưởng lớn của tế bào lai xảy ra, môi trường có thể được quan sát thường xuyên sau 10-14 ngày. Các tế bào lai tiết kháng thể có thể được đưa lại vào đĩa, được sàng lọc lần nữa, và nếu vẫn dương tính đối với IgG của người, các kháng thể đơn dòng này có thể được tách dòng phụ ít nhất hai lần bằng cách giới hạn độ pha loãng. Sau đó, các dòng phụ vô tính ổn định có thể được nuôi cấy *in vitro* để tạo ra các lượng nhỏ kháng thể trong môi trường nuôi cấy mô để mô tả đặc điểm.

Để làm sạch các kháng thể đơn dòng, các tế bào lai được chọn có thể được phát triển trong bình quay tròn dung tích hai lít để làm sạch kháng thể đơn dòng. Dịch nổi có thể được lọc và cô trước khi sắc ký ái lực bằng protein A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG được rửa giải có thể được kiểm tra bằng cách điện di trên gel và sắc ký lỏng hiệu năng cao để bảo đảm độ tinh khiết. Dung dịch đậm có thể được trao đổi trong PBS, và nồng độ này có thể được xác định bằng OD280 bằng cách sử dụng hệ số tắt 1,43. Các kháng thể đơn dòng có thể được chia phần phân ước và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

## VI. Sản xuất kháng thể

### Sản xuất các tế bào chuyển nạp sản sinh kháng thể đơn dòng kháng TIGIT

Các kháng thể theo sáng chế, kể cả các kháng thể đặc hiệu mà các trình tự được cung cấp và các kháng thể kháng TIGIT có liên quan khác, có thể được sản sinh trong tế bào chuyển nạp của tế bào vật chủ bằng cách sử dụng, ví dụ kết hợp các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và các phương pháp chuyển nạp gen như đã biết trong lĩnh vực này (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Ví dụ, để biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, các ADN mã hóa các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có chiều dài một phần hoặc đầy đủ, có thể thu được bằng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn (ví dụ, khuếch đại PCR hoặc tạo dòng cADN bằng cách sử dụng tế bào lai mà biểu hiện kháng thể cần quan tâm) và các ADN có thể được cài xen vào trong các vector biểu hiện sao cho các gen được liên kết có điều khiển với các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã. Trong trường hợp này, thuật ngữ “được liên kết có điều khiển” được dự định có nghĩa là gen của kháng thể được nối vào vector sao cho trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã trong vector này phát huy chức năng dự định của chúng là điều hòa sự phiên mã và dịch mã gen của kháng thể. Vector biểu hiện và trình tự kiểm soát sự biểu hiện được chọn để tương hợp với tế bào vật chủ biểu hiện được sử dụng. Gen

của chuỗi nhẹ của kháng thể và gen của chuỗi nặng của kháng thể có thể được cài xen vào vector riêng hoặc cả hai gen được cài xen vào cùng một vector biểu hiện. Các gen của kháng thể được cài xen vào (các) vector biểu hiện bằng các phương pháp chuẩn (ví dụ, nối các vị trí cắt giới hạn bổ sung trên mảnh gen của kháng thể và vector, hoặc nối đầu cụt nếu không có vị trí cắt giới hạn). Các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để tạo ra gen của kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc isotyp kháng thể bất kỳ bằng cách cài xen chúng vào các vector biểu hiện mã hóa vùng hằng định của chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nhẹ của isotyp mong muốn sao cho đoạn  $V_H$  được liên kết có điều khiển với (các) đoạn  $C_H$  trong vector này và đoạn  $V_L$  được liên kết có điều khiển với đoạn  $C_L$  trong vector này. Ngoài ra hoặc theo cách khác, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu mà tạo thuận lợi cho việc tiết chuỗi kháng thể từ tế bào vật chủ. Gen của chuỗi kháng thể này có thể được tách dòng vào vector sao cho peptit tín hiệu được liên kết trong khung với đầu tận cùng amino của gen của chuỗi kháng thể này. Peptit tín hiệu này có thể là peptit tín hiệu globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (tức là peptit tín hiệu từ protein không phải globulin miễn dịch).

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể, các vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mang các trình tự điều hòa mà kiểm soát sự biểu hiện của các gen của kháng thể chuỗi trong tế bào vật chủ. Thuật ngữ “trình tự điều hòa” được dự định bao gồm các trình tự khởi động, trình tự tăng cường và các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu polyadenyl hóa) kiểm soát sự phiên mã hoặc dịch mã của các gen của chuỗi kháng thể. Các trình tự điều hòa này được mô tả, ví dụ trong Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng việc thiết kế vector biểu hiện, kể cả chọn lọc các trình tự điều hòa, có thể phụ thuộc vào các yếu tố này như là việc lựa chọn tế bào chủ cần được biến nạp, mức độ biểu hiện của protein mong muốn, v.v.. Các trình tự điều hòa được ưu tiên đối với sự biểu hiện ở tế bào vật chủ động vật có vú bao gồm các yếu tố thuộc virus nhằm trực tiếp mức độ biểu hiện protein cao ở tế bào động vật có vú, như trình tự khởi động và/hoặc trình tự tăng cường có nguồn gốc từ cytomegalovirus (CMV), virus ở khỉ 40 (Simian Virus 40 - SV40), adenovirus, (ví dụ, trình tự khởi động muộn chính ở adenovirus (adenovirus major late promoter - AdMLP) và virus polio. Theo cách khác, các trình tự điều hòa không thuộc virus có thể được sử dụng, như trình tự khởi động

ubiquitin hoặc trình tự khởi động  $\beta$ -globin. Ngoài ra, các yếu tố điều hòa bao gồm các trình tự từ các nguồn khác nhau, như hệ thống trình tự khởi động SR $\alpha$ , chứa các trình tự từ trình tự khởi động sớm SV40 và trình tự lặp đầu tận cùng dài của virus gây bệnh bạch cầu tế bào T của người loại 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Ngoài gen của chuỗi kháng thể và các trình tự điều hòa, các vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mang các trình tự bổ sung, như các trình tự điều hòa sự sao chép của vector trong tế bào vật chủ (ví dụ, trình tự khởi đầu sao chép) và các gen đánh dấu dễ chọn lọc. Gen đánh dấu dễ chọn lọc tạo thuận lợi cho việc chọn lọc tế bào vật chủ mà vector được đưa vào (xem, ví dụ patent Mỹ các số 4,399,216, 4,634,665 và 5,179,017, tất cả của Axel *et al.*). Ví dụ, thông thường gen đánh dấu dễ chọn lọc truyền tính kháng các thuốc, như G418, hygromycin hoặc metotrexat, trên tế bào vật chủ mà vector đã được đưa vào. Các gen đánh dấu dễ chọn lọc được ưu tiên bao gồm gen dihydrofolat reductaza (dihydrofolate reductase - DHFR) (để sử dụng trong tế bào vật chủ dhfr đối với việc chọn lọc/khuếch đại metotrexat) và gen neo (đối với việc chọn lọc G418).

Để biểu hiện các chuỗi nhẹ và nặng, (các) vector biểu hiện mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ được chuyển nạp vào tế bào vật chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Các dạng khác nhau của thuật ngữ “chuyển nạp” được dự định bao gồm nhiều kỹ thuật thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào vật chủ của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình, ví dụ điện di, kết tủa canxi-phosphat, chuyển nạp DEAE-dextran và các kỹ thuật tương tự. Mặc dù, về mặt lý thuyết có thể biểu hiện các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này trong tế bào vật chủ của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình, nhưng sự biểu hiện của kháng thể trong các tế bào của sinh vật có nhân điển hình, và tốt nhất là tế bào vật chủ của động vật có vú, là được ưu tiên nhất do các tế bào của sinh vật có nhân điển hình, và đặc biệt là các tế bào của động vật có vú, là thích hợp hơn so với các tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình để lắp ráp và tiết kháng thể được gấp cuộn chính xác và có hoạt tính miễn dịch. Sự biểu hiện của các gen của kháng thể ở sinh vật chưa có nhân điển hình đã được báo cáo là không hiệu quả trong việc sản sinh kháng thể có hoạt tính với hiệu suất cao (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13). Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra trong chủng nấm men được xử lý kỹ thuật glyco *Pichia pastoris*. Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210.

Tế bào vật chủ của động vật có vú được ưu tiên để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) (bao gồm tế bào dhfr- CHO, được mô tả trong Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, được sử dụng với chất đánh dấu để chọn lọc DHFR, ví dụ như được mô tả trong R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), tế bào u tủy NSO, tế bào COS và tế bào SP2. Đặc biệt là, để sử dụng với các tế bào u tủy NSO, một hệ biểu hiện được ưu tiên khác là hệ biểu hiện gen GS được bộc lộ trong WO 87/04462, WO 89/01036 và EP 338,841. Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các gen của kháng thể được đưa vào tế bào vật chủ của động vật có vú, các kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ trong một khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào vật chủ này hoặc, tốt hơn nếu, tiết kháng thể này vào môi trường nuôi cấy mà tế bào vật chủ được phát triển. Các kháng thể có thể được thu lại từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp làm sạch protein chuẩn.

Các đầu tận cùng N và C của chuỗi polypeptit của kháng thể theo sáng chế có thể khác với trình tự được kỳ vọng do sự cải biến sau dịch mã thường được quan sát thấy. Ví dụ, các gốc lysin đầu tận cùng C thường không có trong các chuỗi nặng của kháng thể. Dick *et al.* (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. Các gốc glutamin đầu tận cùng N, và các gốc glutamat ở phạm vi ít hơn, thường được chuyển hóa thành các gốc pyroglutamat trên cả hai chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể trị liệu. Dick *et al.* (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu *et al.* (2011) *JBC* 286:11211; Liu *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

Các trình tự axit amin của các kháng thể kháng huTIGIT chủ vận khác nhau theo sáng chế được nêu trong phần Danh mục trình tự, mà được tóm tắt trong bảng 5. Vì các nguyên nhân nêu trên, lysin đầu tận cùng C không được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong phần Danh mục trình tự đối với các chuỗi nặng hoặc các miền ổn định của chuỗi nặng. Tuy nhiên, theo phương án thực hiện khác, mỗi chuỗi nặng của các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế, và/hoặc cấu trúc di truyền mã hóa các kháng thể này hoặc các chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của chúng, chứa gốc lysin bổ sung này ở đầu tận cùng C của (các) chuỗi nặng.

## VII. Thử nghiệm

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được thử nghiệm về việc gắn kết với TIGIT bằng, ví dụ ELISA chuẩn. Nói ngắn gọn, đĩa vi chuẩn được phủ bằng TIGIT đã làm sạch ở 1-2 $\mu$ g/mL trong PBS, và sau đó, được phong bế bằng albumin huyết thanh bò 5% trong PBS. Các dịch kháng thể pha loãng (ví dụ, các dịch pha loãng của huyết tương từ chuột được gây miễn dịch bằng TIGIT) được bổ sung vào mỗi lỗ và được ủ trong 1-2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các đĩa này được rửa bằng PBS/Tween và sau đó, được ủ bằng chất phản ứng thứ hai, ví dụ đối với kháng thể của người, hoặc nếu không thì kháng thể có vùng hằng định của chuỗi nặng của người, chất phản ứng đa dòng đặc hiệu Fc IgG của dê kháng người được tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa (horseradish peroxidase - HRP) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi rửa, các đĩa được phát triển bằng cơ chất ABTS (Moss Inc, product: ABTS-1000) và được phân tích bằng máy đo quang phổ ở OD 415-495. Sau đó, huyết thanh từ chuột nhất được gây miễn dịch được sàng lọc tiếp bằng miễn dịch dòng tế bào đối với gắn kết với dòng tế bào biểu hiện TIGIT của người, nhưng không gắn kết với dòng tế bào đối chứng mà không biểu hiện TIGIT. Nói ngắn gọn, sự gắn kết của các kháng thể kháng TIGIT được đánh giá bằng cách ủ các tế bào CHO biểu hiện TIGIT bằng kháng thể kháng TIGIT ở tỷ lệ pha loãng 1:20. Các tế bào được rửa và sự gắn kết được phát hiện bằng Ab kháng IgG của người được đánh dấu bằng PE. Phân tích miễn dịch dòng tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng miễn dịch dòng tế bào FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Tốt hơn là, chuột nhất mà phát triển hiệu giá cao nhất sẽ được sử dụng để dung hợp. Các thử nghiệm tương tự có thể được thực hiện bằng cách phát hiện các kháng thể kháng chuột nhất nếu các kháng thể kháng huTIGIT của chuột nhất cần được phát hiện.

Thử nghiệm ELISA như đã được mô tả trên đây có thể được sử dụng để sàng lọc các kháng thể và, do đó, các tế bào lai mà sản sinh kháng thể thể hiện khả năng phản ứng dương tính với chất kháng nguyên TIGIT. Các tế bào lai mà sản sinh các kháng thể gắn kết, tốt hơn là, với ái lực cao, với TIGIT có thể sau đó được tách dòng phụ và được mô tả đặc điểm thêm. Sau đó, một dòng vô tính từ mỗi tế bào lai, mà giữ được khả năng phản ứng của các tế bào bố mẹ (bằng ELISA), có thể được chọn để tạo ra ngân hàng tế bào, và để làm sạch kháng thể.

Để làm sạch các kháng thể kháng TIGIT, các tế bào lai được chọn có thể được phát triển trong bình quay tròn dung tích hai lít để làm sạch kháng thể đơn dòng. Dịch nổi

có thể được lọc và cô trước khi sắc ký ái lực bằng protein A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). IgG được rửa giải có thể được kiểm tra bằng cách điện di trên gel và sắc ký lỏng hiệu năng cao để bảo đảm độ tinh khiết. Dung dịch đệm có thể được trao đổi trong PBS, và nồng độ này có thể được xác định bằng OD<sub>280</sub> bằng cách sử dụng hệ số tắt 1,43. Các kháng thể đơn dòng có thể được chia phần phân ước và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Để xác định xem các kháng thể đơn dòng kháng TIGIT được chọn có gắn kết với epitop duy nhất hay không, mỗi kháng thể có thể được biotin hóa bằng cách sử dụng chất phản ứng có bán trên thị trường (Pierce, Rockford, IL). Sự gắn kết của MAb được biotin hóa có thể được phát hiện bằng mẫu dò được đánh dấu streptavidin. Các nghiên cứu cạnh tranh sử dụng các kháng thể đơn dòng không được đánh dấu và các kháng thể đơn dòng được biotin hóa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các đĩa ELISA được phủ TIGIT như đã được mô tả trên đây.

Để xác định isotyp của kháng thể đã làm sạch, ELISA isotyp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng đặc hiệu đối với kháng thể có isotyp cụ thể. Ví dụ, để xác định isotyp của kháng thể đơn dòng của người, các lỗ của đĩa vi chuẩn có thể được phủ bằng 1µg/mL kháng globulin miễn dịch của người qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi phong bế bằng 1% BSA, các đĩa được cho phản ứng với các kháng thể đơn dòng thử nghiệm hoặc đối chứng isotyp đã làm sạch với lượng 1µg/mL hoặc nhỏ hơn, ở nhiệt độ môi trường trong một đến hai giờ. Sau đó, các lỗ có thể được cho phản ứng với các mẫu dò được tiếp hợp phosphatase kiềm đặc hiệu IgG1 của người hoặc IgM của người. Các đĩa được để cho phát triển và được phân tích như mô tả trên đây.

Để thử nghiệm sự gắn kết của các kháng thể đơn dòng với các tế bào sống biểu hiện TIGIT, miễn dịch dòng tế bào có thể được sử dụng, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Nói ngắn gọn, các dòng tế bào biểu hiện TIGIT được gắn màng (được phát triển trong các điều kiện sinh trưởng chuẩn) được trộn với các kháng thể đơn dòng ở các nồng độ khác nhau trong PBS chứa 0,1% BSA ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ. Sau khi rửa, các tế bào được cho phản ứng với kháng thể kháng IgG được đánh dấu bằng Phycoerythrin (PE) trong cùng điều kiện như việc nhuộm kháng thể sơ cấp. Các mẫu có thể được phân tích bằng thiết bị FACScan bằng cách sử dụng các đặc tính tán xạ ánh sáng và mặt bên đối với cổng trên các tế bào đơn và sự gắn kết của các kháng thể đã đánh dấu được xác định. Thử nghiệm khác dùng soi kính hiển vi huỳnh quang có thể được sử

dụng (ngoài hoặc thay cho) thử nghiệm miễn dịch dòng tế bào. Các tế bào có thể được nhuộm một cách chính xác như đã được mô tả trên đây và được kiểm tra bằng cách soi kính hiển vi huỳnh quang. Phương pháp này cho phép sự hiện ảnh của các tế bào riêng rẽ, nhưng có thể có độ nhạy giảm tùy thuộc vào mật độ của kháng nguyên.

Các kháng thể kháng TIGIT có thể được thử nghiệm tiếp về khả năng phản ứng với kháng nguyên TIGIT bằng cách thấm tách Tây. Nói ngắn gọn, các phần chiết tế bào từ các tế bào biểu hiện TIGIT có thể được pha chế và đem điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit. Sau khi điện di, các kháng nguyên tách được sẽ được chuyển sang màng nitroxenluloza, được phong bế bằng huyết thanh chuột nhất 20%, và được dò bằng các kháng thể đơn dòng cần được thử nghiệm. Sự gắn kết IgG có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phosphatasa kiềm kháng IgG và được phát triển bằng viên nén cơ chất BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Các phương pháp phân tích ái lực gắn kết, khả năng phản ứng chéo, và động học gắn kết của các kháng thể kháng TIGIT khác nhau bao gồm các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ phân tích Biolayer Interferometry (BLI), và phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) BIACORE<sup>®</sup> bằng thiết bị BIACORE<sup>®</sup> 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Thụy Điển).

Theo một phương án, kháng thể này gắn kết đặc hiệu với vùng ngoại bào của TIGIT của người. Kháng thể này có thể gắn kết đặc hiệu với miền cụ thể (ví dụ, miền chức năng) trong miền ngoại bào của TIGIT. Theo một phương án cụ thể, kháng thể này gắn kết đặc hiệu với vị trí trên TIGIT mà PVR gắn vào. Theo các phương án nhất định, kháng thể này gắn kết đặc hiệu với vùng ngoại bào của TIGIT của người và vùng ngoại bào của TIGIT của khỉ cynomolgus. Tốt hơn là, kháng thể gắn kết với TIGIT của người với ái lực cao.

#### VIII. Phân tử đặc hiệu kép

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử đặc hiệu kép. Kháng thể kháng TIGIT, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có thể thu được từ hoặc được liên kết với một phân tử chức năng khác, ví dụ một peptit hoặc protein khác (ví dụ, một kháng thể khác hoặc phối tử của thụ thể) để tạo ra phân tử đặc hiệu kép gắn với ít nhất hai vị trí gắn kết hoặc phân tử đích khác nhau. Trên thực tế, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể thu được từ hoặc được liên kết

với nhiều hơn một phân tử chức năng khác để tạo ra các phân tử đa đặc hiệu mà gắn kết với nhiều hơn hai vị trí gắn kết và/hoặc phân tử đích khác nhau; các phân tử đa đặc hiệu này cũng được dự định bao gồm trong thuật ngữ “phân tử đặc hiệu kép” như được sử dụng trong bản mô tả này. Để tạo ra phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách ghép cặp hóa học, dung hợp di truyền, liên kết không đồng hóa trị hoặc cách khác) với một hoặc nhiều phân tử gắn kết khác, như một kháng thể khác, mảnh kháng thể, peptit hoặc chất giả gắn kết, sao cho phân tử đặc hiệu kép thu được.

Do đó, được đề xuất trong bản mô tả này là các phân tử đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất đối với TIGIT và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với epitop đích thứ hai. Theo một phương án được mô tả trong bản mô tả này trong đó phân tử đặc hiệu kép là đa đặc hiệu, phân tử này có thể còn bao gồm tính đặc hiệu gắn kết thứ ba.

Theo một phương án, các phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này bao gồm dưới dạng tính đặc hiệu gắn kết ít nhất một kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, chứa, ví dụ Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, hoặc Fv đơn chuỗi. Kháng thể này cũng có thể là dime chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, hoặc mảnh tối thiểu bất kỳ của nó như Fv hoặc cấu trúc đơn chuỗi như được mô tả trong Ladner *et al*, patent Mỹ số 4,946,778, nội dung của nó được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Trong khi các kháng thể đơn dòng của người là được ưu tiên, các kháng thể khác mà có thể được sử dụng trong các phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này là các kháng thể đơn dòng của chuột, khảm và được làm giống như của người.

Các phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách tiếp hợp các tính đặc hiệu gắn kết thành phần bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, mỗi tính đặc hiệu gắn kết của phân tử đặc hiệu kép có thể được tạo ra một cách riêng rẽ và sau đó, được tiếp hợp với nhau. Khi tính đặc hiệu gắn kết là các protein hoặc các peptit, thì nhiều tác nhân ghép cặp hoặc liên kết chéo có thể được sử dụng để tiếp hợp đồng hóa trị. Các ví dụ về các chất liên kết chéo bao gồm protein A, carbodiimite, N-suxinimidyl-S-axetyl-thioaxetat (SATA), 5,5'-dithiobis(axit 2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylendimaleimite (oPDM), N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuxinimidyl 4-(N-maleimidometyl)

xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (xem *ví dụ*, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả trong Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt. No.* 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83), và Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Các chất tiếp hợp được ưu tiên là SATA và sulfo-SMCC, cả hai có thể mua được từ Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Khi tính đặc hiệu gắn kết là các kháng thể, chúng có thể được tiếp hợp thông qua gắn kết sulfhydryl của các vùng bản lề đầu tận cùng C của hai chuỗi nặng. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, vùng bản lề được cải biến để chứa một số lượng dư các gốc sulfhydryl, tốt hơn là một, trước khi tiếp hợp.

Theo cách khác, cả hai tính đặc hiệu gắn kết có thể được mã hóa trong cùng vector và được biểu hiện và được lắp ráp trong cùng tế bào vật chủ. Phương pháp này là đặc biệt hữu ích trong đó phân tử đặc hiệu kép là protein dung hợp mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> hoặc phối tử x Fab. Phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này có thể là phân tử đơn chuỗi chứa một kháng thể đơn chuỗi và yếu tố quyết định gắn kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép đơn chuỗi chứa hai yếu tố quyết định gắn kết. Các phân tử đặc hiệu kép có thể chứa ít nhất hai phân tử đơn chuỗi. Các phương pháp sản xuất các phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong, ví dụ patent Mỹ số 5,260,203; patent Mỹ số 5,455,030; patent Mỹ số 4,881,175; patent Mỹ số 5,132,405; patent Mỹ số 5,091,513; patent Mỹ số 5,476,786; patent Mỹ số 5,013,653; patent Mỹ số 5,258,498; và patent Mỹ số 5,482,858.

Gắn kết của các phân tử đặc hiệu kép với đích đặc hiệu của chúng có thể được xác nhận bằng cách sử dụng các phương pháp đã được công nhận trong lĩnh vực này, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, sự ức chế sinh trưởng), hoặc thử nghiệm thẩm tách Tây. Nói chung, mỗi trong số các thử nghiệm này phát hiện sự có mặt của phức hợp protein-kháng thể được đặc biệt quan tâm bằng cách sử dụng chất phản ứng được đánh dấu (ví dụ, kháng thể) đặc hiệu đối với phức hợp quan tâm.

## IX. Chế phẩm

Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm, ví dụ dược phẩm, chứa các kháng thể kháng TIGIT, hoặc (các) mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, được mô tả trong bản mô tả

này, được bào chế cùng với chất mang được dụng. Các chế phẩm như vậy có thể chứa một hoặc tổ hợp (ví dụ, hai hoặc nhiều loại khác nhau) kháng thể, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch hoặc phân tử đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, được phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa tổ hợp các kháng thể (hoặc thể tiếp hợp miễn dịch hoặc phân tử đặc hiệu kép) mà gắn kết với các epitop khác nhau trên kháng nguyên đích hoặc có hoạt tính bổ sung.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa kháng thể kháng TIGIT ở nồng độ ít nhất là 1mg/mL, 5mg/mL, 10mg/mL, 50mg/mL, 100mg/mL, 150mg/mL, 200mg/mL, hoặc nằm trong khoảng 1-300mg/mL, hoặc 100-300mg/mL.

Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này còn có thể được sử dụng trong phép trị liệu kết hợp, tức là được kết hợp với các chất khác. Ví dụ, phép trị liệu kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này được kết hợp với ít nhất một chất chống ung thư và/hoặc kích thích (ví dụ, hoạt hóa) tế bào T khác. Các ví dụ về các dược chất mà có thể được sử dụng trong phép trị liệu kết hợp được mô tả chi tiết hơn dưới đây trong phần về việc sử dụng các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, chế phẩm trị liệu được bộc lộ trong bản mô tả này có thể chứa các hợp chất, các dược chất, và/hoặc các chất khác được sử dụng để điều trị ung thư. Các hợp chất, các dược chất, và/hoặc các chất này có thể bao gồm, ví dụ dược chất hóa trị liệu, dược chất phân tử nhỏ hoặc các kháng thể mà kích thích đáp ứng miễn dịch với ung thư đã định. Trong một số trường hợp, chế phẩm trị liệu có thể chứa, ví dụ một hoặc nhiều kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng CD40, kháng thể kháng OX40 (còn được gọi là CD134, TNFRSF4, ACT35 và/hoặc TXGP1L), kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng CD73, kháng thể kháng CD137, kháng thể kháng CD27, kháng thể kháng CSF-1R, chất chủ vận TLR, hoặc chất đối kháng phân tử nhỏ của IDO hoặc TGF $\beta$ .

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “chất mang được dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và các chất tương tự mà tương hợp về sinh lý. Tốt hơn là, chất mang này là thích hợp để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, tùy sống hoặc biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Tùy thuộc vào đường dùng, hoạt chất, tức là kháng thể, thể tiếp hợp miễn dịch, hoặc phân tử

đặc hiệu kép, có thể được bao trong nguyên liệu để bảo vệ hợp chất này khỏi tác động của các axit và các điều kiện tự nhiên khác mà có thể làm bất hoạt hợp chất này.

