



(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)



1-0031708

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 37/00; A61P 31/00; (13) B
A61P 35/00

-
- (21) 1-2017-03316 (22) 26/01/2016
(86) PCT/IB2016/050383 26/01/2016 (87) WO 2016/120789 A1 04/08/2016
(30) 62/108,605 28/01/2015 US; 62/192,331 14/07/2015 US; 62/247,355 28/10/2015 US
(45) 25/04/2022 409 (43) 26/03/2018 360A
(73) 1. GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT
LIMITED (GB)
980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW89GS, United Kingdom
2. INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE) (FR)
101, rue de Tolbiac, 75013 Paris, France
3. INSTITUT JEAN PAOLI & IRENE CALMETTES (FR)
Centre Régional de Lutte contre le Cancer, 232 boulevard de Sainte
Marguerite, 13009 Marseille, France
4. UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE (FR)
58 Bd Charles Livon, 13007 Marseille, France
5. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (FR)
3, rue Michel-Ange 75016 Paris, France
(72) LIU, Yao-Bin (CN); PARMAR, Radha Shah (GB); MAYES, Patrick (US); OLIVE,
Daniel (FR).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

(54) PROTEIN LIÊN KẾT YẾU TỐ ĐỒNG KÍCH THÍCH TẾ BÀO T CẢM ỨNG
(ICOS) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết yếu tố đồng kích thích tế bào T cảm ứng (ICOS) hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó mà là chất chủ vận đối với ICOS từ người và không cảm ứng bỏ thể, ADCC, hoặc CDC khi được cho tiếp xúc với tế bào T in vivo và phương pháp điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết bằng protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó. Ngoài ra, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể hoạt hóa tế bào T khi được cho tiếp xúc với tế bào T; kích thích sự tăng sinh tế bào T khi được