Các dược chất được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều muối dược dụng. “Muối dược dụng” được sử dụng để chỉ muối giữ được hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không mang lại tác dụng gây độc không mong muốn bất kỳ (xem ví dụ, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ví dụ về các muối như vậy bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ. Các muối cộng axit bao gồm các muối có nguồn gốc từ các axit vô cơ không độc, như clo hydric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phospho và các axit tương tự, cũng như từ các axit hữu cơ không độc như axit mono- và dicarboxylic béo, axit alkanoic được thế bởi phenyl, axit hydroxy alkanoic, các axit thơm, các axit sulfonic béo và thơm và các axit tương tự. Các muối cộng bazơ bao gồm các muối có nguồn gốc từ kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và các chất tương tự, cũng như từ các amin hữu cơ không độc, như N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, cloprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, procain và các chất tương tự.

Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này còn có thể chứa chất chống oxy hóa dược dụng. Các ví dụ về các chất chống oxy hóa dược dụng bao gồm: (1) các chất chống oxy hóa tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfit, natri sulfit và các chất tương tự; (2) các chất chống oxy hóa tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol được butyl hóa (BHA), hydroxytoluen được butyl hóa (BHT), lexitin, propyl galat, alpha-tocopherol, và các chất tương tự; và (3) các chất tạo chelat kim loại, như axit xitric, axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA), sorbitol, axit tartric, axit phosphoric, và các chất tương tự.

Các ví dụ về các chất mang thích hợp dạng nước và không phải dạng nước mà có thể được sử dụng trong dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này bao gồm nước, etanol, rượu polyhydric (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và các chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, như dầu oliu, và este hữu cơ dễ tiêu, như etyl oleat. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách sử dụng các nguyên liệu bao như lexitin, nhờ duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt.

Các chế phẩm này cũng có thể chứa các chất bổ trợ như chất bảo quản, chất thẩm ướt, chất nhũ hóa và chất phân tán. Việc ngăn ngừa sự có mặt của các vi sinh vật có thể được bảo đảm cả bằng quá trình tiệt trùng, *nêu trên*, và bằng việc bao gồm các chất kháng khuẩn và chất kháng nấm khác nhau, ví dụ paraben, clobutanol, axit phenol sorbic, và các chất tương tự. Cũng có thể đáng mong muốn khi bao gồm các chất đẳng trương, như đường, natri clorua, và các chất tương tự vào trong chế phẩm này. Ngoài ra, sự hấp thu kéo dài của dạng dược phẩm để tiêm có thể được đem lại bằng cách bao gồm các chất mà làm chậm sự hấp thu như nhôm monostearat và gelatin.

Các chất mang được dụng bao gồm dung dịch hoặc hệ phân tán dạng nước vô trùng và bột vô trùng để pha chế ngay lúc dùng thành các dung dịch hoặc hệ phân tán vô trùng để tiêm. Việc sử dụng các môi trường và các chất này đối với dược chất là đã biết trong lĩnh vực này. Ngoại trừ môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không tương hợp với hoạt chất, còn việc sử dụng chúng trong dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này được bao gồm. Các hoạt chất bổ sung cũng có thể được kết hợp vào chế phẩm này.

Chế phẩm trị liệu thường phải vô trùng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Chế phẩm này có thể được bào chế dưới dạng dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc cấu trúc được sắp xếp khác thích hợp với nồng độ dược chất cao. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ nước, etanol, rượu polyhydric (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và các chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách sử dụng lớp bao như lexitin, nhờ duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, sẽ ưu tiên bao gồm các chất đẳng trương, ví dụ đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong chế phẩm này. Sự hấp thu kéo dài của các chế phẩm để tiêm có thể được đem lại bằng cách bao gồm trong chế phẩm này chất mà làm chậm sự hấp thu, ví dụ các muối monostearat và gelatin.

Các dung dịch vô trùng để tiêm có thể được bào chế bằng cách kết hợp hoạt chất trong một lượng cần thiết dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp các thành phần được nêu trên đây, nếu cần, tiếp theo vi lọc tiệt trùng. Nói chung, hệ phân tán được bào chế bằng cách kết hợp hoạt chất trong chất dẫn vô trùng mà chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác từ các thành phần được nêu trên đây. Trong trường hợp bột vô trùng để pha chế thành các dung dịch vô trùng để tiêm, các phương pháp bào chế

được ưu tiên là sấy chân không và sấy thăng hoa (làm đông khô) mà thu được bột của hoạt chất cùng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch được lọc loại khuẩn nêu trên của nó.

Lượng hoạt chất mà có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi tùy thuộc vào đối tượng cần điều trị, và dạng dùng cụ thể. Lượng hoạt chất mà có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn thường sẽ là lượng chế phẩm mà tạo ra tác dụng trị liệu. Nói chung, trong số một trăm phần trăm, lượng hoạt chất này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 phần trăm đến chín mươi chín phần trăm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 phần trăm đến 70 phần trăm, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1 phần trăm đến 30 phần trăm kết hợp với chất mang được dụng.

Chế độ liều được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng trị liệu). Ví dụ, một liều lớn có thể được sử dụng, một số liều chia có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều này có thể được giảm hoặc tăng tỷ lệ như được chỉ định bởi tình trạng khẩn cấp của trường hợp trị liệu. Đặc biệt có lợi khi bào chế chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thành dạng đơn vị liều để dễ dùng và đồng đều liều. Dạng đơn vị liều được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý phù hợp làm liều đơn nhất cho đối tượng cần điều trị; mỗi đơn vị chứa một lượng hoạt chất định trước được tính để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn cùng với chất mang được dụng cần thiết. Đặc điểm của các dạng đơn vị liều được mô tả trong bản mô tả này được quyết định bởi và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc điểm duy nhất của hoạt chất và tác dụng điều trị bệnh cụ thể cần đạt được, và (b) hạn chế vốn có trong lĩnh vực của hỗn hợp như hoạt chất để điều trị tính miễn cảm ở các đối tượng.

Để dùng kháng thể, các khoảng liều nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 100mg/kg, và thường nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5mg/kg, thể trọng của vật chủ. Ví dụ, các liều có thể là 0,3mg/kg thể trọng, 1mg/kg thể trọng, 3mg/kg thể trọng, 5mg/kg thể trọng hoặc 10mg/kg thể trọng hoặc nằm trong khoảng 1-10mg/kg. Chế độ điều trị được nêu làm ví dụ đòi hỏi dùng mỗi tuần một lần, mỗi hai tuần một lần, mỗi ba tuần một lần, mỗi bốn tuần một lần, mỗi tháng một lần, mỗi 3 tháng một lần hoặc mỗi ba đến 6 tháng một lần. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế được sử dụng mỗi hai tuần. Chế độ liều được ưu tiên khác đối với kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này bao gồm 1mg/kg, 3mg/kg hoặc 5mg/kg thể trọng thông qua việc dùng trong tĩnh mạch, với kháng thể được cho bằng cách sử dụng một trong số các phác

đồ dùng liều sau: (i) mỗi bốn tuần cho sáu liều, sau đó mỗi ba tháng; (ii) mỗi ba tuần; (iii) 3mg/kg thể trọng một lần tiếp theo 1mg/kg thể trọng mỗi ba tuần.

Trong một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu gắn kết khác nhau được sử dụng đồng thời, trong trường hợp đó, liều của mỗi kháng thể được sử dụng nằm trong các khoảng được chỉ định. Kháng thể trị liệu thường được sử dụng dựa vào nhiều lý do. Các khoảng giữa các liều đơn có thể là, ví dụ hằng tuần, hằng tháng, mỗi ba tháng hoặc hằng năm. Các khoảng cũng có thể không đều như được chỉ ra bằng cách đo hàm lượng trong máu của kháng thể với kháng nguyên đích trong đối tượng bị bệnh. Trong một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương nằm trong khoảng 1-1000  $\mu\text{g/mL}$  và trong một số phương pháp, nồng độ này nằm trong khoảng 25-300  $\mu\text{g/mL}$ .

Kháng thể có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm giải phóng kéo dài, trong trường hợp này chỉ cần dùng ít thường xuyên hơn. Liều và tần suất thay đổi tùy thuộc vào thời gian bán thải của kháng thể trong đối tượng bị bệnh. Nói chung, kháng thể của người thể hiện thời gian bán thải dài nhất, tiếp theo là kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, và kháng thể không phải của người. Liều và tần suất dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào xem việc điều trị là phòng bệnh hoặc trị liệu. Trong các ứng dụng phòng bệnh, liều lượng tương đối thấp được sử dụng ở các khoảng tương đối không thường xuyên trong một khoảng thời gian dài. Một số đối tượng bị bệnh tiếp tục nhận việc điều trị trong phần đời còn lại của họ. Trong các ứng dụng trị liệu, liều lượng tương đối cao ở các khoảng tương đối ngắn đôi khi là cần thiết cho đến khi tiến triển của bệnh được giảm hoặc được làm kết thúc, và tốt hơn là cho đến khi đối tượng bị bệnh thể hiện sự thuyên giảm một phần hoặc hoàn toàn các triệu chứng của bệnh. Sau đó, đối tượng bị bệnh này có thể tùy ý được sử dụng chế độ phòng bệnh, mặc dù trong nhiều chỉ định miễn dịch ung thư, việc điều trị tiếp tục là không cần thiết.

Mức liều thực tế của các hoạt chất trong dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được thay đổi sao cho thu được một lượng hoạt chất mà có hiệu quả để đạt được đáp ứng trị liệu mong muốn đối với đối tượng bị bệnh, chế phẩm, và phương thức dùng cụ thể, mà không gây độc cho đối tượng bị bệnh. Mức liều được chọn sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng, hoặc este, muối hoặc amit của nó, đường dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể được sử dụng, thời gian điều trị, các dược chất,

hợp chất và/hoặc nguyên liệu khác được sử dụng kết hợp với chế phẩm cụ thể được sử dụng, tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe tổng quát và tiền sử bệnh trước đây của đối tượng bị bệnh cần điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y học.

“Liệu có hiệu quả điều trị bệnh” của kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này tốt hơn là dẫn đến làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, làm tăng tần suất và thời gian của các giai đoạn không có triệu chứng bệnh, hoặc phòng ngừa sự suy yếu hoặc khuyết tật do đau bệnh. Trong trường hợp ung thư, liệu có hiệu quả điều trị bệnh tốt hơn là ngăn ngừa được sự suy giảm hơn nữa các triệu chứng thể chất liên quan đến ung thư. Các triệu chứng của ung thư là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ dấu hiệu nốt ruồi không bình thường, thay đổi sự xuất hiện của nốt ruồi, bao gồm tính không đối xứng, bờ, màu sắc và/hoặc đường kính, vùng da có màu mới, nốt ruồi bất thường, vùng tối màu dưới móng, cục ở vú, thay đổi ở núm vú, u nang vú, đau vú, chết, giảm cân, yếu, mệt mỏi quá mức, ăn khó, chán ăn, ho mạn tính, khả năng nín thở kém hơn, ho ra máu, máu trong nước tiểu, máu trong phân, buồn nôn, nôn, di căn gan, di căn phổi, di căn xương, đầy bụng, sinh bụng, dịch trong khoang màng bụng, chảy máu âm đạo, táo bón, trướng bụng, thủng kết tràng, bệnh viêm màng bụng cấp tính (nhiễm trùng, sốt, đau), đau, nôn ra máu, đổ mồ hôi nhiều, sốt, huyết áp cao, thiếu máu, tiêu chảy, vàng da, chóng mặt, ớn lạnh, co cứng cơ, di căn kết tràng, di căn phổi, di căn bàng quang, di căn gan, di căn xương, di căn thận, và di căn tụy, nuốt khó, và các triệu chứng tương tự. Hiệu quả trị liệu có thể quan sát thấy ngay sau lần dùng đầu tiên của mAb kháng huTIGIT theo sáng chế, hoặc có thể chỉ quan sát thấy sau một khoảng thời gian và/hoặc một chuỗi liệu. Hiệu quả chậm này chỉ có thể quan sát thấy sau vài tháng điều trị, tối đa 6, 9 hoặc 12 tháng. Sẽ nghiêm trọng khi không quyết định sớm rằng mAb kháng huTIGIT theo sáng chế không có hiệu quả điều trị bệnh khi xem xét hiệu quả chậm được thể hiện bởi một số chất miễn dịch ung thư.

Liệu có hiệu quả điều trị bệnh có thể phòng ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát ung thư, như có thể mong muốn khi các dấu hiệu sớm hoặc sơ bộ của bệnh được biểu hiện. Các xét nghiệm được sử dụng trong chẩn đoán ung thư bao gồm hóa học (bao gồm phép đo hàm lượng TIGIT), huyết học, huyết thanh học và công nghệ x quang. Do đó, thử nghiệm lâm sàng hoặc sinh hóa bất kỳ mà giám sát yếu tố bất kỳ nêu trên có thể được sử dụng để xác định xem việc điều trị cụ thể có là liệu có hiệu quả điều trị bệnh để điều trị ung thư hay không. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ có thể xác định các

lượng này dựa trên các yếu tố như kích thước cơ thể của đối tượng, mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng của đối tượng, và chế phẩm cụ thể hoặc đường dùng được chọn.

Chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng thông qua một hoặc nhiều đường dùng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng đường dùng và/hoặc phương thức dùng sẽ thay đổi tùy thuộc vào các kết quả mong muốn. Các đường dùng được ưu tiên đối với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này bao gồm đường dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng, dưới da, xương sống hoặc các đường dùng ngoài đường tiêu hóa khác, ví dụ bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ “dùng ngoài đường tiêu hóa” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là các dạng dùng không phải là dùng trong ruột và tại chỗ, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm và tiêm truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạc, trong bao, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, gây tê ngoài màng cứng và trong xương ức.

Theo cách khác, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng thông qua đường không phải ngoài đường tiêu hóa, như đường dùng tại chỗ, biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ dùng trong mũi, qua đường miệng, qua âm đạo, qua trực tràng, dưới lưỡi hoặc tại chỗ.

Các hoạt chất này có thể được bào chế với các chất mang mà sẽ bảo vệ hợp chất khỏi sự giải phóng nhanh, như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm chế phẩm cấy, miếng dán qua da, và các hệ phân phối được kết vi nang. Polyme tương hợp sinh học, dễ phân huỷ sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp bào chế các dạng chế phẩm này được cấp bằng hoặc nói chung là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Chế phẩm trị liệu có thể được sử dụng bằng các dụng cụ y tế đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm trị liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng bằng dụng cụ tiêm qua da không dùng kim, như các dụng cụ được bộc lộ trong patent Mỹ các số 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413;

4,941,880; 4,790,824; hoặc 4,596,556. Các ví dụ về dụng cụ cấy dưới da và các mô đun đã biết để sử dụng với các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này bao gồm: patent Mỹ số 4,487,603, mà bộ lọc bơm vi truyền có thể cấy dưới da được để phân phối thuốc ở mức có kiểm soát; patent Mỹ số 4,486,194, mà bộ lọc dụng cụ trị liệu để dùng thuốc qua da; patent Mỹ số 4,447,233, mà bộ lọc bơm truyền thuốc để phân phối thuốc ở mức độ truyền chính xác; patent Mỹ số 4,447,224, mà bộ lọc thiết bị truyền có thể cấy dưới da chảy được biến đổi để phân phối thuốc liên tục; patent Mỹ số 4,439,196, mà bộ lọc hệ phân phối thuốc thẩm thấu có nhiều ngăn; và patent Mỹ số 4,475,196, mà bộ lọc hệ phân phối thuốc thẩm thấu. Các patent này được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Nhiều dụng cụ cấy dưới da, hệ phân phối, và mô đun khác như vậy là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được bào chế để bảo đảm sự phân bố *in vivo* chính xác. Ví dụ, hàng rào máu-não (blood-brain barrier - BBB) ngăn chặn nhiều hợp chất ưa nước cao. Để bảo đảm rằng các hợp dược chất được mô tả trong bản mô tả này đi qua BBB (nếu muốn), chúng có thể được bào chế, ví dụ trong liposom. Đối với các phương pháp sản xuất liposom, xem, ví dụ các patent Mỹ 4,522,811; 5,374,548; và 5,399,331. Liposom có thể chứa một hoặc nhiều nhóm mà được vận chuyển chọn lọc vào các tế bào hoặc các cơ quan cụ thể, do đó tăng cường sự phân phối thuốc hướng đích (xem, ví dụ V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Các nhóm hướng đích làm ví dụ bao gồm folat hoặc biotin (xem, ví dụ patent Mỹ số 5,416,016 của Low *et al.*); mannosit (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); các kháng thể (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); thụ thể protein A hoạt động bề mặt (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); cũng xem K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

#### X. Sử dụng và phương pháp

Các kháng thể, chế phẩm chứa kháng thể và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có nhiều ích lợi *in vitro* và *in vivo* bao gồm, ví dụ sự tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng cách phong bế việc truyền tín hiệu TIGIT, hoặc sự phát hiện TIGIT. Theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là các kháng thể của người hoặc được làm giống như của người. Ví dụ, các kháng thể kháng TIGIT

được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho các tế bào trong môi trường nuôi cấy, *in vitro* hoặc *ex vivo*, hoặc cho người, ví dụ *in vivo*, để tăng cường tính miễn dịch trong nhiều bệnh. Do đó, sáng chế mô tả các phương pháp biến đổi đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, được mô tả trong bản mô tả này sao cho đáp ứng miễn dịch ở đối tượng được tăng cường, được kích thích hoặc điều chỉnh lên.

Các đối tượng được ưu tiên bao gồm đối tượng bị bệnh mà sự tăng cường đáp ứng miễn dịch ở người đó sẽ đáng mong muốn. Các phương pháp này đặc biệt thích hợp để điều trị đối tượng bị bệnh có rối loạn mà có thể được điều trị bằng cách gia tăng đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng miễn dịch gián tiếp qua tế bào T). Theo một phương án cụ thể, các phương pháp này đặc biệt thích hợp để điều trị ung thư *in vivo*. Để đạt được sự tăng cường miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên, các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng kết hợp với kháng nguyên cần quan tâm hoặc kháng nguyên này có thể đã có mặt trong đối tượng cần điều trị (ví dụ, đối tượng mang khối u hoặc mang virus). Khi các kháng thể đối với TIGIT được sử dụng kết hợp với một chất khác, thì hai chất này có thể được sử dụng một cách riêng rẽ hoặc đồng thời.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phát hiện sự có mặt của kháng nguyên TIGIT của người trong mẫu, hoặc đo lượng kháng nguyên TIGIT của người, bao gồm bước cho mẫu này, và mẫu đối chứng, tiếp xúc với kháng thể đơn dòng của người, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với TIGIT của người, trong các điều kiện cho phép sản sinh phức hợp giữa kháng thể hoặc mảnh của nó và TIGIT của người. Sau đó, phức hợp tạo ra được phát hiện, trong đó sự khác biệt của phức hợp tạo ra giữa mẫu so với mẫu đối chứng biểu thị sự có mặt của kháng nguyên TIGIT của người trong mẫu. Ngoài ra, các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để làm sạch TIGIT của người thông qua việc làm sạch bằng ái lực miễn dịch.

Dựa vào khả năng của các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này để phong bế sự ức chế hoặc sự đồng ức chế các đáp ứng tế bào T, ví dụ đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, sáng chế mô tả các phương pháp sử dụng *in vitro* và *in vivo* kháng thể được mô tả trong bản mô tả này để kích thích, tăng cường hoặc điều chỉnh tăng đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, ví dụ đáp ứng tế bào T kháng khối u. Theo các phương án nhất định, sự kích thích CD3 cũng được mô tả (ví dụ, bằng cách ủ đồng thời với tế bào biểu hiện màng CD3), sự kích thích này có thể được tạo ra đồng thời,

trước, hoặc sau khi điều trị bằng kháng thể kháng TIGIT. Ví dụ, được đề xuất trong bản mô tả này là các phương pháp tăng cường đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên bao gồm việc cho tế bào T này tiếp xúc với kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này, và tùy ý với CD3, sao cho đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được tăng cường, ví dụ bằng cách loại bỏ tác dụng ức chế gián tiếp qua TIGIT. Chỉ thị thích hợp bất kỳ của đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên có thể được sử dụng để đánh giá đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên. Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về các chỉ thị thích hợp này bao gồm tăng mức tăng sinh tế bào T với sự có mặt của kháng thể và/hoặc tăng sản sinh xytokin với sự có mặt của kháng thể. Theo một phương án được ưu tiên, việc sản sinh interleukin-2 và/hoặc interferon- $\gamma$  bởi tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được tăng cường.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên) ở đối tượng bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này cho đối tượng sao cho đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên) ở đối tượng được tăng cường. Theo một phương án được ưu tiên, đối tượng này là đối tượng mang khối u và đáp ứng miễn dịch chống khối u được tăng cường. Khối u có thể là khối u rắn hoặc khối u lỏng, ví dụ bệnh lý huyết học ác tính. Theo các phương án nhất định, khối u là khối u sinh miễn dịch. Theo các phương án nhất định, khối u không sinh miễn dịch. Theo các phương án nhất định, khối u dương tính với PD-L1. Theo các phương án nhất định, khối u âm tính với PD-L1. Đối tượng cũng có thể là đối tượng mang virus và đáp ứng miễn dịch chống virus được tăng cường.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế sự sinh trưởng của tế bào khối u ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này sao cho sự sinh trưởng của khối u được ức chế ở đối tượng này. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus mạn tính ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này sao cho bệnh nhiễm virus mạn tính được điều trị ở đối tượng này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm suy kiệt các tế bào  $T_{reg}$  từ vi môi trường khối u của đối tượng có khối u, ví dụ khối u ung thư, bao gồm việc cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị bệnh kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này mà chứa Fc kích thích sự làm suy kiệt của các tế bào  $T_{reg}$  trong vi môi trường

khối u. Fc có thể là, ví dụ Fc có chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hiệu ứng được tăng cường, như gắn kết hoặc có sự gắn kết tăng cường với một hoặc nhiều thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án được ưu tiên, sự làm suy kiệt  $T_{reg}$  xảy ra mà không làm suy kiệt hoặc ức chế đáng kể  $T_{eff}$  trong vi môi trường khối u, và mà không làm suy kiệt hoặc ức chế đáng kể các tế bào  $T_{eff}$  và các tế bào  $T_{reg}$  bên ngoài vi môi trường khối u. Theo các phương án nhất định, đối tượng có lượng TIGIT cao hơn trên các tế bào  $T_{reg}$  so với trên các tế bào  $T_{eff}$ , ví dụ trong vi môi trường khối u. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TIGIT có thể làm suy kiệt Tregs trong các khối u và/hoặc Tregs trong các tế bào limphô thâm nhiễm khối u (tumor infiltrating lymphocyte - TIL). Ví dụ, ở mô hình khối u CT26, kháng thể kháng TIGIT của chuột nhắt được định dạng dưới dạng IgG2a của chuột nhắt (mà biểu hiện chức năng hiệu ứng) được làm suy kiệt một phần cả hai tế bào  $T_{reg}$  và  $T CD8^+$ , nhưng không làm suy kiệt các tế bào  $T CD4^+$ . Kháng thể kháng TIGIT đối tác không hiệu ứng, được định dạng dưới dạng IgG1 của chuột nhắt D265A, không làm suy kiệt các tế bào T. Khi xem xét xem có sử dụng kháng thể kháng TIGIT có chức năng hiệu ứng hoặc không hiệu ứng hay không thì phải cân nhắc đến sự cân bằng giữa mức độ làm suy kiệt  $T_{regs}$ , mà có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng khối u, và mức độ làm suy kiệt các tế bào  $T CD8^+$ , mà sẽ làm mất một số tế bào cần thiết để làm chết thực sự các tế bào khối u. Mặc dù việc làm suy kiệt  $T_{regs}$  có thể kỳ vọng để tăng cường hoạt tính kháng khối u, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng sự nổi TIGIT trên  $TIGIT^+ T_{regs}$  thúc đẩy sự ức chế tăng sinh tế bào  $T_{eff}$  gián tiếp qua tế bào  $T_{reg}$  (Joller *et al.* (2014) *Immunity* 40:569), gợi ý rằng việc phong bế truyền tín hiệu TIGIT (ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể kháng TIGIT đối kháng theo sáng chế) có thể cũng tăng cường hoạt tính kháng khối u. Do đó, có thể có hiệu quả nhất khi sử dụng kháng thể kháng TIGIT đối kháng không có chức năng hiệu ứng, mà i) phong bế việc truyền tín hiệu TIGIT trong  $T_{regs}$  do đó làm giảm hoạt tính ức chế miễn dịch của chúng, ii) hoạt hóa các tế bào  $T CD8^+$  kháng khối u bằng cách phong bế tác dụng ức chế của TIGIT, trong khi đồng thời tránh sự làm suy kiệt gián tiếp qua chức năng hiệu ứng của chúng, và iii) tăng cường sự hoạt hóa gián tiếp qua DNAM bằng cách cho phép DNAM gắn kết với PVR mà nếu không đã được gắn kết bởi TIGIT (và bằng cách làm giảm sự tương tác TIGIT-DNAM trực tiếp) (Johnston *et al.* (2014) *Cancer Cell* 26:923).

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TIGIT được sử dụng cho đối tượng dưới dạng phép trị liệu bổ sung. Việc điều trị các đối tượng có ung thư bằng kháng

thể kháng TIGIT có thể dẫn đến đáp ứng lâu bền trong thời gian dài so với thuốc điều trị chuẩn hiện tại; thời gian sống dài trong ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 10 năm hoặc lâu hơn, thời gian sống không tái phát trong ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 10 năm hoặc lâu hơn. Theo các phương án nhất định, việc điều trị đối tượng có ung thư bằng kháng thể kháng TIGIT ngăn ngừa sự tái phát của ung thư hoặc làm chậm sự tái phát của ung thư đến, ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 10 năm hoặc lâu hơn. Việc điều trị kháng TIGIT có thể được sử dụng dưới dạng hàng điều trị thứ nhất hoặc thứ hai.

Các phương pháp này và các phương pháp khác được mô tả trong bản mô tả này được bàn luận chi tiết hơn dưới đây.

### Ung thư

Sự phong bế truyền tín hiệu PVR/Nectin-2 thông qua TIGIT bởi các kháng thể kháng TIGIT có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với các tế bào ung thư ở đối tượng bị bệnh. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị đối tượng có ung thư, bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này, sao cho đối tượng này được điều trị, ví dụ sao cho sự sinh trưởng của khối u ung thư được ức chế hoặc được làm giảm và/hoặc khối u thoái lui. Kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng riêng rẽ để ức chế sự sinh trưởng của khối u ung thư. Theo cách khác, kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng kết hợp với một chất khác, ví dụ các chất sinh miễn dịch khác, các biện pháp điều trị bệnh ung thư chuẩn, hoặc các kháng thể khác, như được mô tả dưới đây. Sự kết hợp với chất ức chế PD-1, như kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1, cũng được đề xuất.

Do đó, sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị ung thư, ví dụ bằng cách ức chế sự sinh trưởng của các tế bào khối u, ở đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị bệnh của kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ 15A6, 22G2, 11G11 hoặc 10D7, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Kháng thể này có thể là kháng thể kháng TIGIT của người (như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng huTIGIT của người được mô tả trong bản mô tả này), hoặc nó có thể là kháng thể kháng huTIGIT khảm hoặc kháng thể kháng huTIGIT không phải của người được làm giống như của người, ví dụ kháng thể kháng TIGIT khảm hoặc được làm giống như của người mà cạnh tranh để gắn kết với, hoặc gắn kết với cùng epitop như, ít nhất một trong số các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này.

Ung thư mà sự sinh trưởng của nó có thể được ức chế bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm ung thư thường đáp ứng với phép trị liệu miễn dịch. Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về các loại ung thư để điều trị bao gồm ung thư biểu mô tế bào hình vảy, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC) hình vảy, không NSCLC, u thần kinh đệm, bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào sáng), bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào thận (renal cell carcinoma - RCC)), bệnh ung thư tuyến tiền liệt (ví dụ, ung thư biểu mô tuyến tuyến tiền liệt khó chữa bằng hormon), ung thư tuyến giáp, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư tuyến tụy, u nguyên bào xóp (u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng), bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư bàng quang, u gan, bệnh ung thư vú, ung thư biểu mô kết tràng, và bệnh ung thư (hoặc ung thư biểu mô) đầu và cổ, bệnh ung thư dạ dày, khối u tế bào mầm, sacom nhi khoa, tình trạng giết tự nhiên xoang mũi, u melanin (ví dụ, u melanin ác tính di căn, như u melanin ác tính da hoặc trong mắt), bệnh ung thư xương, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư tinh hoàn, ung thư biểu mô ống dẫn trứng, ung thư biểu mô nội mạc tử cung, ung thư biểu mô cổ tử cung, ung thư biểu mô âm đạo, ung thư biểu mô âm hộ, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacom mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, khối u rắn thời thơ ấu, bệnh ung thư niệu quản, ung thư biểu mô bể thận, khối u của hệ thần kinh trung ương (CNS), u limphô CNS nguyên phát, sự tạo mạch khối u, khối u cột sống, u thần kinh đệm thân não, u tuyến yên, sacom Kaposi, bệnh ung thư dạng biểu bì, bệnh ung thư tế bào hình vảy, u limphô tế bào T, bệnh ung thư do môi trường sống gây ra bao gồm bệnh ung thư do amiăng gây ra, bệnh ung thư liên quan đến virus (ví dụ, khối u liên quan đến virus gây u nhú ở người (HPV)), và bệnh máu ác tính có nguồn gốc từ mỗi trong số hai dòng tế bào máu chính <http://en.wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis>, tức là <http://en.wikipedia.org/wiki/Myeloid> dòng tế bào dạng tủy (mà sản sinh bạch cầu hạt, hồng cầu, tiểu huyết cầu, đại thực bào và dưỡng bào) hoặc <http://en.wikipedia.org/wiki/Lymphoid> dòng tế bào dạng bạch huyết (mà sản sinh các tế bào B, T, NK và tế bào trong huyết tương), như tất cả các loại bệnh bạch cầu, u limphô, và u tủy, ví dụ bệnh bạch cầu cấp tính, mạn tính, limphô và/hoặc tủy,

như bệnh bạch cầu cấp tính (acute leukemia - ALL), bệnh bạch cầu tủy cấp tính (acute myelogenous leukemia - AML), bệnh bạch cầu limphô mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL), và bệnh bạch cầu tủy mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), AML chưa được biệt hóa (M0), bệnh bạch cầu nguyên tủy bào (M1), bệnh bạch cầu nguyên tủy bào (M2; có sự trưởng thành tế bào), bệnh bạch cầu tiền tủy bào (M3 hoặc biến thể M3 [M3V]), bệnh bạch cầu đơn nhân tủy (M4 hoặc biến thể M4 có sự tăng bạch cầu ưa eosin [M4E]), bệnh bạch cầu đơn nhân (M5), bệnh tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên tủy bào (M6), bệnh bạch cầu nguyên bào nhân khổng lồ (M7), sacom bạch cầu hạt tách biệt, và u lỵ; u limphô, như u limphô Hodgkin (Hodgkin's lymphoma - HL), u limphô không Hodgkin (non-Hodgkin's lymphoma - NHL), u limphô tế bào B, u limphô tế bào T, u limphô dạng tương bào-limphô, u limphô tế bào B dạng bạch cầu đơn nhân, u limphô mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc (mucosa-associated lymphoid tissue - MALT), u limphô tế bào lớn đặc biệt ác tính (ví dụ, Ki 1+), u limphô tế bào T/bệnh bạch cầu trưởng thành, u limphô tế bào vỏ, u limphô tế bào T nguyên bào miễn dịch mạch máu, u limphô tâm mạch, u limphô tế bào T ruột, u limphô tế bào B trung thất nguyên phát, u limphô nguyên bào limphô T tiền chất, nguyên bào limphô T; và u limphô/bệnh bạch cầu (T-Lbly/T-ALL), u limphô tế bào T ngoại biên, u limphô nguyên bào limphô, rối loạn tăng sinh limphô sau ghép cơ quan, u limphô mô bào thực sự, u limphô hệ thần kinh trung ương nguyên phát, u limphô lan tỏa nguyên phát, u limphô nguyên bào limphô (lymphoblastic lymphoma - LBL), các khối u tạo máu của dòng tế bào limphô, bệnh bạch cầu nguyên bào limphô cấp, u limphô tế bào B lớn lan tỏa, u limphô Burkitt, u limphô dạng nang, u limphô mô bào lan tỏa (diffuse histiocytic lymphoma - DHL), u limphô tế bào lớn nguyên bào miễn dịch, u limphô nguyên bào limphô B tiền chất, u limphô tế bào T trên da (cutaneous T-cell lymphoma - CTCL) (còn được gọi là u sùi dạng nấm hoặc hội chứng Sezary), và u limphô dạng tương bào-limphô (lymphoplasmacytoid lymphoma - LPL) có macroglobulin huyết Waldenstrom; u tủy, như u tủy IgG, u tủy chuỗi nhẹ, u tủy không tiết, u tủy không triệu chứng (còn được gọi là u tủy không đau), u tương bào đơn độc, và bệnh đa u tủy, bệnh bạch cầu limphô mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL), u limphô tế bào lông; khối u tạo máu của dòng tế bào tủy, khối u có nguồn gốc trung mô, bao gồm sacom sợi và sacom cơ vân; u tinh, ung thư biểu mô quai, khối u của thần kinh trung ương và ngoại biên, bao gồm u tế bào hình sao, u bao sợi thần kinh; khối u có nguồn gốc trung mô, bao gồm sacom sợi,

sacrom cơ vân, và sacrom xương; và các khối u khác, bao gồm u melanin, bệnh khô da nhiễm sắc tố, u gai sừng, u tinh, bệnh ung thư nang tuyến giáp và ung thư biểu mô quai, các khối u tạo máu của dòng tế bào lymphô, ví dụ các khối u của tế bào T và tế bào B, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, rối loạn tế bào T như bệnh bạch cầu tiền lymphô T (T-prolymphocytic leukemia - T-PLL), bao gồm loại tế bào nhỏ và tế bào dạng não; bệnh bạch cầu tế bào lymphô hạt lớn (large granular lymphocyte leukemia - LGL) tốt hơn là loại tế bào T; u lymphô gan lá lách a/d T-NHL; u lymphô tế bào T chín/ngoại biên (các tiểu loại đa hình và nguyên bào miễn dịch); u lymphô tế bào T tâm mạch (mũi); bệnh ung thư đầu hoặc cổ, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư tuyến giáp; u lymphô dạng tủy cấp, cũng như tổ hợp bất kỳ của các loại ung thư này. Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để điều trị ung thư di căn, ung thư khó chữa (ví dụ, ung thư khó chữa bằng phép trị liệu miễn dịch trước đây, ví dụ bằng kháng thể CTLA-4 hoặc PD-1 phong bế), và ung thư tái diễn.

Kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng dưới dạng phép trị liệu đơn trị, hoặc dưới dạng phép trị liệu kích thích miễn dịch duy nhất, hoặc nó có thể được kết hợp với chất sinh miễn dịch, như các tế bào ung thư, các kháng nguyên khối u được làm sạch (bao gồm các protein, các peptit, và các phân tử hydrat cacbon tái tổ hợp), hoặc các tế bào được chuyển nạp bằng các gen mã hóa các xytokin kích thích miễn dịch, trong chiến lược vaccin ung thư (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về các vaccin từ khối u có thể được sử dụng bao gồm các peptit của kháng nguyên của u melanin, như các peptit của gp100, kháng nguyên MAGE, Trp-2, MART1 và/hoặc tyrosinaza, hoặc tế bào khối u được chuyển nạp để biểu hiện xytokin GM-CSF.

Nhiều phương pháp thử nghiệm để chủng ngừa chống khối u đã được bộc lộ (xem Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; cũng xem Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita *et al.* (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition). Theo một trong số các phương pháp này, vaccin được bào chế bằng cách sử dụng các tế bào khối u tự thân hoặc dị sinh. Các vaccin chứa tế bào này đã được thể hiện là rất hiệu quả khi các tế bào khối u này được tải nạp để biểu hiện GM-CSF. GM-

CSF đã được thể hiện là chất hoạt hóa sự trình diện kháng nguyên có hiệu lực đối với việc chủng ngừa khối u (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).

Nghiên cứu biểu hiện gen và các mô hình biểu hiện gen quy mô lớn trong các khối u khác nhau đã đưa đến khái niệm được gọi là kháng nguyên đặc hiệu khối u (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). Trong nhiều trường hợp, các kháng nguyên đặc hiệu khối u này là các kháng nguyên biệt hóa được biểu hiện trong khối u và trong tế bào mà từ đó khối u xuất hiện, ví dụ kháng nguyên tế bào hắc tố gp100, kháng nguyên MAGE, và Trp-2. Quan trọng hơn, nhiều trong số các kháng nguyên này có thể được thể hiện là đích của tế bào T đặc hiệu khối u được tìm thấy trong vật chủ. Việc ức chế TIGIT có thể được sử dụng kết hợp với việc thu các protein tái tổ hợp và/hoặc các peptit được biểu hiện trong khối u để tạo ra đáp ứng miễn dịch với các protein này. Các protein này thường được hệ miễn dịch cho là các tự kháng nguyên và do đó, hệ miễn dịch dung nạp được chúng. Kháng nguyên của khối u có thể bao gồm protein telomerase, cần để tổng hợp điểm cuối của nhiễm sắc thể và được biểu diễn trong nhiều hơn 85% bệnh ung thư của người và chỉ trong một số lượng giới hạn mô sinh dưỡng (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). Kháng nguyên của khối u cũng có thể là “các kháng nguyên tân tạo” được biểu hiện trong tế bào ung thư do các đột biến sinh dưỡng làm thay đổi trình tự protein hoặc tạo ra protein dung hợp giữa hai trình tự không liên quan (tức là bcr-abl trong nhiễm sắc thể Philadelphia), hoặc kiểu gen cá thể từ khối u của tế bào B.

Các vaccin chống khối u khác có thể bao gồm các protein từ virus liên quan đến bệnh ung thư của người như virus gây u nhú ở người (Human Papilloma Virus- HPV), virus gây bệnh viêm gan (HBV và HCV) và virus Herpes liên quan đến bệnh sarcoma Kaposi (Kaposi's Herpes Sarcoma Virus - KHSV). Một dạng khác của kháng nguyên đặc hiệu khối u mà có thể được sử dụng kết hợp với việc ức chế TIGIT là protein sốc nhiệt (heat shock protein - HSP) làm sạch được phân lập từ chính mô khối u. Các protein sốc nhiệt này chứa các mảnh protein từ các tế bào khối u và các HSP này có hiệu quả phân phối cao đến các tế bào trình diện kháng nguyên để gây ra sự miễn dịch khối u (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).

Các tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC) là tế bào trình diện kháng nguyên có hiệu lực có thể được sử dụng để môi các đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên. Các DC có thể được sản sinh *ex vivo* và được nạp bởi các kháng nguyên protein và peptit khác nhau cũng như dịch chiết tế bào khối u (Nestle *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Các DC cũng

có thể được tải nạp bằng cách di truyền để biểu hiện các kháng nguyên của khối u. Các DC cũng được dung hợp trực tiếp với các tế bào khối u nhằm mục đích gây miễn dịch (Kugler *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Là phương pháp chủng ngừa, việc gây miễn dịch bằng DC có thể được kết hợp hiệu quả với việc phong bế TIGIT để hoạt hóa (mở) các đáp ứng chống khối u có hiệu lực hơn.

Sự ức chế TIGIT cũng có thể được kết hợp với biện pháp điều trị ung thư chuẩn (ví dụ, phẫu thuật, chiếu xạ, và hóa trị liệu). Việc ức chế TIGIT có thể được kết hợp hiệu quả với chế độ hóa trị liệu. Trong các trường hợp này, có thể giảm liều của chất hóa trị liệu được sử dụng (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Ví dụ về kết hợp như vậy là kháng thể kháng TIGIT kết hợp với decarbazine để điều trị u melanin. Một ví dụ khác về kết hợp như vậy là kháng thể kháng TIGIT kết hợp với interleukin-2 (IL-2) để điều trị u melanin. Cơ sở khoa học hợp lý đằng sau việc sử dụng kết hợp việc ức chế TIGIT và hóa trị liệu là sự chết tế bào, là kết quả của tác động gây độc tế bào của hầu hết các hợp chất hóa trị liệu, sẽ dẫn đến tăng mức kháng nguyên của khối u trong quá trình trình diện kháng nguyên. Các phép trị liệu kết hợp khác có thể dẫn đến tác dụng hiệp đồng với việc ức chế TIGIT thông qua sự chết tế bào là việc chiếu xạ, phẫu thuật, và ức chế hormon. Mỗi trong số các quá trình này tạo ra nguồn kháng nguyên của khối u trong vật chủ. Các chất ức chế sự tạo mạch cũng có thể được kết hợp với việc ức chế TIGIT. Việc ức chế sự tạo mạch dẫn đến chết tế bào khối u, điều này có thể cung cấp kháng nguyên của khối u cho quá trình trình diện kháng nguyên của vật chủ.

Các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể đặc hiệu kép hướng đích các tế bào hiệu ứng biểu hiện thụ thể Fc $\alpha$  hoặc Fc $\gamma$  đến các tế bào khối u (xem, ví dụ patent Mỹ các số 5,922,845 và 5,837,243). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng hướng đích hai kháng nguyên riêng rẽ. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép của kháng nguyên kháng thụ thể Fc/kháng khối u (ví dụ, Her-2/neu) đã được sử dụng để hướng đích đại thực bào đến vị trí của khối u. Việc hướng đích này có thể hoạt hóa các đáp ứng đặc hiệu khối u hiệu quả hơn. Nhánh tế bào T của các đáp ứng này sẽ được tăng nhờ việc sử dụng ức chế TIGIT. Theo cách khác, kháng nguyên có thể được phân phối trực tiếp đến các DC bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu kép gắn với kháng nguyên của khối u và chất đánh dấu bề mặt tế bào đặc hiệu với tế bào đuôi gai.

Khối u tránh sự giám sát miễn dịch của vật chủ bằng nhiều cơ chế. Nhiều trong số các cơ chế này có thể chiến thắng bằng cách làm bất hoạt các protein ức chế miễn dịch được biểu hiện bởi khối u. Các cơ chế này bao gồm, trong số các cơ chế khác, TGF- $\beta$  (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), và phối tử Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Các kháng thể đối với mỗi trong số các chất này có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT để chống lại tác dụng của chất ức chế miễn dịch và làm thuận lợi cho đáp ứng miễn dịch khối u bởi vật chủ.

Các kháng thể khác mà hoạt hóa đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT. Các kháng thể này bao gồm các phân tử trên bề mặt của tế bào đuôi gai mà hoạt hóa chức năng DC và việc trình diện kháng nguyên. Các kháng thể kháng CD40 có thể thay thế hiệu quả cho hoạt tính tế bào T hỗ trợ (Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478) và có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT. Các kháng thể hoạt hóa đối với các phân tử đồng kích thích tế bào T như OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), CD137/4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), và ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) cũng có thể làm tăng mức hoạt hóa tế bào T. Các chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1, hoặc CTLA-4 (ví dụ, patent Mỹ số 5,811,097), cũng có thể được sử dụng cùng với các kháng thể kháng TIGIT.

Việc ghép tủy xương hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều khối u có nguồn gốc tạo máu. Trong khi việc ghép với bệnh vật chủ là kết quả của việc điều trị này, lợi ích trị liệu có thể thu được từ việc ghép với đáp ứng khối u. Sự ức chế TIGIT có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả của tế bào T đặc hiệu khối u được ghép vào thể cho.

Cũng có một số quy trình điều trị thử nghiệm bao gồm hoạt hóa và khuếch đại *ex vivo* các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên và chuyển nhận các tế bào này vào trong thể nhận để kích thích các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên chống khối u (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng để hoạt hóa các đáp ứng tế bào T với các tác nhân gây nhiễm như việc hoạt hóa CMV. *Ex vivo* với sự có mặt của các kháng thể kháng TIGIT có thể làm tăng tần suất và hoạt tính của các tế bào T được chuyển nhận.

### Bệnh nhiễm virus mạn tính

Theo một khía cạnh khác, sáng chế trong bản mô tả này mô tả phương pháp điều trị bệnh lây nhiễm ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể kháng TIGIT, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, sao cho đối tượng này được điều trị đối với bệnh nhiễm trùng này.

Tương tự như ứng dụng của nó đối với khối u như đã được mô tả trên đây, sự ức chế TIGIT gián tiếp qua kháng thể có thể được sử dụng riêng rẽ, hoặc dưới dạng chất bổ trợ, kết hợp với vaccin, để tăng cường đáp ứng miễn dịch với tác nhân gây bệnh, độc tố, và tự kháng nguyên. Các ví dụ về tác nhân gây bệnh mà phương pháp trị liệu này có thể đặc biệt hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, HIV, bệnh viêm gan (A, B, & C), bệnh cúm, bệnh herpes, Giardia, bệnh sốt rét, Leishmania, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Sự ức chế TIGIT là đặc biệt hữu ích chống bệnh lây nhiễm được gây ra bởi các tác nhân như HIV có kháng nguyên thay đổi trong quá trình nhiễm bệnh. Các epitop mới này được nhận diện là ngoại lai ở thời điểm dùng kháng thể kháng TIGIT của người, do đó, gây ra đáp ứng tế bào T mạnh.

Một số ví dụ về các virus gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm HIV, virus gây bệnh viêm gan (A, B, hoặc C), virus gây bệnh herpes (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, và CMV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus gây bệnh cúm, flavivirus, echovirus, rhinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus hợp bào hô hấp, virus gây bệnh quai bị, rotavirus, virus gây bệnh sởi, virus gây bệnh sởi Đức, parvovirus, virus gây bệnh đậu mùa, virus HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus - virus gây u limphô T ở người), virus gây bệnh sốt xuất huyết, papillomavirus, virus gây bệnh u mềm, poliovirus, virus gây bệnh dại, virus JC và virus gây bệnh viêm não do arbovirus.

Một số ví dụ về vi khuẩn gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm chlamydia, vi khuẩn rickettsia, mycobacteria, staphylococci, streptococci, pneumococci, meningococci và gonococci, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, diphtheria, salmonella, bacilli, cholera, tetanus, botulism, anthrax, plague, leptospirosis, and vi khuẩn gây bệnh Lyme.

Một số ví dụ về nấm gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm *Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, v.v.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (fumigatus, niger, v.v.), Giống *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* và *Histoplasma capsulatum*.

Một số ví dụ về ký sinh trùng gây bệnh gây ra bệnh lây nhiễm có thể điều trị được bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Trong tất cả các phương pháp trên, sự ức chế TIGIT có thể được kết hợp với các dạng trị liệu miễn dịch khác như điều trị bằng xytokin (ví dụ, interferon, GM-CSF, G-CSF, IL-2), hoặc điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép, mà làm tăng mức độ trình diện kháng nguyên của khối u (xem, ví dụ Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

#### Tá được vaccin

Các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên bằng cách dùng phối hợp kháng thể kháng TIGIT với kháng nguyên cần quan tâm (ví dụ, vaccin). Do đó, sáng chế mô tả phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên ở đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng này dùng: (i) kháng nguyên; và (ii) kháng thể kháng TIGIT, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, sao cho đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên ở đối tượng được tăng cường. Kháng nguyên này có thể là, ví dụ kháng nguyên của khối u, kháng nguyên của virus, kháng nguyên của vi khuẩn hoặc kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh. Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về các kháng nguyên này bao gồm các kháng nguyên được bàn luận trong các phần nêu trên, như kháng nguyên của khối u (hoặc vaccin từ khối u) nêu trên, hoặc kháng nguyên từ virus, vi khuẩn hoặc tác nhân gây bệnh khác được mô tả trên đây.

Theo các phương án nhất định, peptit hoặc protein dung hợp chứa epitop mà kháng thể kháng TIGIT gắn vào được sử dụng làm vacxin thay cho, hoặc ngoài, kháng thể kháng TIGIT.

Các đường dùng thích hợp của chế phẩm chứa kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng của người, phân tử đa đặc hiệu và đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch) được mô tả trong bản mô tả này *in vivo* và *in vitro* là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được lựa chọn bởi người có hiểu biết trung bình. Ví dụ, chế phẩm chứa kháng thể có thể được sử dụng bằng cách tiêm (ví dụ, trong tĩnh mạch hoặc dưới da). Các liều thích hợp của các phân tử được sử dụng sẽ phụ thuộc vào tuổi và cân nặng của đối tượng và nồng độ và/hoặc dạng bào chế của chế phẩm chứa kháng thể này.

Như đã mô tả trên đây, các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng phối hợp với một hoặc nhiều dược chất khác, ví dụ chất gây độc tế bào, chất gây độc phóng xạ hoặc chất ức chế miễn dịch. Kháng thể có thể được liên kết với chất này (dưới dạng phức hợp miễn dịch) hoặc có thể được sử dụng riêng rẽ với chất này. Trong trường hợp sau (việc dùng riêng rẽ), kháng thể này có thể được sử dụng trước, sau hoặc đồng thời với chất này hoặc có thể được sử dụng phối hợp với các phép trị liệu đã biết khác, ví dụ phép trị liệu chống ung thư, ví dụ xạ trị. Các dược chất này bao gồm, trong số các chất khác, chất chống ung thư như doxorubicin (adriamycin), cisplatin, bleomycin sulfat, carmustine, chlorambucil, dacarbazine và xyclophosphamid hydroxyure mà, bản thân chúng, chỉ có hiệu quả ở mức mà gây độc hoặc dưới mức gây độc cho đối tượng bị bệnh. Cisplatin được sử dụng trong tĩnh mạch với liều 100mg/mL mỗi bốn tuần một lần và adriamycin được sử dụng trong tĩnh mạch với liều 60-75mg/mL mỗi 21 ngày một lần. Việc dùng phối hợp các kháng thể kháng TIGIT, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, được mô tả trong bản mô tả này với tác nhân hóa trị liệu tạo ra hai chất chống ung thư mà hoạt động thông qua các cơ chế khác nhau để thu được tác dụng gây độc tế bào cho các tế bào khối u của người. Việc dùng phối hợp này có thể giải quyết các vấn đề do sự phát triển tính kháng thuốc hoặc thay đổi tính kháng nguyên của tế bào khối u làm cho chúng không phản ứng với kháng thể.

Cũng nằm trong phạm vi được mô tả trong bản mô tả này là kit chứa chế phẩm chứa kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể của người, phân tử đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu, hoặc thể tiếp hợp miễn dịch) và hướng dẫn để sử dụng. Kit này có thể còn chứa ít nhất một chất phản ứng bổ sung, hoặc một hoặc nhiều kháng thể

của người bổ sung được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể của người có hoạt tính bổ sung gắn kết với epitop trong kháng nguyên TIGIT phân biệt với kháng thể của người thứ nhất). Các kit thường bao gồm nhãn chỉ ra mục đích sử dụng đã định của các thành phần của kit. Thuật ngữ nhãn bao gồm vật liệu viết tay hoặc được ghi bất kỳ được cung cấp trên hoặc với kit, hoặc nếu không, kèm theo kit.

#### Phép trị liệu kết hợp

Ngoài tổ hợp các phép trị liệu kết hợp đã nêu trên, các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng trong phép trị liệu kết hợp, ví dụ để điều trị ung thư, như được mô tả dưới đây.

Sáng chế mô tả phương pháp trị liệu kết hợp trong đó kháng thể kháng TIGIT được sử dụng phối hợp với một hoặc nhiều chất bổ sung, ví dụ kháng thể, mà có hiệu quả trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch để từ đó tăng cường, kích thích hoặc điều chỉnh tăng hơn nữa đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Như được thể hiện trong ví dụ 7, và được thể hiện trên các Fig.5A và 5B, việc dùng kháng thể kháng TIGIT đối kháng và kháng thể kháng PD-1 đối kháng cho chuột nhắt có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của khối u được tăng cường.

Nói chung, kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được kết hợp với (i) chất chủ vận của thụ thể đồng kích thích và/hoặc (ii) chất đối kháng của tín hiệu ức chế trên tế bào T, mỗi chất dẫn đến sự khuếch đại đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên (chất điều hòa điểm kiểm soát miễn dịch). Hầu hết các phân tử đồng kích thích và đồng ức chế là thành viên của siêu họ globulin miễn dịch (IgSF), và các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng với chất mà hướng đích thành viên của họ IgSF để làm tăng đáp ứng miễn dịch. Một họ quan trọng của phối tử gắn kết màng mà gắn kết với các thụ thể đồng kích thích hoặc đồng ức chế là họ B7, mà bao gồm B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA), và B7-H6. Một họ khác của các phối tử gắn kết màng mà gắn kết với các thụ thể đồng kích thích hoặc đồng ức chế là họ phân tử TNF mà gắn kết với các thành viên tương tự của họ thụ thể TNF, mà bao gồm CD40 và CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT $\beta$ R,

LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, lymphotoxin  $\alpha$ /TNF $\beta$ , TNFR2, TNF $\alpha$ , LT $\beta$ R, lymphotoxin  $\alpha$  1 $\beta$ 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (xem, ví dụ Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00:1).

Sự hoạt hóa tế bào T cũng được điều hòa bởi các xytokin hòa tan. Do đó, các kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng kết hợp với (i) các chất đối kháng (hoặc các chất ức chế hoặc các chất phong bế) của các protein thuộc họ IgSF hoặc họ B7 hoặc họ TNF mà ức chế sự hoạt hóa tế bào T hoặc các chất đối kháng của các xytokin mà ức chế sự hoạt hóa tế bào T (ví dụ, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF, hoặc các xytokin ức chế miễn dịch khác) và/hoặc (ii) các chất chủ vận của các thụ thể kích thích thuộc họ IgSF, họ B7 hoặc họ TNF hoặc của các xytokin mà kích thích sự hoạt hóa tế bào T, để kích thích đáp ứng miễn dịch, ví dụ để điều trị các bệnh tăng sinh, như ung thư.

Theo một khía cạnh, các đáp ứng tế bào T có thể được kích thích bởi tổ hợp các MAb kháng TIGIT theo sáng chế và một hoặc nhiều chất trong số (i) chất đối kháng của protein mà ức chế sự hoạt hóa tế bào T (ví dụ, các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch) như CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, CD96 (WO 2015/024060; Bernhardt *et al.* (2014) *Nat. Immunol.* 15:406) và TIM-4, và (ii) chất chủ vận của protein mà kích thích sự hoạt hóa tế bào T như B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, CD40, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 và CD28H.

Các chất làm ví dụ mà điều biến một trong số các protein nêu trên và có thể được kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT chủ vận, ví dụ các chất được mô tả trong bản mô tả này, để điều trị ung thư, bao gồm: YERVOY<sup>®</sup>/ipilimumab hoặc tremelimumab (với CTLA-4), galiximab (với B7.1), OPDIVO<sup>®</sup>/nivolumab/BMS-936558 (với PD-1), pidilizumab/CT-011 (với PD-1), KEYTRUDA<sup>®</sup>/pembrolizumab/MK-3475 (với PD-1), AMP224 (với B7-DC/PD-L2), BMS-936559 (với B7-H1), MPDL3280A (với B7-H1), MEDI-570 (với ICOS), AMG557 (với B7H2), MGA271 (với B7H3 – WO 11/109400), IMP321 (với LAG-3), urelumab/BMS-663513 và PF-05082566 (với CD137/4-1BB), CDX-1127 (với CD27), MEDI-6383 và MEDI-6469 (với OX40), RG-7888 (với OX40L – WO 06/029879), Atacicept (với TACI), CP-870893 (với CD40), lucatumumab (với CD40), dacetuzumab (với CD40), và muromonab-CD3 (với CD3).

Các phân tử khác mà có thể được kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT đối kháng để điều trị ung thư bao gồm các chất đối kháng của các thụ thể ức chế trên tế bào NK hoặc các chất chủ vận của các thụ thể hoạt hóa trên tế bào NK. Ví dụ, các kháng thể kháng TIGIT đối kháng có thể được kết hợp với các chất đối kháng của KIR (ví dụ, lirilumab).

Các chất khác nữa để trị liệu kết hợp bao gồm các chất mà ức chế hoặc làm suy kiệt đại thực bào hoặc bạch cầu đơn nhân, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đối kháng CSF-1R như các kháng thể đối kháng CSF-1R bao gồm RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) hoặc FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Nói chung, các kháng thể kháng TIGIT đối kháng được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng cùng với một hoặc nhiều chất chủ vận mà gắn với các thụ thể đồng kích thích dương tính, chất phong bế mà làm giảm sự truyền tín hiệu thông qua các thụ thể ức chế, và một hoặc nhiều chất mà làm tăng một cách hệ thống tần suất của các tế bào T kháng khối u, các chất mà khắc phục con đường ức chế miễn dịch riêng biệt trong vi môi trường khối u (ví dụ, phong bế sự gắn của thụ thể ức chế (ví dụ, các tương tác PD-L1/PD-1), làm suy kiệt hoặc ức chế  $T_{reg}$ s (ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD25 (ví dụ, daclizumab) hoặc bằng cách làm suy kiệt hạt kháng CD25 *ex vivo*), ức chế các enzym chuyển hóa như IDO, hoặc đảo chiều/ngăn ngừa sự mất ứng hoặc sự cạn kiệt tế bào T) và các chất mà kích hoạt sự hoạt hóa miễn dịch bẩm sinh và/hoặc sự viêm ở các vị trí của khối u.

Sáng chế mô tả phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng phân tử kháng TIGIT đối kháng, ví dụ kháng thể, và một hoặc nhiều kháng thể kích thích sinh miễn dịch bổ sung, như chất đối kháng PD-1, ví dụ kháng thể đối kháng, chất đối kháng PD-L1, ví dụ kháng thể đối kháng, chất đối kháng CTLA-4, ví dụ kháng thể đối kháng và/hoặc chất đối kháng LAG3, ví dụ kháng thể đối kháng, sao cho đáp ứng miễn dịch được kích thích ở đối tượng này, ví dụ để ức chế sự sinh trưởng của khối u hoặc để kích thích đáp ứng chống virus. Theo một phương án, đối tượng này được sử dụng kháng thể kháng TIGIT đối kháng và kháng thể kháng PD-1 đối kháng. Theo một phương án, đối tượng này được sử dụng kháng thể kháng TIGIT đối kháng và kháng thể kháng PD-L1 đối kháng. Theo một phương án, đối tượng này được sử dụng kháng thể kháng TIGIT đối kháng và kháng thể kháng CTLA-4 đối kháng. Theo

một phương án, ít nhất một kháng thể kích thích sinh miễn dịch bổ sung (ví dụ, kháng PD-1, kháng PD-L1, kháng CTLA-4 và/hoặc kháng LAG3) là kháng thể của người. Theo cách khác, ít nhất một kháng thể kích thích sinh miễn dịch bổ sung có thể là, ví dụ kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người, ví dụ được tạo ra từ kháng thể kháng PD-1, kháng PD-L1, kháng CTLA-4 và/hoặc kháng LAG3 của chuột nhắt.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, ung thư), bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT đôi kháng và kháng thể PD-1 đôi kháng cho đối tượng. TIGIT và PD-1 được đồng biểu hiện trong u melanin (Chauvin *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125:2046), và cũng được đồng biểu hiện ở mức tương đối cao trên CD8<sup>+</sup> TILS từ đối tượng bị bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC) và đối tượng bị bệnh ung thư biểu mô tế bào thận (renal cell carcinoma - RCC). Xem Bảng 2 (thể hiện tỷ lệ phần trăm các tế bào TIGIT<sup>+</sup> / PD-1<sup>+</sup> dưới dạng tỷ lệ phần trăm của tổng số CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILS đối với các mẫu từ một số đối tượng bị bệnh).

Bảng 2

Tỷ lệ phần trăm TIGIT<sup>+</sup> / PD-1<sup>+</sup> TILS trong các loại ung thư

| Mẫu     | %TIGIT <sup>+</sup> / PD-1 <sup>+</sup> |
|---------|-----------------------------------------|
| NSCLC-1 | 13                                      |
| NSCLC-3 | 5,8                                     |
| NSCLC-4 | 37,4                                    |
| NSCLC-5 | 14,6                                    |
| NSCLC-6 | 49,1                                    |
| NSCLC-7 | 57,8                                    |
| NSCLC-8 | 50,5                                    |
| NSCLC-9 | 21                                      |
| RCC-002 | 25,5                                    |
| RCC-003 | 65,6                                    |
| RCC-006 | 20,5                                    |

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TIGIT được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, kháng thể kháng PD-1 được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu. Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT và liều thấp hơn liều trị liệu của kháng thể kháng PD-1 cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng này là người. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 là kháng thể đơn dòng có trình tự của người và kháng thể kháng TIGIT là kháng thể đơn dòng có trình

tự của người, như kháng thể chứa các CDR hoặc các vùng biến đổi của các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, chỉ các đối tượng có khối u thể hiện mức độ biểu hiện PVR và/hoặc Nectin-2 cao và mức độ biểu hiện PD-L1 cao được chọn để điều trị kết hợp bằng kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế và chất đối kháng PD-1. Theo một phương án khác, các đối tượng có khối u thể hiện mức độ biểu hiện PVR và/hoặc Nectin-2 cao nhưng mức độ biểu hiện PD-L1 thấp được chọn để trị liệu đơn trị bằng kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, hoặc trị liệu kết hợp với một dược chất khác không phải là chất đối kháng PD-1.

Theo các phương án khác, sáng chế mô tả phép trị liệu kết hợp trong đó kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế được sử dụng tiếp theo việc điều trị bằng chất đối kháng PD-1/PD-L1. Theo một phương án, các kháng thể kháng TIGIT chỉ được sử dụng sau khi việc điều trị bằng chất đối kháng PD-1/PD-L1 đã bị thất bại, dẫn đến đáp ứng trị liệu chưa hoàn toàn, hoặc có sự tái xuất hiện khối u hoặc sự tái phát (trong bản mô tả này được gọi là “thất bại PD-1”). Theo một phương án khác, các khối u trong sự thất bại PD-1 này được sàng lọc để biểu hiện PVR và/hoặc Nectin-2 và chỉ khối u có mức độ biểu hiện cao được điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT.

Các chất đối kháng PD-1 thích hợp để sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phối tử, các kháng thể (ví dụ, các kháng thể đơn dòng và các kháng thể đặc hiệu kép), và các chất đa hóa trị. Theo một phương án, chất đối kháng PD-1 là protein dung hợp, ví dụ protein dung hợp Fc, như AMP-244. Theo một phương án, chất đối kháng PD-1 là kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng PD-L1.

Kháng thể kháng PD-1 làm ví dụ là OPDIVO<sup>®</sup>/nivolumab (BMS-936558) hoặc kháng thể mà chứa các CDR hoặc các vùng biến đổi của một trong số các kháng thể 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 và 4A11 được mô tả trong WO 2006/121168. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 là MK-3475 (KEYTRUDA<sup>®</sup>/pembrolizumab/ trước đây là lambrolizumab) được mô tả trong WO2012/145493; AMP-514/MEDI-0680 được mô tả trong WO 2012/145493; và CT-011 (pidilizumab; trước đây là CT-AcTibody hoặc BAT; xem, ví dụ Rosenblatt *et al.* (2011) J. Immunotherapy 34:409). Các kháng thể PD-1 đã biết khác và các chất ức chế

PD-1 khác bao gồm các chất được mô tả trong WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, patent Mỹ các số 7,635,757 và 8,217,149, và công bố patent Mỹ số 2009/0317368. Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-1 được bộc lộ trong WO2013/173223 cũng có thể được sử dụng. Kháng thể kháng PD-1 mà cạnh tranh để gắn kết với, và/hoặc gắn kết với cùng epitop trên PD-1 như, như một trong số các kháng thể này cũng có thể được sử dụng trong phép điều trị kết hợp.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, ung thư), bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT đối kháng và kháng thể PD-L1 đối kháng cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TIGIT được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu. Sáng chế mô tả phương pháp làm thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT và liều thấp hơn liều trị liệu của kháng thể kháng PD-L1 cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng này là người. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-L1 là kháng thể đơn dòng có trình tự của người và kháng thể kháng TIGIT là kháng thể đơn dòng có trình tự của người, như kháng thể chứa các CDR hoặc các vùng biến đổi của các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD-L1 là BMS-936559 (được gọi là 12A4 trong WO 2007/005874 và patent Mỹ số 7,943,743), MSB0010718C (WO2013/79174), hoặc kháng thể mà chứa các CDR hoặc các vùng biến đổi của 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 và 13G4, mà được mô tả trong công bố đơn PCT WO 07/005874 và patent Mỹ số 7,943,743. Theo phương án nhất định, kháng thể kháng PD-L1 là MEDI4736 (còn được gọi là Anti-B7-H1) hoặc MPDL3280A (còn được gọi là RG7446). Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-L1 được bộc lộ trong WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, patent Mỹ các số 7,635,757 và 8,217,149 và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/145493 cũng có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng PD-L1 mà cạnh tranh với và/hoặc gắn kết với cùng epitop như epitop của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này cũng có thể được sử dụng trong phép điều trị kết hợp.

Theo phương án khác nữa, kháng thể kháng huCD40 chủ vận theo sáng chế được kết hợp với chất đối kháng truyền tín hiệu PD-1/PD-L1, như chất đối kháng PD-1 hoặc chất đối kháng PD-L1, kết hợp với được chất miễn dịch thứ ba. Theo một phương án, được chất miễn dịch thứ ba là chất đối kháng GITR hoặc chất đối kháng OX-40, như các kháng thể kháng GITR hoặc kháng OX40 được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, chất trị ung thư miễn dịch là chất chủ vận GITR, như kháng thể GITR chủ vận. Các kháng thể GITR thích hợp bao gồm, ví dụ BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO 06/105021, WO 09/009116) và MK-4166 (WO 11/028683).

Theo một khía cạnh khác, chất trị ung thư miễn dịch là chất đối khángIDO. Các chất đối khángIDO thích hợp bao gồm, ví dụ INCB-024360 (WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), indoximod, hoặc NLG-919 (WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237).

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, ung thư), bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này và kháng thể đối khángCTLA-4 cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TIGIT được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, kháng thể khángCTLA-4 được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu. Sáng chế mô tả phương pháp làm thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT và liều thấp hơn liều trị liệu của kháng thể khángCTLA-4 cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng này là người. Theo các phương án nhất định, kháng thể khángCTLA-4 là kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm: YERVOY® (ipilimumab hoặc kháng thể 10D1, được mô tả trong công bố đơn PCT WO 01/14424), tremelimumab (trước đây là ticilimumab, CP-675,206), và kháng thể khángCTLA-4 được mô tả trong các công bố sau: WO 98/42752; WO 00/37504; patent Mỹ số 6,207,156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (kháng thể CP-675206); và Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể khángCTLA-4 được bộc lộ trong WO2013/173223 cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, ung thư), bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT và kháng thể kháng LAG-3 cho đối tượng. Theo các phương án khác, kháng thể kháng TIGIT được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu, hoặc cả hai kháng thể được sử dụng ở liều thấp hơn liều trị liệu. Sáng chế mô tả phương pháp làm thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT và liều thấp hơn liều trị liệu của kháng thể kháng LAG-3 cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng này là người. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LAG-3 là kháng thể đơn dòng có trình tự của người và kháng thể kháng TIGIT là kháng thể đơn dòng có trình tự của người, như kháng thể chứa các CDR hoặc các vùng biến đổi của các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Các ví dụ về các kháng thể kháng LAG3 bao gồm các kháng thể chứa các CDR hoặc các vùng biến đổi của các kháng thể 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 hoặc 17E5, mà được mô tả trong công bố patent Mỹ số US2011/0150892 và WO2014/008218. Theo một phương án, kháng thể kháng LAG-3 là BMS-986016. Các kháng thể kháng LAG-3 khác được công nhận trong lĩnh vực này mà có thể được sử dụng bao gồm IMP731 được mô tả trong US 2011/007023. IMP-321 cũng có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng LAG-3 mà cạnh tranh với và/hoặc gắn kết với cùng epitop như epitop của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này cũng có thể được sử dụng trong phép điều trị kết hợp.

Việc dùng của các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này và các chất đối kháng, ví dụ các kháng thể đối kháng, với một hoặc nhiều kháng nguyên đích thứ hai như LAG-3 và/hoặc CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với các tế bào ung thư ở đối tượng bị bệnh. Bệnh ung thư mà sinh trưởng của nó có thể được ức chế bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư thường đáp ứng với trị liệu miễn dịch. Ví dụ điển hình về bệnh ung thư được điều trị bằng phép trị liệu kết hợp theo sáng chế bao gồm các bệnh ung thư được liệt kê cụ thể trên đây trong phần bản luận về phép trị liệu đơn trị bằng các kháng thể kháng TIGIT.

Theo một số phương án, việc kết hợp các kháng thể trị liệu được bàn luận trong bản mô tả này có thể được sử dụng đồng thời dưới dạng chế phẩm đơn trong chất mang được dụng, hoặc đồng thời dưới dạng các chế phẩm riêng rẽ với mỗi kháng thể trong chất mang được dụng. Theo một phương án khác, việc kết hợp các kháng thể trị liệu có thể được sử dụng lần lượt. Ví dụ, kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng TIGIT có thể

được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng CTLA-4 được sử dụng thứ hai. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng PD-1 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng PD-1 được sử dụng thứ hai. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng PD-L1 được sử dụng thứ hai. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng lần lượt, như kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ hai, hoặc kháng thể kháng TIGIT được sử dụng thứ nhất và kháng thể kháng LAG-3 được sử dụng thứ hai.

Ngoài ra, nếu nhiều hơn một liều của phép trị liệu kết hợp được sử dụng lần lượt, thì thứ tự của việc dùng lần lượt có thể được đảo chiều hoặc được giữ theo thứ tự giống nhau ở mỗi thời điểm dùng, việc dùng lần lượt có thể được kết hợp với việc dùng đồng thời, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, lần dùng thứ nhất là kết hợp kháng thể kháng CTLA-4 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng thể kháng CTLA-4 thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng thể kháng TIGIT thứ nhất và kháng thể kháng CTLA-4 thứ hai, v.v.. Ngoài ra hoặc theo cách khác, lần dùng thứ nhất là kết hợp kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng thể kháng PD-1 thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng thể kháng TIGIT thứ nhất và kháng thể kháng PD-1 thứ hai, v.v.. Ngoài ra hoặc theo cách khác, lần dùng thứ nhất là kết hợp kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng thể kháng PD-L1 thứ nhất và kháng thể kháng TIGIT thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng thể kháng TIGIT thứ nhất và kháng thể kháng PD-L1 thứ hai, v.v.. Ngoài ra hoặc theo cách khác, lần dùng thứ nhất là kết hợp kháng thể kháng LAG-3 và kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng đồng thời, lần dùng thứ hai có thể là lần lượt với kháng thể kháng LAG-3 thứ nhất

và kháng thể kháng TIGIT thứ hai, và lần dùng thứ ba có thể là lần lượt với kháng thể kháng TIGIT thứ nhất và kháng thể kháng LAG-3 thứ hai, v.v.. Một phác đồ dùng liều đại diện khác có thể bao gồm lần dùng thứ nhất là lần lượt với kháng thể kháng TIGIT thứ nhất và kháng thể kháng CTLA-4 (và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc kháng thể kháng LAG-3) thứ hai, và các lần dùng tiếp theo có thể là đồng thời.

Tùy ý, kháng TIGIT dưới dạng được chất miễn dịch duy nhất, hoặc kết hợp giữa kháng thể kháng TIGIT và một hoặc nhiều kháng thể trị liệu miễn dịch bổ sung (ví dụ, sự phong bế kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3) có thể được kết hợp thêm với chất sinh miễn dịch, như tế bào ung thư, kháng nguyên của khối u được làm sạch (kể cả các protein tái tổ hợp, peptit, và phân tử hydrat cacbon), các tế bào, và các tế bào được chuyển nạp bằng các gen mã hóa xytokin kích thích miễn dịch (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế về các vacxin từ khối u có thể được sử dụng bao gồm các peptit của kháng nguyên của u melanin, như các peptit của gp100, kháng nguyên MAGE, Trp-2, MART1 và/hoặc tyrosinaza, hoặc tế bào khối u được chuyển nạp để biểu hiện xytokin GM-CSF (được bàn luận thêm dưới đây). Chất ức chế TIGIT và một hoặc nhiều kháng thể bổ sung (ví dụ, sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3) cũng có thể được kết hợp thêm với các phép điều trị ung thư chuẩn. Ví dụ, chất ức chế TIGIT và một hoặc nhiều kháng thể bổ sung (ví dụ, sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3) có thể được kết hợp một cách có hiệu quả với các chế độ hóa trị liệu. Trong các trường hợp này, có thể giảm liều của chất hóa trị liệu khác được sử dụng với kết hợp theo sáng chế (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Ví dụ về kết hợp này là kết hợp của kháng thể chủ vận kháng TIGIT với hoặc không với kháng thể bổ sung, như các kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc các kháng thể kháng PD-1 và/hoặc các kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc các kháng thể kháng LAG-3) còn kết hợp với decarbazine để điều trị u melanin. Một ví dụ khác là kết hợp giữa kháng thể kháng TIGIT với hoặc không với các kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc các kháng thể kháng PD-1 và/hoặc các kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc các kháng thể kháng LAG-3 còn kết hợp với interleukin-2 (IL-2) để điều trị u melanin. Cơ sở khoa học hợp lý đằng sau việc sử dụng kết hợp việc ức chế TIGIT và phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3 với hóa trị liệu là sự chết tế bào, là kết quả của tác động gây độc tế

bào của hầu hết các hợp chất hóa trị liệu, sẽ dẫn đến tăng mức kháng nguyên của khối u trong quá trình trình diện kháng nguyên. Phép trị liệu kết hợp khác mà có thể dẫn đến sự hiệp đồng với sự ức chế TIGIT kết hợp với hoặc không với sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3 thông qua sự chết tế bào bao gồm sự chiếu xạ, phẫu thuật, hoặc ức chế hormon. Mỗi trong số các quá trình này tạo ra nguồn kháng nguyên của khối u trong vật chủ. Các chất ức chế sự tạo mạch cũng có thể được kết hợp với sự ức chế TIGIT kết hợp và sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3. Việc ức chế sự tạo mạch dẫn đến chết tế bào khối u, điều này có thể là nguồn cung cấp kháng nguyên của khối u cho quá trình trình diện kháng nguyên của vật chủ.

Kháng thể đôi kháng kháng TIGIT dưới dạng dược chất miễn dịch duy nhất, hoặc kết hợp giữa các kháng thể đôi kháng TIGIT và kháng thể phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3 cũng có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể đặc hiệu kép mà hướng đích các tế bào hiệu ứng biểu hiện thụ thể  $Fc\alpha$  hoặc  $Fc\gamma$  đến các tế bào khối u (xem, ví dụ patent Mỹ các số 5,922,845 và 5,837,243). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng hướng đích hai kháng nguyên riêng rẽ. Nhánh tế bào T của các đáp ứng này sẽ được tăng nhờ việc sử dụng sự ức chế TIGIT kết hợp và sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3.

Theo một ví dụ khác, kháng thể đôi kháng kháng TIGIT dưới dạng dược chất miễn dịch duy nhất hoặc kết hợp giữa kháng thể kháng TIGIT và chất kích thích miễn dịch bổ sung, ví dụ kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng thể kháng PD-1 và/hoặc kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc chất LAG-3, ví dụ kháng thể, có thể được sử dụng cùng với kháng thể chống ung thư, như RITUXAN<sup>®</sup> (rituximab), HERCEPTIN<sup>®</sup> (trastuzumab), BEXXAR<sup>®</sup> (tositumomab), ZEVALIN<sup>®</sup> (ibritumomab), CAMPATH<sup>®</sup> (alemtuzumab), LYMPHOCIDE<sup>®</sup> (epurtuzumab), AVASTIN<sup>®</sup> (bevacizumab), và TARCEVA<sup>®</sup> (erlotinib), và các chất tương tự. Để làm ví dụ và không bị ràng buộc về mặt lý thuyết, việc điều trị bằng kháng thể chống ung thư hoặc kháng thể chống ung thư được tiếp hợp với độc tố có thể dẫn đến sự chết tế bào ung thư (ví dụ, các tế bào khối u), điều này có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch gián tiếp qua chất kích thích miễn dịch, ví dụ chất TIGIT, CTLA-4, PD-1, PD-L1 hoặc LAG-3, ví dụ kháng thể. Theo phương án làm ví dụ, việc điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, khối u ung thư) có thể bao gồm chất chống ung thư, ví dụ kháng thể, kết hợp với kháng TIGIT và tùy ý chất kích thích miễn dịch bổ sung, ví dụ chất kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3, ví dụ kháng

thể, đồng thời hoặc lần lượt hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, mà có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch kháng khối u bởi vật chủ.

Khối u tránh sự giám sát miễn dịch của vật chủ bằng nhiều cơ chế. Nhiều trong số các cơ chế này có thể chiến thắng bằng cách làm bất hoạt các protein được biểu hiện bởi khối u và có tác dụng ức chế miễn dịch. Các cơ chế này bao gồm, trong số các cơ chế khác, TGF- $\beta$  (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), và phối tử Fas (Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Các kháng thể đối với mỗi trong số các chất này có thể được kết hợp tiếp với kháng thể kháng TIGIT với hoặc không với chất kích thích miễn dịch bổ sung, ví dụ chất kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3, như kháng thể, để làm mất tác dụng của chất ức chế miễn dịch và làm thuận lợi cho đáp ứng miễn dịch kháng khối u bởi vật chủ.

Các chất khác, ví dụ kháng thể, mà có thể được sử dụng để hoạt hóa đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể được sử dụng kết hợp tiếp với kháng thể kháng TIGIT với hoặc không với chất kích thích miễn dịch bổ sung, như kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3. Các kháng thể này bao gồm các phân tử trên bề mặt của tế bào đuôi gai mà hoạt hóa chức năng DC và sự trình diện kháng nguyên. Các kháng thể kháng CD40 (Ridge *et al.*, nêu trên) có thể được sử dụng cùng với kháng thể kháng TIGIT và tùy ý chất kích thích miễn dịch bổ sung, ví dụ chất kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3, ví dụ kháng thể. Các kháng thể hoạt hóa khác với các phân tử đồng kích thích tế bào T OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164:2160-2169), CD137/4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3:682-685 (1997), và ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:262-266) cũng có thể làm tăng mức hoạt hóa tế bào T.

Như được bàn luận trên đây, việc ghép tủy xương hiện đang được sử dụng để điều trị nhiều khối u có nguồn gốc tạo máu. Phép trị liệu miễn dịch kháng TIGIT riêng rẽ hoặc được kết hợp với sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3 có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả của tế bào T đặc hiệu khối u được ghép vào thể cho.

Một số quy trình điều trị thử nghiệm bao gồm hoạt hóa và khuếch đại *ex vivo* các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên và chuyển nhận các tế bào này vào trong thể nhận để

kích thích các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên chống khối u (Greenberg & Riddell, nêu trên). Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng để hoạt hóa các đáp ứng tế bào T với các tác nhân gây nhiễm như sự hoạt hóa CMV. *Ex vivo* với sự có mặt của kháng TIGIT với hoặc không với phép trị liệu kích thích miễn dịch bổ sung, ví dụ các kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3 có thể được mong đợi là làm tăng tần suất và hoạt tính của các tế bào T được chuyển nhận.

Sáng chế mô tả phương pháp làm thay đổi biến cố bất lợi liên quan đến việc điều trị bệnh tăng sinh (ví dụ, ung thư) bằng chất kích thích sinh miễn dịch, bao gồm việc dùng kháng thể kháng TIGIT với hoặc không với và liều thấp hơn liều trị liệu của chất kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3, ví dụ kháng thể, cho đối tượng. Ví dụ, các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này phục vụ cho phương pháp làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm ruột kết hoặc bệnh tiêu chảy gây ra do kháng thể trị liệu kích thích sinh miễn dịch bằng cách cho đối tượng bị bệnh dùng steroid không hấp thu được. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, “steroid không hấp thu được” là glucocorticoid có chuyển hóa lần đầu qua gan rộng vì vậy, sau khi chuyển hóa trong gan, sinh khả dụng của steroid này thấp, *tức là*, nhỏ hơn 20%. Theo một phương án được mô tả trong bản mô tả này, steroid không hấp thu được là budesonide. Budesonide là glucocorticosteroid tác động tại chỗ, được chuyển hóa rộng, chủ yếu bởi gan, sau khi dùng qua đường miệng. ENTOCORT EC<sup>®</sup> (Astra-Zeneca) là chế phẩm budesonide dùng qua đường miệng phụ thuộc độ pH và thời gian được phát triển để tối ưu hóa sự phân phối thuốc đến hồi tràng và suốt kết tràng. ENTOCORT EC<sup>®</sup> được phê chuẩn ở Mỹ để điều trị bệnh Crohn mức độ nhẹ đến trung bình liên quan đến hồi tràng và/hoặc kết tràng lên. Liều dùng qua đường miệng thông thường của ENTOCORT EC<sup>®</sup> để điều trị bệnh Crohn nằm trong khoảng từ 6mg/ngày đến 9mg/ngày. ENTOCORT EC<sup>®</sup> được giải phóng trong ruột trước khi được hấp thu và giữ trong niêm mạc ruột. Ngay khi nó đi qua niêm mạc ruột hướng đích mô, ENTOCORT EC<sup>®</sup> được chuyển hóa rộng bởi hệ cytochrom P450 trong gan thành các chất chuyển hóa có hoạt tính glucocorticoid không đáng kể. Do đó, sinh khả dụng là thấp (khoảng 10%). Sinh khả dụng của budesonide thấp dẫn đến cải thiện tỷ lệ trị liệu so với các glucocorticoid khác có chuyển hóa lần đầu qua gan ít rộng hơn. Budesonide dẫn đến ít tác dụng bất lợi hơn, bao gồm ít ức chế vùng dưới đồi-tuyến yên hơn, so với các corticosteroid tác động toàn thân. Tuy nhiên, việc dùng

ENTOCORT EC<sup>®</sup> lâu dài có thể gây ra tác dụng glucocorticoid toàn thân như chứng tăng năng vỏ thượng thận và ức chế tuyến thượng thận. Xem PDR 58<sup>th</sup> ed. 2004; 608-610.

Theo các phương án khác nữa, sự ức chế TIGIT với hoặc không với sự phong bế CTLA-4 và/hoặc PD-1 và/hoặc PD-L1 và/hoặc LAG-3 (tức là các kháng thể trị liệu kích thích sinh miễn dịch kháng TIGIT và tùy ý kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3) kết hợp với steroid không hấp thu được có thể được kết hợp thêm với salixylat. Các salixylat bao gồm các chất 5-ASA như, ví dụ: sulfasalazin (AZULFIDINE<sup>®</sup>, Pharmacia & UpJohn); olsalazine (DIPENTUM<sup>®</sup>, Pharmacia & UpJohn); balsalazide (COLAZAL<sup>®</sup>, Salix Pharmaceuticals, Inc.); và mesalamine (ASACOL<sup>®</sup>, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA<sup>®</sup>, Shire US; CANASA<sup>®</sup>, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA<sup>®</sup>, Solvay).

Theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, salixylat được sử dụng kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT với hoặc không với các kháng thể kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc LAG-3 và steroid không hấp thu được có thể bao gồm việc dùng salixylat và steroid không hấp thu được chồng chéo hoặc lần lượt bất kỳ nhằm mục đích làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm ruột kết gây ra bởi các kháng thể kích thích sinh miễn dịch. Do đó, ví dụ phương pháp làm giảm tỷ lệ mắc bệnh viêm ruột kết gây ra bởi kháng thể kích thích sinh miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bước dùng salixylat và steroid không hấp thu được đồng thời hoặc lần lượt (ví dụ, salixylat được sử dụng 6 giờ sau steroid không hấp thu được), hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, salixylat và steroid không hấp thu được có thể được sử dụng qua cùng một đường (ví dụ, cả hai được sử dụng qua đường miệng) hoặc qua các đường khác nhau (ví dụ, salixylat được sử dụng qua đường miệng và steroid không hấp thu được được sử dụng qua trực tràng), các đường này có thể khác với (các) đường dùng các kháng thể kháng TIGIT và kháng CTLA-4 và/hoặc kháng PD-1 và/hoặc kháng PD-L1 và/hoặc kháng LAG-3.

Các kháng thể kháng TIGIT và các phép trị liệu bằng kháng thể kết hợp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng cùng với các phép trị liệu đã biết khác mà được chọn về tính hữu ích cụ thể của chúng đối với chỉ định cần điều trị (ví dụ, ung thư). Các kết hợp của các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng lần lượt với (các) chất được dùng đã biết.

Ví dụ, các kháng thể kháng TIGIT và các phép trị liệu kháng thể kết hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng kết hợp (ví dụ, đồng thời hoặc riêng rẽ) với phép điều trị bổ sung, như chiếu xạ, hóa trị liệu (ví dụ, bằng cách sử dụng camptothecin (CPT-11), 5-fluoraxil (5-FU), cisplatin, doxorubicin, irinotecan, paclitaxel, gemcitabine, cisplatin, paclitaxel, carboplatin-paclitaxel (Taxol), doxorubicin, 5-fu, hoặc camptothecin + apo2l/TRAIL (combo 6X)), một hoặc nhiều chất ức chế proteasom (ví dụ, bortezomib hoặc MG132), một hoặc nhiều chất ức chế Bcl-2 (ví dụ, BH3I-2' (chất ức chế bcl-xl), chất ức chế indolamin dioxygenaza-1 (IDO1) (ví dụ, INCB24360), dẫn xuất AT-101 (R-(-)-gossypol), ABT-263 (phân tử nhỏ), GX-15-070 (obatoclax), hoặc MCL-1 (chất đối kháng protein-1 biệt hóa tế bào bệnh bạch cầu thể tủy)), chất đối kháng iAP (chất ức chế protein chết theo chương trình) (ví dụ, smac7, smac4, chất giả smac phân tử nhỏ, peptit smac tổng hợp (xem Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308), hoặc AEG-35156 (GEM-640)), chất ức chế HDAC (histon deacetylaza), kháng thể kháng CD20 (ví dụ, rituximab), chất ức chế sự tạo mạch (ví dụ, bevacizumab), chất chống tạo mạch hướng đích VEGF và VEGFR (ví dụ, AVASTIN<sup>®</sup>), triterpenoit tổng hợp (xem Hyer *et al.*, *Cancer Research* 2005;65:4799-808), chất điều biến c-FLIP (protein ức chế FLICE tế bào) (ví dụ, các phối tử tự nhiên và tổng hợp của PPAR $\gamma$  (thụ thể  $\gamma$  được hoạt hóa bởi chất tăng sinh thể peroxi), 5809354 hoặc 5569100), chất ức chế kinaza (ví dụ, Sorafenib), trastuzumab, cetuximab, Temsirolimus, các chất ức chế mTOR như rapamycin và temsirolimus, Bortezomib, chất ức chế JAK2, chất ức chế HSP90, chất ức chế PI3K-AKT, Lenalidomide, chất ức chế GSK3 $\beta$ , các chất ức chế IAP và/hoặc được chất gây độc gen.

Các kháng thể kháng TIGIT và các phép trị liệu kháng thể kết hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể còn được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân gây độc tế bào chống tăng sinh. Nhóm các hợp chất mà có thể được sử dụng làm tác nhân gây độc tế bào chống tăng sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm sau:

Tác nhân alkyl hóa (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mù tạc nitơ, dẫn xuất etylenimin, alkyl sulfonat, nitrosoure và triazen): Mù tạc uraxil, Chlormethine, Xyclophosphamit (CYTOXAN<sup>TM</sup>) fosfamide, Melphalan, Chlorambucil, Pipobroman, Triethylenemelamine, Triethylenethiophosphoramine, Busulfan, Carmustine, Lomustine, Streptozocin, Dacarbazine, và Temozolomide.

Chất chống chuyển hóa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đối kháng axit folic, chất tương tự pyrimidin, chất tương tự purin và chất ức chế adenosin deaminaza): Methotrexate, 5-flouraxil, Floxuridine, Cytarabine, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, Fludarabine phosphat, Pentostatine, và Gemcitabine.

Các chất chống tăng sinh thích hợp để kết hợp với các kháng thể kháng TIGIT đối kháng, không chỉ giới hạn ở, taxan, paclitaxel (paclitaxel có bán trên thị trường dưới dạng TAXOL<sup>TM</sup>), docetaxel, discodermolide (DDM), dictyostatin (DCT), Peloruside A, epothilone, epothilone A, epothilone B, epothilone C, epothilone D, epothilone E, epothilone F, furanoepothilone D, desoxyepothilone B1, [17]-dehydrodesoxyepothilone B, [18]dehydrodesoxyepothilone B, C12,13-xyclopropyl-epothilone A, epothilone A được bắc cầu C6-C8, trans-9,10-dehydroepothilone D, cis-9,10-dehydroepothilone D, 16-desmetylepethilone B, epothilone B10, discoderomolide, patupilone (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (Discodermolide), TZT-1027 (soblidotin), ILX-651 (tasidotin hydroclorua), Halichondrin B, Eribulin mesylat (E-7389), Hemiasterlin (HTI-286), E-7974, Cryptophycins, LY-355703, thể tiếp hợp miễn dịch Maytansinoid (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleutherobin, 17beta-axetoxy-2-etoxy-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, cyclostreptin, isolaulimalide, laulimalide, 4-epi-7-dehydroxy-14,16-didemetyl-(+)-discodermolide, và cryptothilone 1, ngoài các chất làm ổn định vi cấu trúc hình ống khác đã biết trong lĩnh vực này.

Trong trường hợp mà mong muốn làm cho các tế bào tăng sinh bất thường trở nên dừng lại cùng với hoặc trước khi điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này, các hormon và steroid (kể cả chất tương tự tổng hợp), như 17a-Ethinylestradiol, Diethylstilbestrol, testosteron, prednison, Fluoxymesterone, Dromostanolone propionat, Testolactone, Megestrolacetate, metylprednisolon, metyltestosteron, prednisolon, Triamcinolone, Chlorotrianisene, hydroxyprogesteron, Aminoglutethimide, Estramustine, Medroxyprogesteronaxetat, Leuprolide, Flutamide, Toremifene, ZOLADEX<sup>TM</sup>, cũng có thể được sử dụng cho đối tượng bị bệnh. Khi dùng các phương pháp hoặc các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này, các chất khác được sử dụng trong việc điều biến sự sinh trưởng khối u hoặc sự di căn trong thiết lập lâm sàng, như các chất chống bắt chước, cũng có thể được sử dụng nếu muốn.

Các phương pháp về sự an toàn và việc dùng có hiệu quả tác nhân hóa trị liệu là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, việc dùng của chúng được mô tả trong các tài liệu chuyên ngành chuẩn. Ví dụ, việc dùng nhiều tác nhân hóa trị liệu được mô tả trong tài liệu để bàn của thầy thuốc (Physicians' Desk Reference - PDR), ví dụ 1996 edition (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); nội dung của nó được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

(Các) chất hóa trị liệu và/hoặc xạ trị có thể được sử dụng theo các quy trình trị liệu đã biết trong lĩnh vực này. Sẽ hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng việc dùng (các) chất hóa trị liệu và/hoặc xạ trị có thể thay đổi tùy thuộc vào bệnh cần điều trị và các tác dụng đã biết của (các) chất hóa trị liệu và/hoặc xạ trị trên bệnh đó. Ngoài ra, theo hiểu biết của bác sỹ lâm sàng, các quy trình trị liệu (ví dụ, liều lượng và số lần dùng) có thể thay đổi xét về mặt các tác dụng quan sát được của các dược chất được sử dụng trên đối tượng bị bệnh, và xét về mặt các đáp ứng quan sát được của bệnh với các dược chất được sử dụng.

#### Chọn lọc đối tượng bị bệnh

Theo các phương án khác nhau theo sáng chế, các đối tượng bị bệnh được thử nghiệm trước khi điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế để xác định xem họ có khả năng đáp ứng với phép trị liệu kháng TIGIT hay không, và chỉ đối tượng bị bệnh biểu hiện các đặc điểm liên quan đến đáp ứng trị liệu được điều trị. Sự biểu hiện của các protein liên quan đến con đường TIGIT, bao gồm TIGIT, DNAM, PVR, Nectin-2, PVR hòa tan (sPVR) và Nectin-2 hòa tan (sNectin-2), hoặc hỗn hợp của chúng, có thể được đánh giá. mRNA của PVR và Nectin-2 đều được biểu hiện cao trong phần lớn các khối u của người. Xem ví dụ 9, và Fig.6A. Theo một phương án, sPVR và/hoặc sNectin-2 được phát hiện trong huyết thanh của người, ví dụ bằng ELISA, trong đó mức sPVR và/hoặc sNectin-2 tăng biểu thị các đối tượng có ung thư mà có khả năng đáp ứng với việc điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế.

Theo một số phương án, các mẫu từ đối tượng bị bệnh được sàng lọc để biểu hiện DNAM-1 trên các tế bào T để chọn lọc các đối tượng bị bệnh thích hợp nhất để đáp ứng với phép trị liệu kháng TIGIT, trong đó sự có mặt của DNAM-1 trên các tế bào T hoặc tế bào NK gợi ý đối tượng bị bệnh sẽ có đáp ứng kháng khối u có lợi với phép trị liệu kháng TIGIT, ví dụ điều trị bằng kháng thể kháng huTIGIT hoặc mảnh theo sáng chế, và sự

vắng mặt của DNAM-1 trên các tế bào T hoặc tế bào NK xác nhận các đối tượng bị bệnh này là ít thích hợp để được lợi từ phép trị liệu kháng TIGIT. Theo các phương án khác, các mẫu từ đối tượng bị bệnh được sàng lọc để biểu hiện PVR và/hoặc Nectin-2/CD112 trên các tế bào khối u hoặc các tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u để chọn lọc các đối tượng bị bệnh thích hợp nhất để đáp ứng với phép trị liệu kháng TIGIT, trong đó sự có mặt của PVR và/hoặc Nectin-2/CD112 trên tế bào khối u hoặc tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u gợi ý đối tượng bị bệnh sẽ có đáp ứng kháng khối u có lợi với phép trị liệu kháng TIGIT, ví dụ điều trị bằng kháng thể kháng huTIGIT hoặc mảnh theo sáng chế, và sự vắng mặt của PVR và/hoặc Nectin-2/CD112 trên tế bào khối u hoặc tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u xác nhận các đối tượng bị bệnh này là ít thích hợp để được lợi từ phép trị liệu kháng TIGIT.

Theo một phương án, hàm lượng PVR và/hoặc Nectin-2 hòa tan được đo ở các đối tượng được xem xét để điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, và chỉ các đối tượng biểu hiện hàm lượng PVR và/hoặc Nectin-2 hòa tan tăng được điều trị bằng các kháng thể này. Ví dụ, PVR và/hoặc Nectin-2 hòa tan cao có thể được sử dụng làm chỉ dấu sinh học chọn lọc đối tượng bị bệnh.

Các loại khối u, và các khối u ở các đối tượng riêng, hầu hết có khả năng đáp ứng với việc điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế nếu các tế bào khối u biểu hiện hàm lượng PVR và/hoặc Nectin-2 tăng, và còn nếu các khối u này có hàm lượng cao các tế bào T  $CD8^+$  TIGIT<sup>+</sup> thâm nhiễm.

Sáng chế cũng được minh họa bằng các ví dụ sau, các ví dụ này không được hiểu là giới hạn sáng chế. Nội dung của tất cả các hình vẽ và tất cả các tài liệu tham khảo, các trình tự Ngân hàng gen, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent đã công bố được trích dẫn suốt bản mô tả này được hợp nhất cụ thể vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Đặc biệt là, bộ lộ của công bố đơn PCT số WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 và PCT/US2013/072918, và công bố patent Mỹ số 2011/0150892 được hợp nhất cụ thể vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

## Ví dụ 1

### Sản xuất các kháng thể kháng huTIGIT

Các kháng thể đơn dòng kháng huTIGIT của người được tạo ra bằng cách sử dụng chuột chuyển gen mà biểu hiện các gen kháng thể của người, như sau.

### Kháng nguyên

Protein tái tổ hợp hòa tan huTIGIT được sử dụng làm kháng nguyên để gây miễn dịch. Protein dung hợp hòa tan có MW là 40,7 kD và được hợp thành từ phần ngoại bào của huTIGIT được liên kết với Fc IgG2a của chuột nhắt ở đầu tận cùng C của nó. Trong bản mô tả này, protein dung hợp này được gọi là “protein dung hợp huTIGIT-muFc.” Protein dung hợp này được tạo ra bằng phương pháp ADN tái tổ hợp chuẩn và được biểu hiện trong các tế bào CHO được chuyển nạp, mà tiết protein dung hợp hòa tan vào trong dịch nổi của môi trường nuôi cấy. Các tế bào vật chủ CHO được sử dụng để chuyển nạp được mua từ Invitrogen (Cat #11619-012). Protein dung hợp hòa tan được tiết ra được làm sạch để sử dụng làm chất kháng nguyên. Trình tự của TIGIT của người có chiều dài đầy đủ chứa trình tự tín hiệu được nêu trong SEQ ID NO.1.

### Chuột chuyển gen

Các kháng thể đơn dòng của người đầy đủ đối với TIGIT của người được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt từ CHD\*\*;*CKD2*\*\*;*CMD*++;*JKD*++;*KCo5*(9272)+<sup>^</sup>;kiểu gen SC20+ (sau đây được gọi là chuột nhắt KM<sup>®</sup>). Các ký hiệu gen chuyển riêng rẽ là nằm trong dấu ngoặc đơn, tiếp theo là số dòng đối với các gen chuyển được hợp nhất ngẫu nhiên. Các ký hiệu ++ và + cho thấy đồng hợp tử hoặc bán hợp tử; tuy nhiên, do chuột nhắt được sàng lọc thường lệ bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở PCR mà không cho phép phân biệt giữa tính dị hợp và tính đồng hợp tử đối với các gen chuyển Ig của người được hợp nhất ngẫu nhiên, ký hiệu + có thể được định cho chuột nhắt mà thực sự đồng hợp tử đối với các yếu tố này. Trong chủng này, gen chuỗi nhẹ kappa nội sinh của chuột nhắt đã bị phá vỡ một cách đồng hợp tử như được mô tả trong Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:811-820 và gen chuỗi nặng nội sinh của chuột nhắt đã bị phá vỡ một cách đồng hợp tử như được mô tả trong ví dụ 1 của WO 2001/09187. Hơn thế nữa, chủng chuột nhắt này mang gen chuyển chuỗi nhẹ kappa của người, *KCo5*, như được mô tả trong Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851, nhiễm sắc thể nhân tạo

của nấm men (yeast artificial chromosome - YAC) mang hầu hết locut chuỗi nhẹ kappa của người, như được mô tả trong WO 2000/026373.

#### Gây miễn dịch cho chuột nhắt

Để tạo ra các kháng thể đơn dòng của người đầy đủ đối với TIGIT của người, chuột nhắt KM được gây miễn dịch bằng protein dung hợp huTIGIT-muFc đã làm sạch. Các sơ đồ gây miễn dịch chung được mô tả trong Lonberg, N. *et al* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al*. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 và WO 98/24884. Chuột nhắt này khoảng 4 tháng tuổi khi truyền kháng nguyên lần thứ nhất. Chế phẩm kháng nguyên huTIGIT-muFc tái tổ hợp đã làm sạch (10 µg được làm sạch từ các tế bào của động vật có vú được chuyển nạp biểu hiện protein dung hợp) hoặc 300-19 tế bào được chuyển nạp bằng TIGIT của người được sử dụng để gây miễn dịch chuột nhắt vào trong màng bụng và dưới da. Các chất kháng nguyên được trộn theo tỷ lệ 1:1 với tá được RIBI (Sigma Cat#M6536).

Chuột nhắt này được gây miễn dịch 5 lần ở các khoảng cách 5-7 ngày. Sự gây miễn dịch lần thứ nhất và thứ hai được thực hiện bằng protein tái tổ hợp. Sự gây miễn dịch lần thứ ba là bằng các tế bào, sự gây miễn dịch lần thứ 4 bằng protein và sự gây miễn dịch lần thứ 5 bằng các tế bào. Chuột được lấy máu một tuần sau lần gây miễn dịch cuối để đánh giá hiệu giá đặc hiệu kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch được giám sát bằng cách lấy máu sau ổ mắt. Huyết tương được sàng lọc bằng phân tích FACS bằng cách sử dụng 300-19 tế bào được chuyển nạp, và con chuột có hiệu giá cao nhất đối với IgG của người kháng TIGIT của người được sử dụng để dung hợp. Chuột nhắt nhận được liều tăng cường cuối bằng cách tiêm trong tĩnh mạch (IV) và trong màng bụng (IP) kháng nguyên hòa tan 2 ngày và các tế bào được chuyển nạp 3 ngày trước khi làm chết và lấy lá lách.

Sản xuất các tế bào lai sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đối với TIGIT của người

Các tế bào lách của chuột nhắt được phân lập từ chuột nhắt KM có hiệu giá cao và đối tác dung hợp u tủy chuột nhắt được dung hợp bằng cách dung hợp điện dựa trên điện trường bằng cách sử dụng thiết bị điện di dung hợp tế bào buồng lớn Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Huyền phù đơn bào của tế bào limphô lá lách từ chuột được gây miễn dịch được dung hợp với một số lượng tương đương tế bào u tủy

không tiết của chuột nhắt P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) (số dung hợp: 2541). Các tế bào thu được được đưa vào đĩa ở  $2,0 \times 10^4$  tế bào/lỗ trong đĩa vi chuẩn đáy bằng trong môi trường DMEM chọn lọc chứa glucoza cao (Cellgro #10-013-CM) và 10% huyết thanh thai bê (Hyclone #SH30071.03), và được bổ sung beta-mercaptoetanol (1000X, Gibco #21985-023), 7 mM HEPES (Cellgro 25-060-CI), 2 mM L-glutamin bổ sung (Cellgro 25-005-CI), HAT (50X, Sigma #H-0262), 5% yếu tố tạo dòng tế bào lai (BioVeris #210001), 10% môi trường được làm thích nghi với điều kiện P388DI (ATCC #CRL TIB-63) và Penicillin-Streptomycin (100x, Cellgro #30-002-CI). Sau khoảng 7 ngày, một số của môi trường chứa HAT được thay thế bằng môi trường chứa HT (Cellgro #25-047-CI).

Sau 10 đến 12 ngày, các lỗ riêng được sàng lọc đối với sự có mặt của các kháng thể chuỗi nhẹ kappa IgG của người/của người bằng cách sử dụng thử nghiệm HTRF đồng nhất. Trong thử nghiệm này, dịch nổi từ đĩa dung hợp 96 giếng được trộn với IgG dê kháng người được đánh dấu Europium-cryptate (đặc hiệu mảnh Fc), chuỗi nhẹ kappa dê kháng người được biotin hóa (Bethyl #A80-115B), streptavidin-XLent và được ủ trong 1 giờ. Sau đó, các đĩa được đọc trên máy đọc RUBYstar.

Các tế bào lai từ các lỗ dương tính đối với các kháng thể có chuỗi nhẹ kappa IgG của người/của người hoặc có chuỗi nhẹ lamda IgG của người/của người sau đó được sàng lọc bằng FACS bằng cách sử dụng 300-19 tế bào được chuyển nạp bằng TIGIT của người và 300-19 tế bào không được chuyển nạp làm đối chứng. Các dòng bố mẹ dương tính FACS được chuyển sang các đĩa 24 giếng. Vài ngày sau, dịch nổi tế bào từ các lỗ riêng được sàng lọc lại bằng FACS để xác nhận tính đặc hiệu IgG với TIGIT của người.

Các tế bào lai được tách dòng bằng cách pha loãng liên tiếp và được sàng lọc lại bằng FACS. Ba mươi sáu kháng thể được chọn để khuếch đại và làm sạch. Bốn kháng thể (15A6, 22G2, 11G11, 10D7) được chọn tiếp để giải trình tự và phân tích tiếp.

## Ví dụ 2

Gắn kết của các kháng thể kháng huTIGIT với TIGIT của người hòa tan

Gắn kết của các kháng thể kháng huTIGIT với TIGIT của người hòa tan được xác định bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE® (SPR). Các kháng thể kháng huTIGIT được bắt giữ trên các chip được phủ kappa của người (~5KRU; Southernbiotech cat#2060-01), và TIGIT của người tái tổ hợp (rhTIGIT/Fc) được cho

chảy qua chip ở các nồng độ 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62 nM, và 31 nM. Nồng độ ghi nhận của mAb/thể tích là 2-40 µg/mL (5 µl ở 10 µl/phút). Thời gian liên kết kháng nguyên là 5 phút ở 15 µl/phút, thời gian phân ly kháng nguyên là 6 phút, và việc tái sinh được thực hiện bằng 50 mM HCl/50 mM NaOH (12 µl mỗi chất ở 100 µl/phút). Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

Gắn kết của các MAb kháng huTIGIT với TIGIT của người

| Kháng thể | $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) ( $\times 10^5$ ) | $k_d$ ( $s^{-1}$ ) ( $\times 10^{-3}$ ) | $K_D$ (nM) |
|-----------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| 22G2      | 23,7                                       | 0,403                                   | 0,17       |
| 24E8      | 2,19                                       | 0,704                                   | 3,22       |
| 10B8      | 4,19                                       | 4,27                                    | 10,2       |
| 26F7      | 1,11                                       | 1,30                                    | 11,8       |
| 13D1      | 1,12                                       | 1,44                                    | 12,8       |
| 19H2      | 1,66                                       | 2,42                                    | 14,6       |
| 15A6      | 2,02                                       | 4,04                                    | 19,9       |
| 16F6      | 1,38                                       | 3,75                                    | 27,2       |
| 11G11     | 0,503                                      | 1,44                                    | 28,7       |
| 25E7      | 1,33                                       | 4,00                                    | 30,1       |
| 24G1      | 1,25                                       | 4,37                                    | 35,0       |
| 10D7      | 1,71                                       | 6,51                                    | 38,1       |
| 17G4      | 2,19                                       | 8,42                                    | 38,4       |
| 4E4       | 7,35                                       | 37,3                                    | 50,7       |
| 5F4       | 0,561                                      | 3,14                                    | 56,0       |
| 20G6      | 3,18                                       | 18,3                                    | 57,6       |
| 6F9       | 4,68                                       | 31,9                                    | 68,2       |
| 6F9       | 2,99                                       | 20,6                                    | 69,0       |
| 11C9      | 0,4                                        | 2,94                                    | 73,5       |
| 9B11      | 1,23                                       | 11,7                                    | 94,9       |
| 27F1      | 0,777                                      | 8,56                                    | 110        |
| 13E6      | 2,03                                       | 22,5                                    | 111        |
| 27F1      | 0,544                                      | 8,38                                    | 154        |
| 11G2      | 1,74                                       | 33,4                                    | 192        |
| 10C9      | 1,52                                       | 29,4                                    | 194        |
| 8C8       | 0,582                                      | 33,1                                    | 568        |

Gắn kết của các kháng thể 14B2, 19H2 và 26D8 là quá yếu để đo được một cách tin cậy.

Việc xác định hằng số gắn kết sơ bộ được thể hiện trong bảng 3 được sử dụng để giúp chọn lọc các kháng thể kháng huTIGIT để nghiên cứu tiếp. Các hằng số gắn kết đối với các kháng thể đã được tách dòng phụ và được làm sạch 15A6 và 22G2 sau đó được xác định bằng cách sử dụng các đường cong hiệu giá đầy đủ lần lượt là 1,5 nM và 90 pM.

Các thử nghiệm SPR bổ sung so sánh các kháng thể 15A6 và 22G2 có các gốc khung cải biến và các vùng hằng định IgG1 của người được biến đổi được thực hiện. Trình tự IgG1f của người được nêu trong SEQ ID NO.45, có biến thể alotyp được nêu trong SEQ ID NO.46 (khác với SEQ ID NO.45 ở R97K, E239D, và M241L). IgG1.3 của người được nêu trong SEQ ID NO.47 (khác với SEQ ID NO.45 ở L117A, L118E và G120A, tương ứng với L234A, L235E và G237A theo đánh số EU). Một vùng hằng định IgG1 của người không hiệu ứng khác, IgG1.1f của người, được nêu trong SEQ ID NO.48 (khác với SEQ ID NO.45 ở L117A, L118E, G120A, A213S và P214S, tương ứng với L234A, L235E, G237A, A330S và P331S theo đánh số EU). Fig.7 thể hiện mức độ giảm mạnh trong việc gắn kết thụ thể Fc $\gamma$  trong các cấu trúc IgG1.1f. Việc sử dụng các vùng Fc “trơ” như vậy có thể thích hợp do TIGIT được biểu hiện cao trên CD8<sup>+</sup> TIL, và các kháng thể kháng TIGIT có chức năng hiệu ứng có thể làm suy kiệt các CD8<sup>+</sup> TIL rất kháng khối u và/hoặc tế bào NK cần thiết để tiêu diệt khối u.

Các thử nghiệm SPR so sánh 15A6 có các biến thể khung A72S và/hoặc N112T, và kháng thể 22G2 có biến thể khung H3Q, với các dạng chưa được biến đổi của chúng cho thấy rằng không một thay đổi khung hay isotyp có ảnh hưởng có nghĩa đến gắn kết với TIGIT của người. Các kết quả được nêu trong bảng 4.

Bảng 4

Gắn kết của các MAb kháng huTIGIT được chọn với TIGIT của người

| Kháng thể | Biến thể trình tự | Isotyp  | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) (x10 <sup>6</sup> ) | $k_d$ (s <sup>-1</sup> ) (x10 <sup>-3</sup> ) | $K_D$ (nM) |
|-----------|-------------------|---------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|
| 15A6      | -                 | IgG1f   | 1,0                                                          | 1,5                                           | 1,5        |
| 15A6      | -                 | IgG1.1f | 1,1                                                          | 1,6                                           | 1,5        |
| 15A6      | A72S              | IgG1.1f | 1,1                                                          | 1,7                                           | 1,5        |
| 15A6      | N112T             | IgG1.1f | 1,1                                                          | 1,9                                           | 1,7        |
| 15A6      | A72S & N112T      | IgG1.1f | 1,0                                                          | 2,0                                           | 2,0        |
| 22G2      | -                 | IgG1f   | 1,9                                                          | 0,17                                          | 0,09       |
| 22G2      | -                 | IgG1.1f | 2,0                                                          | 0,13                                          | 0,07       |
| 22G2      | H3Q               | IgG1    | 1,9                                                          | 0,30                                          | 0,16       |
| 22G2      | H3Q               | IgG1.1f | 2,0                                                          | 0,16                                          | 0,08       |

Các thử nghiệm SPR bổ sung đã phát hiện ra rằng mAb 22G2 gắn kết với TIGIT của người với  $K_D$  là 0,06 nM và với TIGIT của khỉ Cynomolgus với  $K_D$  là 0,09 nM.

Việc đánh số gốc axit amin trong Danh mục trình tự là 117, thấp hơn đánh số trong các tài liệu chuyên ngành do việc sử dụng đánh số EU và do sự vắng mặt của miền biến đổi trong các trình tự IgG trong Danh mục trình tự. Gốc lysin (K) đầu tận cùng C có

mặt trong các cấu trúc di truyền của kháng thể của người thường bị mất đi trong các kháng thể được sản xuất thương mại, như các kháng thể trị liệu theo sáng chế. Dick *et al.* (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. Do đó, lysin này không được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO.45-48, nhưng theo một phương án, kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế bao gồm gốc lysin bổ sung này ở đầu tận cùng C của (các) chuỗi nặng. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế ở trong các chế phẩm chứa hỗn hợp gồm các chuỗi nặng có lysin đầu tận cùng C và các chuỗi nặng không có lysin đầu tận cùng C, ví dụ như là kết quả của việc cắt đầu tận cùng C không được dự tính trước. Theo một số phương án, kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế chứa một hoặc nhiều chuỗi nặng và một hoặc nhiều chuỗi nhẹ, như hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ.

### Ví dụ 3

#### Phân loại các kháng thể kháng TIGIT vào nhiều nhóm

Các thử nghiệm phân loại (binning) kháng thể được thực hiện để xác định các kháng thể nào kháng TIGIT của người hoàn toàn với kháng thể khác để gắn kết với huTIGIT, và do đó, gắn kết với các epitop tương tự. Các kháng thể 14B2, 13E6, 6F9, 11G11, 10C9, 16F6, 11C9, 27A9, 10D7, 20G6, 24E8, 24G1, 27F1, 15A6, 4E4, 13D1, 9B11, 10B8, 22G2, 19H2, 8C8, 17G4, 25E7, 26D8 và 16A8 được nghiên cứu.

Sự cạnh tranh từng cặp giữa các kháng thể kháng huTIGIT được xác định như sau, trong đó kháng thể thứ nhất được gắn vào bề mặt của chip cảm biến, kháng thể thứ hai được ủ trước bằng cấu trúc polypeptit TIGIT trong hỗn hợp, và hỗn hợp được ủ trước này được cho chảy qua chip cảm biến để xác định mức độ mà kháng thể thứ hai cản trở gắn kết của cấu trúc polypeptit TIGIT với kháng thể thứ nhất trên bề mặt chip. Nói ngắn gọn, các kháng thể kháng huTIGIT thứ nhất được giữ cố định trên bề mặt chip Sensor Chip CM5 (Series S, GE Healthcare CAT# BR-1005-30), flowcell2, flowcell3 & flowcell4 (5000 RU), và flowcell1 được sử dụng làm đối chứng âm tính. Các kháng thể thứ hai được pha loãng đến 120µg/mL (2X) ở nồng độ ban đầu. Chuỗi pha loãng của các kháng thể thứ hai được thực hiện bằng cách pha loãng nồng độ kháng thể theo tỷ lệ 1:3 bằng dung dịch đệm đối với bảy nồng độ khác nhau và mẫu đối chứng có (0,0µg/mL)-để thu được đường cong hiệu giá. Mỗi chuỗi nồng độ kháng thể được chia thành hai nửa. Trong nửa thứ nhất của chuỗi nồng độ, 40 nM (2X) kháng nguyên TIGIT (rhTIGIT/Fc) được bổ sung vào để tạo ra chuỗi nồng độ cuối (60µg/mL-0.0µg/mL) và 20 nM nồng độ kháng

nguyên cuối trong mỗi lỗ. Trong nửa thứ hai của chuỗi nồng độ, thay cho kháng nguyên, dung dịch đệm được bổ sung vào để có kháng thể được pha loãng đến cùng nồng độ, và nửa này được xử lý dưới dạng mẫu trắng. Các phức hợp của các kháng thể kháng TIGIT thứ hai và rhTIGIT/Fc được ủ trong 2 giờ. 40  $\mu$ l phức hợp được tiêm vào bề mặt được phủ kháng thể (thứ nhất) ở tốc độ dòng 30  $\mu$ l/phút. Thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE® T200 được sử dụng và dung dịch đệm chạy là HBE-EP, GE Healthcare CAT# BR-1001-88, được lọc loại khí, 0,01M HEPES, pH7,4, 0,15 NaCl, 3mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20. Bề mặt này được tái sinh bằng 25 mM NaOH (Order code: BR-1003-58, GE Healthcare) ở 100  $\mu$ l/phút trong 5 giây. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Microsoft Excel trong đó chuỗi nồng độ của các kháng thể thứ hai được vẽ đồ thị đối với đơn vị đáp ứng tương ứng để thu được đường cong hiệu giá.

Các kết quả cho thấy rằng các kháng thể thử nghiệm phân loại (bin) thành bốn nhóm. Xem Fig.1. Các kháng thể trong Bin 1 (14B2, 13E6, 6F9, 11G11, 10C9, 16F6, 11C9, 27A9, 10D7, 20G6, 24E8, 24G1, 27F1, 15A6, 4E4, 13D1, 9B11, 10B8) phong bế gắn kết của các kháng thể khác trong Bin 1, cũng như 22G2, 19H2, 8C8 và 17G4. Các kháng thể trong Bin 2 (25E7, 26D8, 16A8) phong bế gắn kết của các kháng thể khác trong Bin 2, cũng như 22G2, 19H2 và 8C8. Các kháng thể 22G2, 19H2 và 8C8 (Bin 3) phong bế gắn kết của các kháng thể khác trong Bin 3, cũng như các kháng thể trong cả Bin 1 và 2, nhưng không phải 17G4 (Bin 4). Kháng thể 17G4 phong bế gắn kết của các kháng thể trong Bin 1 nhưng không phải kháng thể khác bất kỳ.

#### Ví dụ 4

##### Lập bản đồ epitop bằng cách hiển thị trên nấm men

Các epitop đối với các kháng thể kháng huTIGIT được chọn theo sáng chế (các dòng vô tính 22G2, 11G11 và 15A6) được xác định bằng cách hiển thị các biến thể vùng ngoại bào huTIGIT được gây đột biến ngẫu nhiên trên nấm men, và phân loại nấm men này trên cơ sở việc gắn kết thất bại của chúng với các kháng thể cụ thể. Các tế bào nấm men được chọn mà thất bại trong việc gắn kết được khuếch đại và được đưa vào vòng chọn lọc bổ sung trên cơ sở không có khả năng của chúng gắn kết với các kháng thể cụ thể theo sáng chế. Xem, ví dụ Chao *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 342:539. Các trình tự của các biến thể huTIGIT được xác định đối với nấm men thu được và được phân tích về tác dụng của mỗi góc trên việc gắn kết kháng thể. Epitop gắn kết đối với các kháng thể theo

sáng chế được xác định dưới dạng các locus trong trình tự huTIGIT trong đó các đột biến đơn axit amin phá vỡ gắn kết với các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế.

Nói ngắn gọn, PCR dễ bị sai số được sử dụng để tạo dòng ADN mã hóa TIGIT của người vào trong các cấu trúc cho phép biểu hiện các biến thể huTIGIT như là phần đầu tận cùng amino của protein dung hợp còn chứa trình tự nhãn c-myc và protein thành tế bào của nấm men Aga1p. Các cấu trúc này, khi được biểu hiện trong nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*), hiển thị các polypeptit huTIGIT biến thể trên bề mặt của các tế bào nấm men, được giữ vào bề mặt tế bào bằng polypeptit Aga1p. Nhãn c-myc có thể tùy ý được sử dụng làm đối chứng dương tính để hiển thị protein dung hợp huTIGIT trên tế bào nấm men đã định. Các tế bào nấm men được sắp xếp bằng FACS, và các tế bào mà biểu hiện dưới dạng protein dung hợp huTIGIT được gấp cuộn chính xác (khi được xác định bằng gắn kết của kháng thể kháng huTIGIT đối chứng của chuột nhắt được phát hiện bằng IgG thứ cấp của dê kháng chuột nhắt được đánh dấu bằng allophycocyanin (APC)), nhưng không gắn kết với các kháng thể theo sáng chế (khi được xác định bằng sự phát hiện IgG của dê kháng người được đánh dấu bằng phycoerythrin (PE) dưới dạng thứ cấp), được gom lại, được khuếch đại, và được sử dụng trong các vòng chọn lọc tiếp theo. Trình tự huTIGIT được xác định đối với các cấu trúc từ nấm men còn lại sau một số vòng chọn lọc. Các thử nghiệm đối chứng không có chọn lọc kháng thể kháng huTIGIT đã xác nhận độ bao phủ thể đột biến tốt ở mỗi vị trí dọc theo trình tự huTIGIT, và tạo ra đường nền để chuẩn hóa các kết quả thu được với thư viện được chọn.

Hàng triệu đoạn đọc trình tự chất lượng cao được thực hiện đối với mỗi quần thể kháng thể được chọn của các phân tử đột biến huTIGIT. Đã phát hiện ra rằng gốc 60 chịu được đột biến về mặt cấu trúc, nhưng các thể đột biến ở vị trí này không gắn kết với kháng thể 22G2, chứng tỏ rằng E60 có liên quan đến trong epitop. Tương tự, các gốc I109, L65, N70, F107, T117, I68, H76 và N58 cũng được tìm thấy là các gốc quan trọng trong epitop đối với kháng thể 22G2. Các gốc epitop đối với nhóm 22G2 trong các vùng trình tự cơ sở chứa các gốc 58 – 76 (NWEQQDQLLAICNADLGWH; SEQ ID NO.38) và các gốc 107 – 117 (FCIYHTYPDGT; SEQ ID NO.39). Xem Fig.2A. Epitop này chồng chéo với bề mặt chung gắn kết TIGIT/PVR khi được xác định bằng cấu trúc tinh thể tia X. Stengel *et al.* (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:5399.

Các thử nghiệm tương tự với kháng thể 11G11 cho thấy các điểm tiếp xúc quan trọng ở các gốc G74, N70, H76, L65, L73, Q56, I68, H111 và P114. Các gốc epitop đối

với nhóm 11G11 trong các vùng trình tự cơ sở chứa các gốc 56 – 76 (QVNWEQQDQLLAICNADLGWH; SEQ ID NO.40) và các gốc 111 – 114 (HTYP; SEQ ID NO.41), với các tiếp xúc tiềm năng khác trong các gốc 120 – 139 (GRIFLEVLESSVAEHGARFQ; SEQ ID NO.42). *Xem Fig.2B.*

Các thử nghiệm tương tự với kháng thể 15A6 cho thấy các điểm tiếp xúc quan trọng ở các gốc H76, G74, L65, N58, I68, Q139, G135, L73, F107, N70, E60, H134, A132 và I109. Các gốc epitop đối với nhóm 15A6 trong các vùng trình tự cơ sở chứa các gốc 58 – 76 (NWEQQDQLLAICNADLGWH; SEQ ID NO.38) và các gốc 107 – 109 (FCI), với các tiếp xúc tiềm năng khác trong các gốc 132 – 139 (AEHGARFQ; SEQ ID NO.43). *Xem Fig.2C.*

Tất cả ba epitop chứa các gốc L65, I68, N70 và H76, gợi ý rằng các gốc này và vùng của nó, tức là các gốc 65 – 76 (LLAICNADLGWH; SEQ ID NO.44), hoặc 58 – 76 chỉ tính đến 15A6 và 22G2, thể hiện vùng quan trọng (“epitop lõi”) để gắn kết các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế.

Các thử nghiệm tương tự về việc gắn kết của huTIGIT với PVR/CD155 của người cho thấy các điểm tiếp xúc quan trọng ở các gốc Q56, N58, I68, N70, L73, G74, W75, H76, H111, T112, Y113, P114, D115 và G116, mà tiếp xúc chủ yếu trong các vùng epitop được gắn bởi các kháng thể 22G2, 11G11 và 15A6.

#### Ví dụ 5

Sự tan của các tế bào PVR<sup>+</sup> tăng bởi các tế bào NK được xử lý bằng kháng thể kháng TIGIT

Tác dụng của kháng thể kháng TIGIT của người 22G2 lên sự tan gián tiếp qua tế bào NK của các tế bào PVR<sup>+</sup> *in vitro* được đánh giá. Các tế bào P815 (dòng tế bào u tế bào bón của chuột nhắt), cả kiểu dại và được xử lý kỹ thuật để biểu hiện PVR của người, được cho tiếp xúc với các tế bào NK của người với sự có mặt của mAb kháng huTIGIT 22G2-IgG1, 22G2-IgG1.1, hoặc đối chứng isotyp.

Nói ngắn gọn, các tế bào NK của người, các chất hiệu ứng, được phân lập từ máu toàn phần và được ủ qua đêm bằng IL-2. Tế bào NK này được đưa vào đĩa với các tế bào đích, P815/PVR hoặc P815[wt], ở tỷ lệ tế bào E:T là 10:1 hoặc 20:1. Các kháng thể được bổ sung vào các lỗ ở nồng độ cuối là 5µg/mL. Các đĩa được ủ trong 2-4 giờ và dịch nổi tế

bào được đánh giá về sự giải phóng lactat dehydrogenaza (LDH), một sản phẩm của quá trình chết hoặc làm chết tế bào.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.3. Tỷ lệ phần trăm (%) mức độ tan cụ thể được tính là [(mức độ tan tự phát trung bình của tín hiệu thử nghiệm)/(mức độ tan lớn nhất trung bình-mức độ tan tự phát trung bình)] x 100. Sự phong bế TIGIT bằng cách sử dụng kháng thể kháng TIGIT 22G2 làm giảm tín hiệu ức chế trên các tế bào NK, điều này dẫn đến tăng mức độ tan của các tế bào đích biểu hiện bởi PVR theo cách đặc hiệu DNAM-1.

#### Ví dụ 6

Hoạt hóa các tế bào T CD8<sup>+</sup> bằng kháng thể kháng TIGIT

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định tác dụng của kháng thể kháng TIGIT của người, riêng rẽ và kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của người, lên các tế bào T của người được kích thích bằng các peptit có tính kháng nguyên. Như là việc mở đầu, quan sát thấy rằng các tế bào T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup> đang lưu hành trong máu nhiều hơn từ người cho khỏe mạnh được tiếp xúc với hỗn hợp các peptit có tính kháng nguyên (từ CMV, EBV, bệnh cúm và bệnh uốn ván) so với từ máu chưa được tiếp xúc. Xem Fig.4A. Mức độ sản sinh IFN $\gamma$  được đo trong máu được xử lý bằng CEFT. Xem Fig.4B. Mặc dù không hiệu quả làm phép trị liệu đơn trị, mAb kháng TIGIT 22G2 tăng cường khả năng của kháng PD-1 để kích thích sản sinh IFN $\gamma$  từ các tế bào T của người được cho tiếp xúc với hỗn hợp các peptit có tính kháng nguyên. Cũng xem Chauvin *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125:2046, trong đó tác dụng của kháng thể kháng TIGIT của người 10D7 lên các tế bào T CD8<sup>+</sup> đặc hiệu khối u của người được xác định trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ các đối tượng bị bệnh u melanin được cho tiếp xúc với peptit NY-ESO-1, có hoặc không dùng đồng thời kháng thể kháng huPD-1.

#### Ví dụ 7

Hoạt tính kháng khối u của các kháng thể kháng TIGIT ở mô hình khối u CT26 của chuột

Các kháng thể kháng TIGIT của chuột nhất được thử nghiệm về hoạt tính kháng khối u, riêng rẽ và kết hợp với các kháng thể kháng PD-1 của chuột nhất, ở mô hình ung thư biểu mô tuyến kết tràng CT26 đồng nguồn. Các kháng thể kháng muTIGIT được sử

dụng trong các thử nghiệm này là các chất thay thế của chuột nhắt của các kháng thể kháng huTIGIT theo sáng chế.

Nói ngắn gọn, mAb kháng muTIGIT (dòng vô tính 4B1) được tạo ra với vùng Fc IgG2a của chuột hoặc IgG1 D265A của chuột (có chức năng hiệu ứng được giảm), cũng như kháng muPD-1 (dòng vô tính 4H2) với vùng Fc D265A IgG1 của chuột. Các kháng thể này, và hỗn hợp của chúng, được sử dụng cho chuột nhắt cùng với đối chứng isotyp IgG1 của chuột nhắt để xác định hoạt tính kháng khối u ở mô hình ung thư biểu mô tuyến kết tràng CT26 syngeneic. Kháng thể đối chứng IgG1 được sử dụng trong các nghiên cứu là kháng thể kháng độc tố bạch hầu của người tái tổ hợp với isotyp IgG1 của chuột nhắt.

Mười lăm con chuột nhắt BALB/c mỗi nhóm (tổng số 90 con) được tiêm dưới da bằng  $1 \times 10^6$  tế bào khối u CT26 vào ngày 0. Việc điều trị bắt đầu vào ngày 7 sau khi cấy ghép. Các khối u được đo, được ngẫu nhiên hóa vào các nhóm điều trị sao cho có các thể tích khối u trung bình tương đương ( $45\text{-}50 \text{ mm}^3$ ), và sau đó, được điều trị trong màng bụng (IP) bằng kháng thể được chỉ định (200  $\mu\text{g}$ /liều) và lần nữa vào các ngày 10 và 14. Mỗi thử nghiệm còn bao gồm 200  $\mu\text{g}$ /liều kháng thể IgG1 đối chứng, và do đó, chính thử nghiệm IgG1 đối chứng bao gồm 400  $\mu\text{g}$ /liều. Các thể tích khối u được đo hai lần hàng tuần.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.5A, thể hiện các thể tích khối u trung bình đối với mỗi thử nghiệm dưới dạng hàm thời gian. Phiên bản chức năng hiệu ứng giảm của kháng thể kháng TIGIT (G1 D265A) không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng khối u và không giải thoát chuột bất kỳ khối khối u, còn IgG2a làm giảm sự sinh trưởng khối u và dẫn đến ba trong số mười lăm con chuột không có khối u vào ngày 35. Kết hợp của kháng thể kháng TIGIT IgG2a với kháng thể kháng PD-1 có hiệu quả cao trong việc làm giảm sự sinh trưởng khối u và dẫn đến mười trong số mười lăm con chuột nhắt không có khối u, còn kết hợp của G1 kháng TIGIT D265A với kháng PD-1 có hiệu quả một chút trong việc làm giảm sự sinh trưởng khối u và dẫn đến bảy trong số mười lăm con chuột không có khối u. Tuy nhiên, cả hai kháng thể kháng TIGIT IgG2a và IgG1 D265A tăng cường hoạt tính của kháng thể kháng PD-1, mà riêng rẽ dẫn đến chỉ hai trong số mười lăm con chuột không có khối u.

Các thử nghiệm tương tự được thực hiện để so sánh kháng TIGIT dưới dạng phép trị liệu đơn trị với kháng TIGIT/kháng PD-1 và kháng TIGIT/kháng CTLA-4 dưới dạng

phép trị liệu kết hợp. Cả hai kháng thể kháng TIGIT và kháng PD-1 được định dạng dưới dạng isotyp IgG1-D265A của chuột trơ Fc, và kháng CTLA-4 dưới dạng IgG2b của chuột nhắt. Các con chuột cái BALB/c được cấy ghép bằng  $1 \times 10^6$  tế bào khối u vào ngày 0, và các kháng thể được sử dụng IP ở 10mg/kg vào các ngày 10, 14 và 17. Các kết quả được nêu trên Fig.5B. Việc bổ sung kháng TIGIT để điều trị với kháng PD-1 và kháng CTLA-4 tăng cường đáng kể sự ức chế sinh trưởng của khối u (TGI), như rõ ràng từ đường cong trị liệu kết hợp, với 56% TGI đối với kháng TIGIT/kháng PD-1 và 49% TGI đối với kháng TIGIT/kháng CTLA-4, so với 7%, 18% và 13% TGI đối với phép trị liệu đơn trị lần lượt bằng kháng TIGIT, kháng PD-1 và kháng CTLA-4. Phép trị liệu kết hợp còn làm tăng số lượng chuột không có khối u ở cuối thử nghiệm từ 1/10 đến 5/10 đối với kết hợp với kháng PD-1, và từ 3/10 đến 6/10 đối với kết hợp với kháng CTLA-4.

#### Ví dụ 8

Các đặc tính khác của các kháng thể kháng huTIGIT 15A6, 22G2, 11G11 và 10D7

Các thử nghiệm *in vitro* khác nhau khác được thực hiện để xác định các đặc tính của các kháng thể được chọn theo sáng chế. Các MAb kháng huTIGIT 15A6, 22G2, 11G11 và 10D7 được tìm ra là gắn kết với các tế bào Jurkat biểu hiện huTIGIT. Thử nghiệm sinh học của các tế bào Jurkat/huTIGIT minh họa rằng các kháng thể 15A6, 11G11 và 10D7 đều phong bế việc truyền tín hiệu PVR với hiệu quả gần như tương đương, và kháng thể 22G2 tốt hơn gấp khoảng hai lần ( $IC_{50} = 0,21nM$ ). Các kháng thể 15A6 và 22G2 được thể hiện là gắn kết với TIGIT từ khỉ cynomolgus với ái lực gần giống như TIGIT của người khi được biểu hiện trên các tế bào CHO, còn 11G11 và 10D7 thì không. Ví dụ, kháng thể 22G2 IgG1.1f gắn kết với TIGIT của người và khỉ với  $K_D$  lần lượt là 0,09 nM và 0,07 nM, và còn có  $EC_{50}$  đối với gắn kết với các tế bào T  $CD8^+$  lần lượt là 0,55 nM và 0,28-0,58 nM, nhưng không gắn kết với TIGIT của chuột cống hoặc chuột nhắt. Các thử nghiệm tiếp theo với các tế bào sơ cấp, tuy nhiên, cho thấy rằng 15A6 không gắn kết tốt với cyno TIGIT trong trường hợp đó. Các kháng thể 22G2 và 15A6 nhuộm các tế bào limphô của người, nhưng không phải 22 mô khác của người lên đến nồng độ 10  $\mu g/mL$  (não, tiểu não, tim, gan, phổi, thận, lá lách, amidan, tuyến ức, kết tràng, ruột non, dạ dày, tuyến tụy, da, cơ xương, tuyến thượng thận, tuyến giáp, dây thần kinh ngoại biên, tuyến tiền liệt, nhau, tinh hoàn, và tử cung). Kháng thể 22G2 không làm tăng mức độ biểu hiện của 75 xytokin và chemokin khác nhau (bao gồm GM-CSF, IL-10,

IL-12, IL-13, IL-2, IFN $\gamma$ , IP-10) từ máu toàn phần của người từ tám người cho khi được ủ ở 10  $\mu\text{g/mL}$  trong 20 giờ, gợi ý nguy cơ thấp của hội chứng giải phóng xytokin.

Trong các thử nghiệm riêng rẽ, mAb kháng TIGIT 22G2 IgG1.1f cho thấy IC<sub>50</sub> là 15,4 nM và 5,72 nM đối với việc phong bế gắn kết TIGIT-mFc với các tế bào P815 lần lượt biểu hiện quá mức PVR của người và Nectin-2 của người, khi mỗi chất có mặt ở nồng độ EC<sub>90</sub> của nó (lần lượt là 14,1 nM và 12,8 nM).

Kháng thể 22G2 IgG1.1f được tìm thấy là có một vị trí glycosyl hóa ở N ở N310 trên chuỗi nặng, với kiểu glycan điển hình đối với các kháng thể đơn dòng được sản sinh trong CHO.

Các kết quả này gợi ý rằng kháng thể 22G2 có các đặc tính lý tưởng cho việc sử dụng trị liệu trong các phương pháp theo sáng chế, ở chỗ nó gắn kết với TIGIT khi nó có mặt trên bề mặt của tế bào, nó ức chế truyền tín hiệu PVR và Nectin-2, nó không gắn kết với các mô ngoại lai của người hoặc gây ra sự giải phóng xytokin hoặc chemokin không mong muốn, và nó gắn kết với cyno TIGIT, điều này có ích trong việc thực hiện các nghiên cứu về độc tính để sử dụng trong các nghiên cứu hỗ trợ cho việc phê chuẩn quản lý.

#### Ví dụ 9

Chọn lọc đối tượng bị bệnh trên cơ sở mức độ biểu hiện của TIGIT, DNAM, PVR và Nectin-2

Các mức độ biểu hiện của các protein liên quan đến con đường TIGIT (TIGIT, PVR/CD155, Nectin-2/CD112, DNAM/CD226) có thể được sử dụng để chỉ dẫn điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế. Các dạng hòa tan của PVR và Nectin-2 (sPVR và sNectin-2) có thể được phát hiện trong huyết thanh, ví dụ bằng ELISA hoặc các cách thông thường khác. TIGIT, PVR, Nectin-2, và DNAM có thể được phát hiện trên bề mặt của các tế bào, như các tế bào khối u, các tế bào T CD8<sup>+</sup>, các tế bào T điều hòa, tế bào NK, hoặc các tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u, ví dụ bằng hóa mô miễn dịch (IHC), miễn dịch dòng tế bào (FACS), hoặc các phương pháp đo phổ khối lượng, bao gồm sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS).

Không dự định bị ràng buộc bởi lý thuyết, việc điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế sẽ dựa trên cơ sở phong bế gắn kết TIGIT với các phối tử của nó, ví

dự PVR hoặc Nectin-2, trên tế bào tương tác và/hoặc ngăn ngừa sự tương tác của TIGIT với DNAM trên cùng tế bào. Do đó, các khối u hoặc các loại khối u hầu như có khả năng đáp ứng với việc điều trị này sẽ là khối u trong đó hoạt tính TIGIT là quan trọng với sự tiến triển khối u, sao cho việc phong bế hoạt tính TIGIT này sẽ tăng cường sự loại bỏ khối u. Đặc biệt, các mức cao của TIGIT<sup>+</sup> TIL, như các tế bào T CD8<sup>+</sup> TIGIT<sup>+</sup>, TIGIT<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> hoặc tế bào NK TIGIT<sup>+</sup>, sẽ gợi ý các khối u có khả năng đáp ứng với việc điều trị kháng TIGIT đối kháng. Mức độ biểu hiện DNAM trên các TIGIT<sup>+</sup> TIL này sẽ gợi ý thêm rằng khối u này có thể đáp ứng với việc điều trị kháng TIGIT. Tương tự, các khối u mà biểu hiện các mức cao của phối tử TIGIT PVR và/hoặc Nectin-2, trên chính các tế bào khối u hoặc trên các tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u, cũng sẽ là các khối u dự tuyển tốt để điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế.

Việc sàng lọc các mức độ biểu hiện của các protein của con đường TIGIT có thể được thực hiện ở mức chọn lọc thông tin biểu thị trị liệu hoặc ở mức đối tượng bị bệnh riêng (“sự phân loại đối tượng bị bệnh”). Ví dụ, các mức độ biểu hiện có thể được xác định trong các mẫu mô từ nhiều đối tượng bị bệnh có mỗi trong một số bệnh ung thư khác nhau, sao cho xác định loại ung thư nào thể hiện kiểu biểu hiện protein gợi ý rằng loại ung thư cụ thể sẽ tuân theo việc điều trị bằng các MAb kháng TIGIT đối kháng theo sáng chế. Ngay khi việc xác định này được thực hiện đối với một số lượng mẫu đủ để thống kê, phép trị liệu kháng TIGIT có thể được đề nghị đối với đối tượng bị bệnh riêng bất kỳ bị loại ung thư được kỳ vọng là đáp ứng với phép trị liệu kháng TIGIT. Theo cách khác, các mẫu từ các đối tượng bị bệnh riêng có thể được thử nghiệm thay vào đó, để giúp chỉ ra quyết định điều trị đặc biệt cho đối tượng bị bệnh đó.

Do các tế bào liên quan cần được thử nghiệm để biểu hiện con đường TIGIT, các protein là các protein trong khối u và vi môi trường bao quanh, việc sàng lọc như vậy là cần thiết để thu mẫu khối u, ví dụ bằng cách sinh thiết hoặc cắt bỏ.

Do đó, sáng chế cũng mô tả các phương pháp nhận diện các loại khối u hoặc các khối u cụ thể mà là khối u dự tuyển tốt để điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT đối kháng theo sáng chế bằng cách đo hàm lượng của TIGIT trong tế bào T CD8<sup>+</sup> thâm nhiễm, tế bào T<sub>regs</sub> hoặc tế bào NK, và/hoặc bằng cách đo mức độ biểu hiện của PVR và/hoặc Nectin-2 trong các tế bào khối u hoặc các tế bào dạng tủy thâm nhiễm khối u.

Theo một ví dụ, phép trị liệu kháng TIGIT được sử dụng thay cho, cùng với, hoặc bổ sung với, việc điều trị bằng chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1. Các khối u biểu hiện mức độ biểu hiện PVR/Nectin-2 cao và mức độ biểu hiện PD-L1 thấp có thể được điều trị bằng kháng thể kháng TIGIT dưới dạng phép trị liệu đơn trị, hoặc kháng thể kháng TIGIT kết hợp với một chất miễn dịch ung thư khác không phải là chất đối kháng PD-1/PD-L1 nếu có cơ sở sinh học hợp lý đối với chất này. Các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế có thể được sử dụng gần như đồng thời với các kháng thể kháng PD-1/PD-L1 trong các khối u biểu hiện mức độ biểu hiện PVR/Nectin-2 cao và cả mức độ biểu hiện PD-L1 cao. Theo cách khác, các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế có thể được sử dụng sau phép trị liệu kháng PD-1/PD-L1 ở các đối tượng bị bệnh khó chữa, các đối tượng bị bệnh tái phát, hoặc các đối tượng bị bệnh có đáp ứng không đủ hoặc chưa thỏa mãn khác bất kỳ, nếu các khối u của họ thể hiện mức độ biểu hiện PVR và/hoặc Nectin-2 tăng.

Trong các thử nghiệm để nhận diện loại khối u có khả năng tuân theo việc điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT đối kháng theo sáng chế, mức độ biểu hiện của mARN PVR của người được xác định đối với các ung thư khác nhau ở người bằng cách sử dụng tập dữ liệu TCGA. Các kết quả được thể hiện trên Fig.6A. Các kết quả được thể hiện theo thứ tự giảm dần, với các khối u có hàm lượng PVR mARN cao nhất, và do đó, hầu hết có khả năng tuân theo việc điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế, ở trên cùng.

PVR còn được phát hiện ở mức độ cao hơn nhiều trong mẫu ung thư biểu mô tuyến kết tràng so với trong mẫu đối chứng biểu mô kết tràng bằng IHC. Xem Fig.6B. Các thử nghiệm IHC khác phát hiện mức độ biểu hiện PVR tăng trong 100% mẫu ung thư tế bào gan (10/10), 90% mẫu ung thư kết-trực tràng (9/10), và 44% mẫu ung thư buồng trứng (4/9). Các kết quả này gợi ý rằng các đối tượng bị bệnh bị các ung thư này, đặc biệt là ung thư tế bào gan và đại trực tràng, sẽ là đối tượng dự tuyển tốt để điều trị bằng các kháng thể kháng TIGIT đối kháng theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, ví dụ điều trị bệnh ung thư kết-trực tràng, bao gồm việc xác định sự có mặt của sự vắng mặt của vi khuẩn trong khối u *Fusobacterium nucleatum*, sự có mặt của nó gợi ý rằng khối u này có thể là khối u dự tuyển tốt để điều trị bằng kháng thể kháng TIGIT theo sáng chế. Các phương pháp điều trị này còn tùy ý bao gồm việc dùng thuốc kháng sinh cho đối tượng có vi khuẩn trong

khối u *Fusobacterium nucleatum*, ví dụ metronidazole, piperacillin/tazobactam, ticarcillin/clavulanat, amoxicillin/sulbactam, ampicillin/sulbactam, ertapenem, imipenem, meropenem, clindamycin, hoặc cefoxitin.

Bảng 5

Danh mục trình tự

| SEQ ID NO. | Mô tả                                                |
|------------|------------------------------------------------------|
| 1          | Polypeptit TIGIT của người (NP_776160.2)             |
| 2          | 15A6 miền VH                                         |
| 3          | 15A6 miền VH A72S                                    |
| 4          | 15A6 miền VH N112T                                   |
| 5          | 15A6 miền VH A72S N112T                              |
| 6          | 15A6 miền VL                                         |
| 7          | 22G2 miền VH                                         |
| 8          | 22G2 miền VH H3Q                                     |
| 9          | 22G2 miền VL                                         |
| 10         | 11G11 miền VH                                        |
| 11         | 11G11 miền VL                                        |
| 12         | 10D7 miền VH                                         |
| 13         | 10D7 miền VL                                         |
| 14         | 15A6 CDRH1                                           |
| 15         | 15A6 CDRH2                                           |
| 16         | 15A6 CDRH3                                           |
| 17         | 15A6 CDRL1                                           |
| 18         | 15A6 CDRL2                                           |
| 19         | 15A6 CDRL3                                           |
| 20         | 22G2 CDRH1                                           |
| 21         | 22G2 CDRH2                                           |
| 22         | 22G2 CDRH3                                           |
| 23         | 22G2 CDRL1                                           |
| 24         | 22G2 CDRL2                                           |
| 25         | 22G2 CDRL3                                           |
| 26         | 11G11 CDRH1                                          |
| 27         | 11G11 CDRH2                                          |
| 28         | 11G11 CDRH3                                          |
| 29         | 11G11 CDRL1                                          |
| 30         | 11G11 CDRL2                                          |
| 31         | 11G11 CDRL3                                          |
| 32         | 10D7 CDRH1                                           |
| 33         | 10D7 CDRH2                                           |
| 34         | 10D7 CDRH3                                           |
| 35         | 10D7 CDRL1                                           |
| 36         | 10D7 CDRL2                                           |
| 37         | 10D7 CDRL3                                           |
| 38         | Epitop 22G2/15A6 – huTIGIT các gốc 58 – 76           |
| 39         | Epitop 22G2 – huTIGIT các gốc 107 – 117              |
| 40         | Epitop 11G11 – huTIGIT các gốc 56 – 76               |
| 41         | Epitop 11G11 – huTIGIT các gốc 111 – 114             |
| 42         | Epitop 11G11 – huTIGIT các gốc 120 – 139             |
| 43         | Epitop 15A6 – huTIGIT các gốc 132 – 139              |
| 44         | Epitop lõi 22G2/11G11/15A6 – huTIGIT các gốc 65 – 76 |

|    |                                                  |
|----|--------------------------------------------------|
| 45 | Miền ổn định IgG1f (người)                       |
| 46 | Miền ổn định IgG1, biến thể alotyp (người)       |
| 47 | Miền ổn định IgG1.3 (người)                      |
| 48 | Miền ổn định IgG1.1f (người)                     |
| 49 | Miền ổn định kappa (người)                       |
| 50 | Tiền chất PVR/CD155 alpha (người) NP_006496.4    |
| 51 | Tiền chất PVR/CD155 beta (người) NP_001129240.1  |
| 52 | Tiền chất PVR/CD155 gama (người) NP_001129241.1  |
| 53 | Tiền chất PVR/CD155 delta (người) NP_001129242.2 |

Liên quan đến các trình tự kháng thể, danh mục trình tự cung cấp các trình tự của các vùng biến đổi trưởng thành của các chuỗi nặng và nhẹ, tức là các trình tự không chứa các peptit tín hiệu.

Phương án tương đương:

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết, hoặc có thể xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm không vượt quá thường quy, nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Các phương án tương đương này được dự định bao gồm bởi yêu cầu bảo hộ sau.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết với thụ thể miễn dịch tế bào T có miền Ig và miền ITIM của người (TIGIT- human T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) chứa a) miền biến đổi chuỗi nặng chứa: i) CDRH1 chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20; ii) CDRH2 chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.21; và iii) CDRH3 chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.22; và b) miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa: i) CDRL1 chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.23; ii) CDRL2 chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.24; và iii) CDRL3 chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.25.
2. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể phân lập này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều chuỗi nặng và một hoặc nhiều chuỗi nhẹ, trong đó: a) chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự SEQ ID NO.7; và b) chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 80% so với trình tự SEQ ID NO.9.
3. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể phân lập này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều chuỗi nặng và một hoặc nhiều chuỗi nhẹ, trong đó: a) chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7; và b) chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.
4. Kháng thể phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1 của người hoặc biến thể của nó có chức năng hiệu ứng được gia tăng.
5. Kháng thể phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là biến thể Fc IgG1 của người có chức năng hiệu ứng được giảm hoặc loại bỏ.
6. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó kháng thể phân lập này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các đột biến sau: L234A, L235E, G237A, A330S và P331S (SEQ ID NO.48) được đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự EU.

7. Kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể phân lập này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều chuỗi nặng và một hoặc nhiều chuỗi nhẹ, trong đó: a) chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7 và vùng hằng định chuỗi nặng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.48; và b) chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 và vùng hằng định chuỗi nhẹ có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.49.

8. Axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

9. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 8.

10. Tế bào vật chủ được biến nạp bằng: i) vector biểu hiện theo điểm 9; hoặc ii) vector biểu hiện thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và vector biểu hiện thứ hai mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

11. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 10 trong các điều kiện cho phép sản sinh kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, và tinh chế kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này từ tế bào.

12. Thuốc để tăng cường đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên ở đối tượng, chứa kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

13. Thuốc để làm giảm hoặc loại bỏ tế bào T điều hòa ở khối u của đối tượng bị bệnh, chứa kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

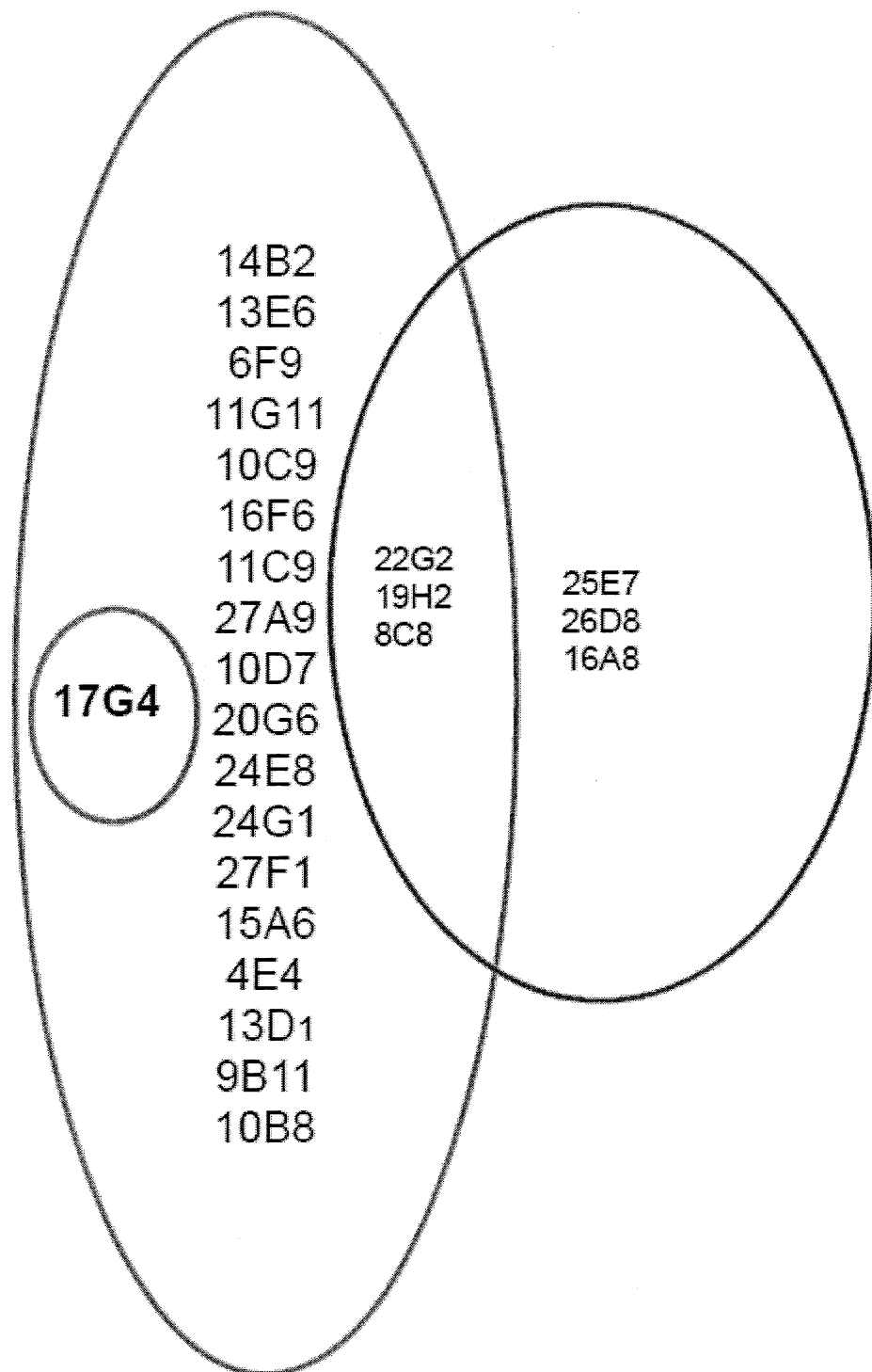
14. Thuốc để điều trị ung thư, chứa kháng thể phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

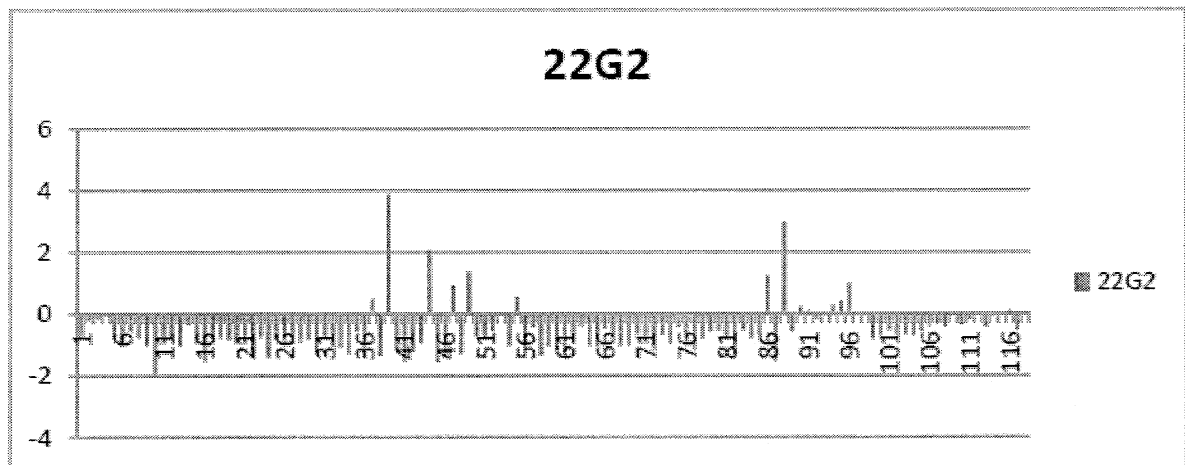
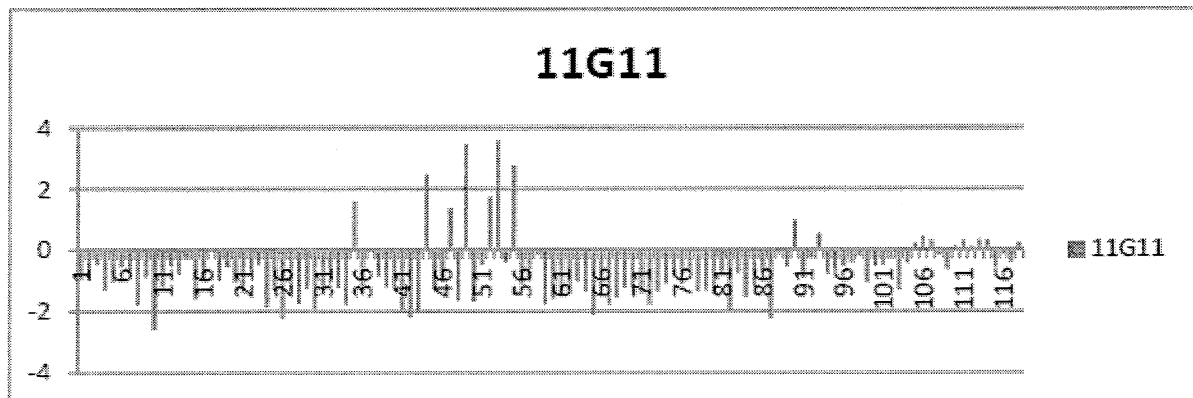
15. Kháng thể đặc hiệu kép chứa miền gắn kết kháng nguyên thứ nhất và miền gắn kết kháng nguyên thứ hai, trong đó: a) miền gắn kết kháng nguyên thứ nhất có nguồn gốc từ

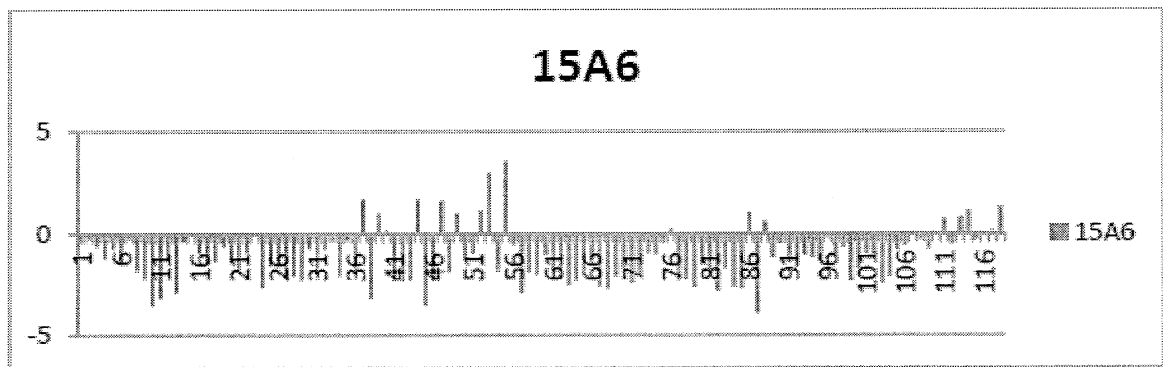
kháng thể kháng huTIGIT theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3; và b) miền gắn kết kháng nguyên thứ hai có nguồn gốc từ kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng CTLA-4, và kháng thể kháng PD-L1.

16. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 15, trong đó miền gắn kết kháng nguyên thứ hai có nguồn gốc từ kháng thể kháng PD-1.

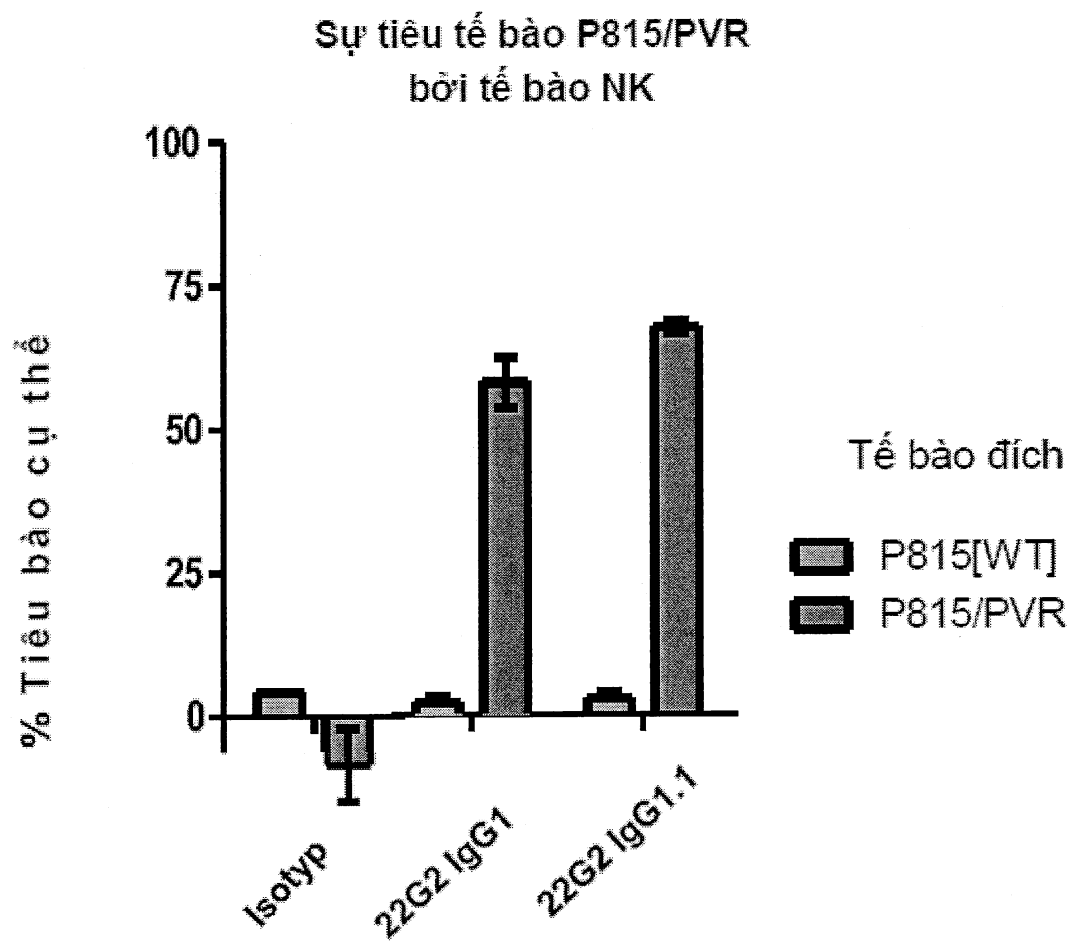
17. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 15, trong đó miền gắn kết kháng nguyên thứ hai có nguồn gốc từ kháng thể kháng PD-L1

**Fig.1**

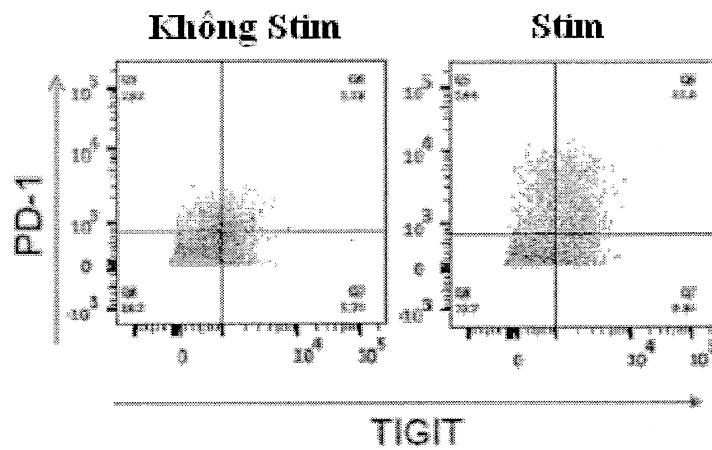
**Fig.2A****Fig.2B**



**Fig.2C**

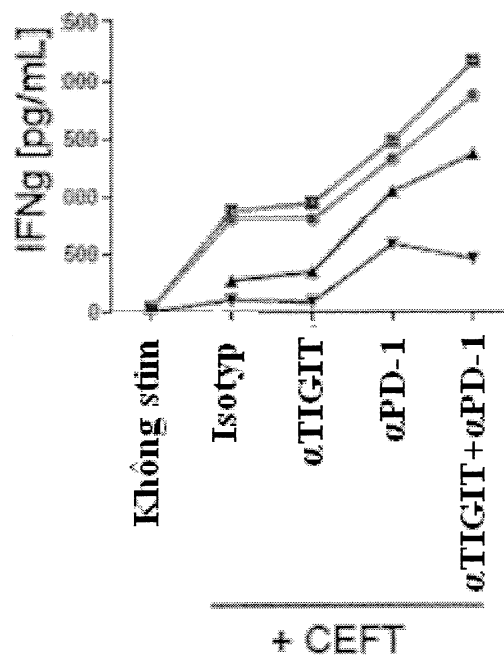
**Fig.3**

Sự điều chỉnh tăng TIGIT và PD1  
trên các tế bào T CD8<sup>+</sup>

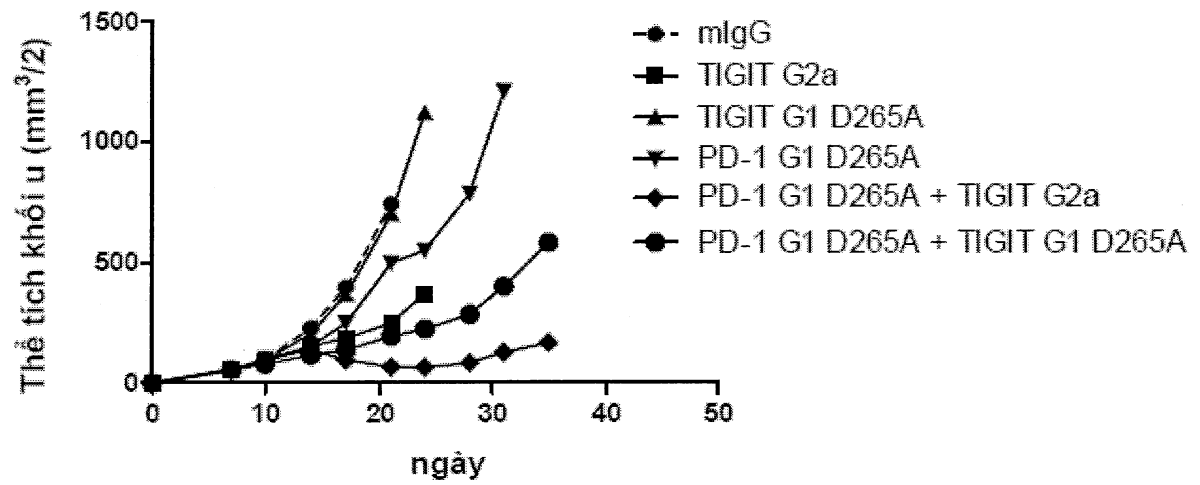


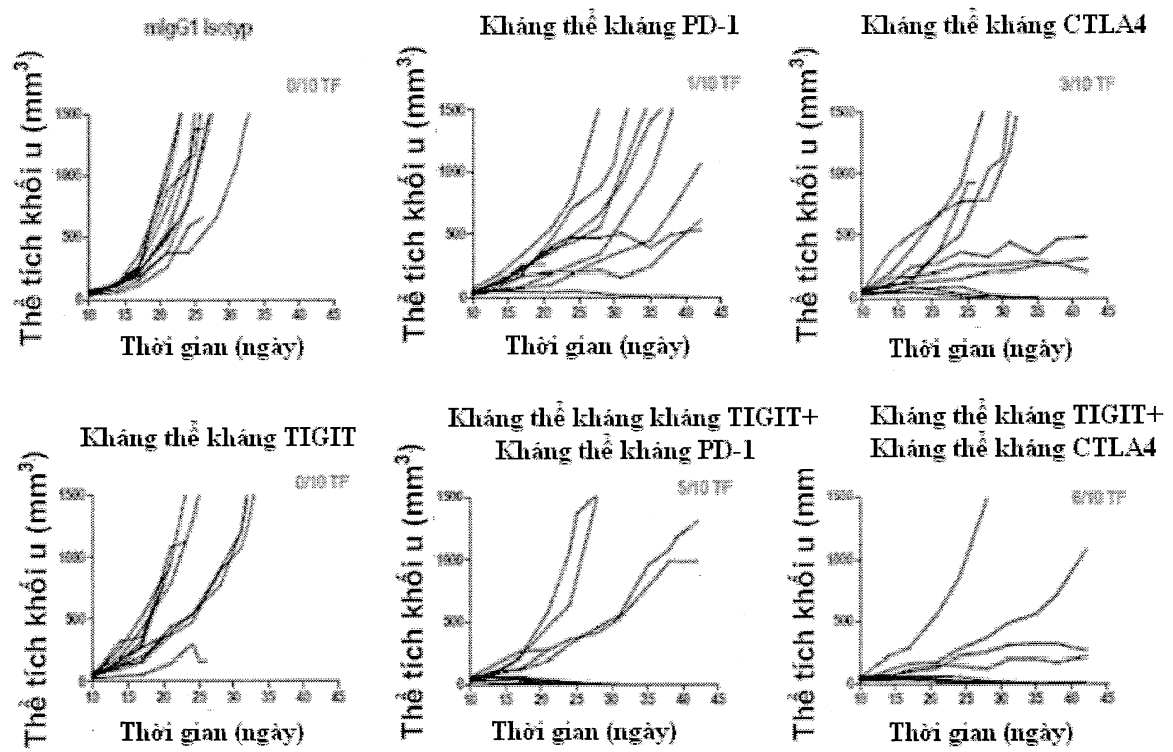
**Fig.4A**

Mức độ tăng sự sản sinh IFN $\gamma$



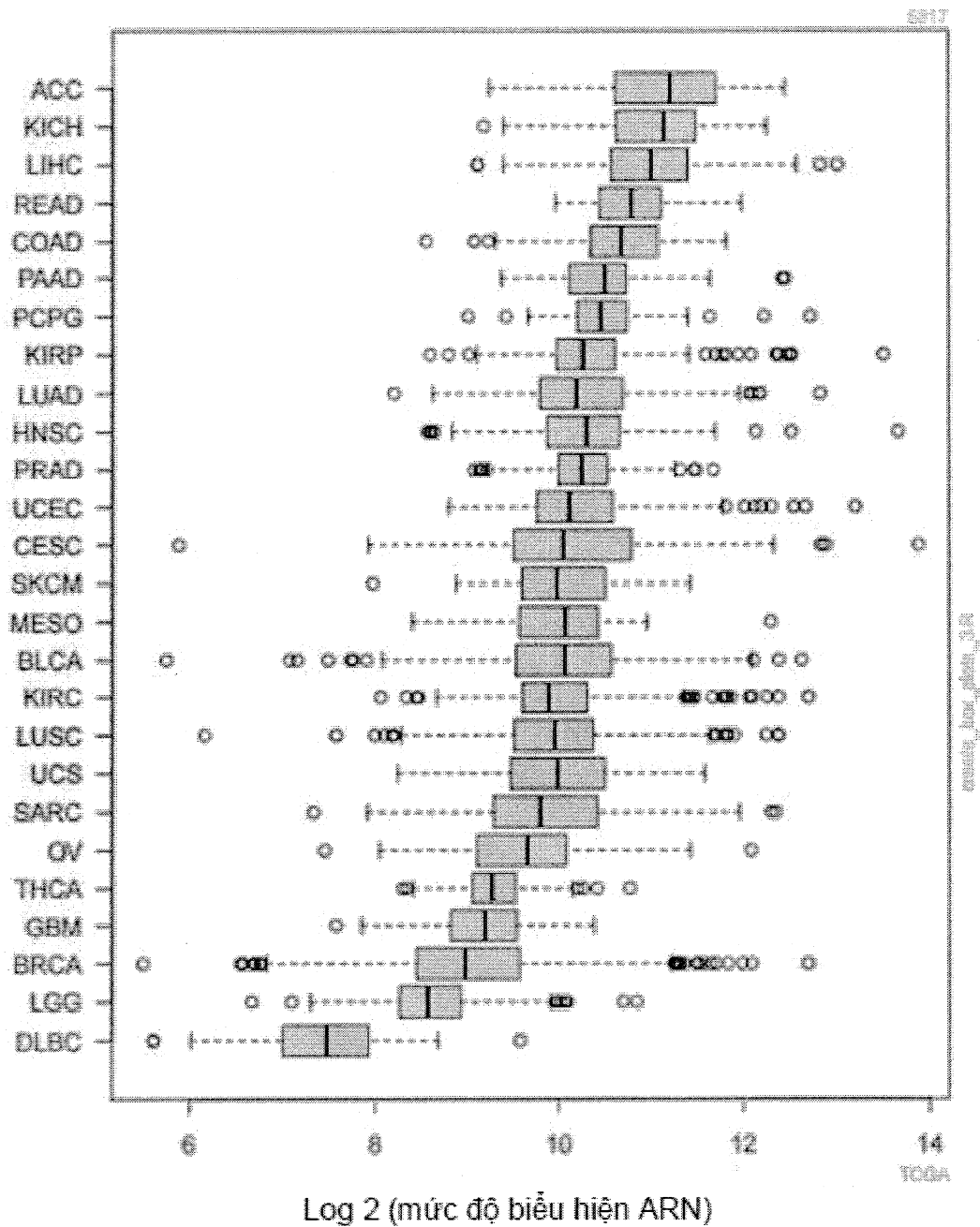
**Fig.4B**

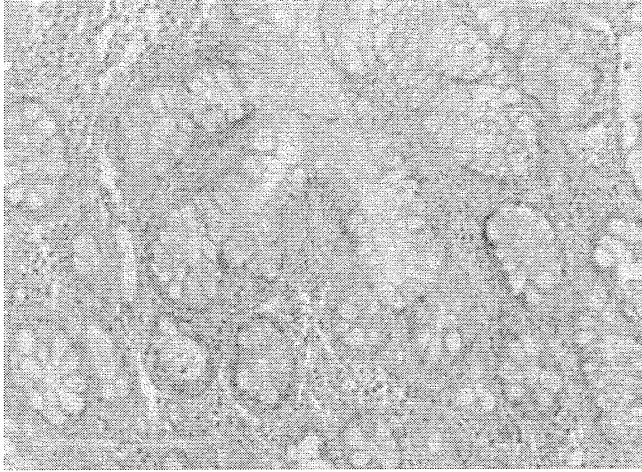
**Fig.5A**



**Fig.5B**

## Mức độ biểu hiện của PVR trong dữ liệu RNAseq TCGA

**Fig.6A**

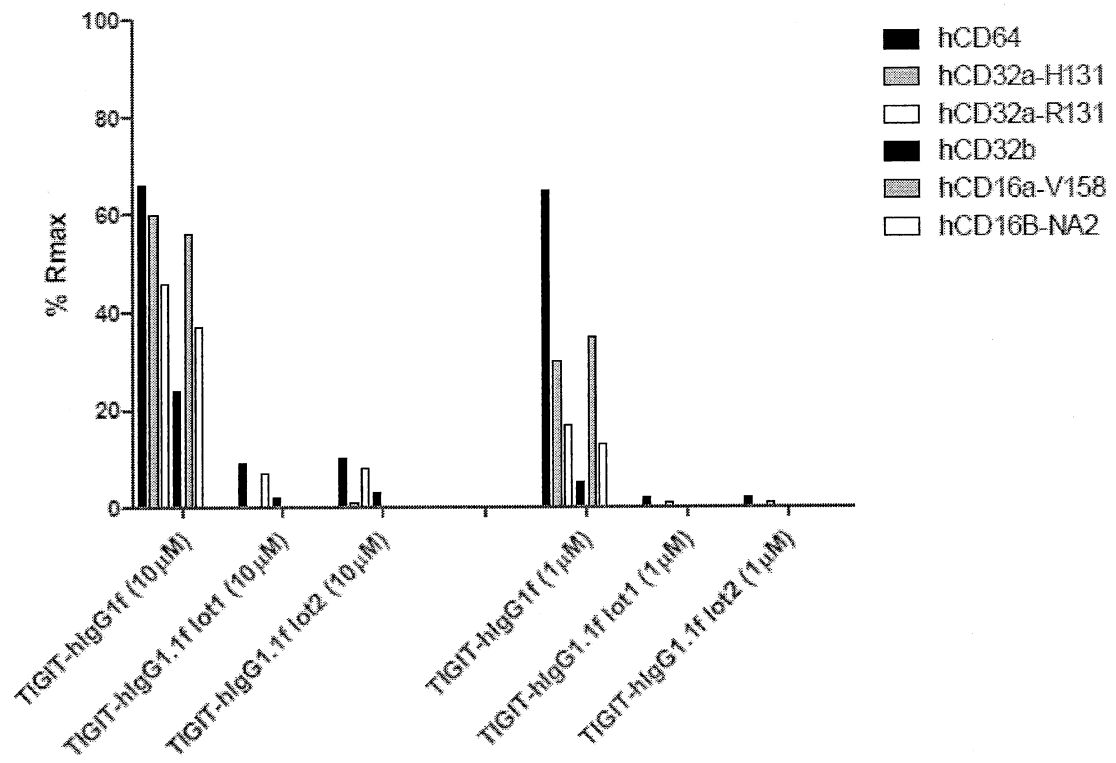


**Biểu mô kết tràng**



**Ung thư biểu mô tuyến kết tràng**

**Fig.6B**

**Fig.7**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY  
 <120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT VỚI THỤ THỂ MIỄN DỊCH TẾ BÀO T CÓ MIỄN Ig VÀ ITIM CỦA NGƯỜI VÀ  
 PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY  
 <130> 12437-WO-PCT  
 <150> 62/096,267  
 <151> 2014-12-23  
 <160> 53  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn  
 20 25 30  
 Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser  
 35 40 45  
 Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln  
 85 90 95  
 Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr  
 100 105 110  
 Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu  
 115 120 125  
 Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly  
 130 135 140  
 Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val  
 145 150 155 160  
 Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu  
 165 170 175  
 Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser  
 180 185 190  
 Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala  
 195 200 205  
 Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp  
 210 215 220  
 Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe  
 225 230 235 240  
 Thr Glu Thr Gly  
 <210> 2  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Arg Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ala Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Ser Ser Ser Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Asn  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 3  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Trình tự của người chứa đột biến A72S  
 <400> 3  
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

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

<210> 4  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Trình tự của người chứa đột biến N112Q  
 <400> 4

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

<210> 5  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Trình tự của người chứa đột biến A72S và N112T  
 <400> 5

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

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

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

<210> 7  
 <211> 130

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20          25          30
Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35          40          45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50          55          60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65          70          75          80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85          90          95
Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
100         105         110
Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115         120         125
Ser Ser
130
<210> 8
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự của người chứa đột biến H3Q
<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20          25          30
Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35          40          45
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50          55          60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65          70          75          80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85          90          95
Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
100         105         110
Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115         120         125
Ser Ser
130
<210> 9
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85          90          95
Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100         105
<210> 10
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20          25          30
Ser His Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35          40          45
Trp Ile Gly Asn Ile Phe Tyr Ser Gly His Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50          55          60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

```

```

65          70          75          80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85          90          95
Cys Ala Arg Gln Gly Leu Leu Trp Phe Gly Gly Leu Ser Pro Tyr Tyr
      100          105          110
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125
<210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35          40          45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
      85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100          105
<210> 12
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Arg Asn Tyr
      20          25          30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35          40          45
Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Tyr
      100          105          110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120          125
<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
      20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35          40          45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
      85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
      100          105
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Ser Ser Arg Tyr Phe Trp Gly
1          5
<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Tyr Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

```

```

1           5           10           15
<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Ser Ser Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr
1           5
<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1           5           10
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1           5
<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19
Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Tyr Thr
1           5
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Ser Gly Ile Tyr Tyr Trp Ser
1           5
<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1           5           10           15
<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr Tyr Phe Phe
1           5           10           15
Gly Val Asp Val
20
<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1           5           10
<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1           5
<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Phe Thr
1           5           10
<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26
Ser Ser Ser His Tyr Trp Gly

```

```

1          5
<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27
Asn Ile Phe Tyr Ser Gly His Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28
Gln Gly Leu Leu Trp Phe Gly Gly Leu Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1          5          10          15
<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1          5          10
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1          5
<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1          5
<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32
Asn Tyr Ala Ile Ser
1          5
<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 33
Gly Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1          5          10          15
Gly
<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34
Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1          5          10          15
Met Asp Val
<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1          5          10
<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 36
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1          5
<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile Thr

```

```

1           5
<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu
1           5           10           15
Gly Trp His
<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 39
Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
1           5           10
<210> 40
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40
Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala
1           5           10           15
Asp Leu Gly Trp His
20
<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41
His Thr Tyr Pro
1
<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42
Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly
1           5           10           15
Ala Arg Phe Gln
20
<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln
1           5
<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 44
Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His
1           5           10
<210> 45
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85           90           95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130          135          140

```

```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225          230          235          240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
          325

```

```

<210> 46
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 46

```

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
          325

```

```

<210> 47
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 47

```

```

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

```

```

      20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100      105      110
Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115      120      125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145      150      155      160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165      170      175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210      215      220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
      225      230      235      240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245      250      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      325

```

```

<210> 48
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48

```

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100      105      110
Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115      120      125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145      150      155      160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165      170      175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205
Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210      215      220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
      225      230      235      240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245      250      255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260      265      270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

```

```

      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
  290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
  305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

<210> 49
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1      5      10      15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20      25      30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35      40      45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50      55      60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65      70      75      80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85      90      95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100      105

<210> 50
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Trình tự tín hiệu
<222> (1)..(20)
<400> 50
Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1      5      10      15
Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Gln
 20      25      30
Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
 35      40      45
Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
 50      55      60
Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
 65      70      75      80
Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
 85      90      95
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
 100      105      110
Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
 115      120      125
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
 130      135      140
Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
 145      150      155      160
Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
 165      170      175
Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
 180      185      190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
 195      200      205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
 210      215      220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
 225      230      235      240
Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
 245      250      255
Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
 260      265      270
Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
 275      280      285
Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
 290      295      300
Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
 305      310      315      320
Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
 325      330      335
His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
 340      345      350
Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser

```

```

          355          360          365
Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
   370          375          380
Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala
385          390          395          400
Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr
          405          410          415
Arg

```

```

<210> 51
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Trình tự tín hiệu
<222> (1)..(27)
<400> 51

```

```

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
1          5          10          15
Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
          20          25          30
Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
          35          40          45
Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
50          55          60
Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
65          70          75          80
Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
          85          90          95
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
          100          105          110
Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
          115          120          125
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
          130          135          140
Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
145          150          155          160
Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
          165          170          175
Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
          180          185          190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
          195          200          205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
210          215          220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
225          230          235          240
Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
          245          250          255
Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
          260          265          270
Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
          275          280          285
Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
290          295          300
Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
305          310          315          320
Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
          325          330          335
His Ser Gly Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser
          340          345          350
Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr
          355          360          365
Glu Gly Thr Arg
370

```

```

<210> 52
<211> 364
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Trình tự tín hiệu
<222> (1)..(27)
<400> 52

```

```

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
1          5          10          15
Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
          20          25          30
Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro

```

```

      35              40              45
Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
  50              55              60
Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
  65              70              75              80
Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
      85              90              95
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
      100              105              110
Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
      115              120              125
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
      130              135              140
Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
      145              150              155              160
Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
      165              170              175
Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
      180              185              190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
      195              200              205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
      210              215              220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
      225              230              235              240
Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
      245              250              255
Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
      260              265              270
Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
      275              280              285
Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
      290              295              300
Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
      305              310              315              320
Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Gly Thr Glu His Ala Ser
      325              330              335
Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu Asn
      340              345              350
Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg
      355              360

```

```

<210> 53
<211> 392
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Trình tự tín hiệu
<222> (1)..(27)
<400> 53

```

```

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
  1              5              10              15
Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
      20              25              30
Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
      35              40              45
Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
      50              55              60
Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
      65              70              75              80
Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
      85              90              95
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
      100              105              110
Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
      115              120              125
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
      130              135              140
Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
      145              150              155              160
Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
      165              170              175
Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
      180              185              190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
      195              200              205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
      210              215              220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
      225              230              235              240

```

```

Tyr  Pro  Pro  Glu  Val  Ser  Ile  Ser  Gly  Tyr  Asp  Asn  Asn  Trp  Tyr
      245                      250                      255
Leu  Gly  Gln  Asn  Glu  Ala  Thr  Leu  Thr  Cys  Asp  Ala  Arg  Ser  Asn  Pro
      260                      265                      270
Glu  Pro  Thr  Gly  Tyr  Asn  Trp  Ser  Thr  Thr  Met  Gly  Pro  Leu  Pro  Pro
      275                      280                      285
Phe  Ala  Val  Ala  Gln  Gly  Ala  Gln  Leu  Leu  Ile  Arg  Pro  Val  Asp  Lys
      290                      295                      300
Pro  Ile  Asn  Thr  Thr  Leu  Ile  Cys  Asn  Val  Thr  Asn  Ala  Leu  Gly  Ala
305                      310                      315                      320
Arg  Gln  Ala  Glu  Leu  Thr  Val  Gln  Val  Lys  Glu  Gly  Pro  Pro  Ser  Glu
      325                      330                      335
His  Ser  Gly  Met  Ser  Arg  Asn  Ala  Ile  Ile  Phe  Leu  Val  Leu  Gly  Ile
      340                      345                      350
Leu  Val  Phe  Leu  Ile  Leu  Leu  Gly  Ile  Gly  Ile  Tyr  Phe  Tyr  Trp  Ser
      355                      360                      365
Lys  Cys  Ser  Arg  Glu  Val  Leu  Trp  His  Cys  His  Leu  Cys  Pro  Ser  Ser
      370                      375                      380
Glu  His  His  Gln  Ser  Cys  Arg  Asn

```

385

390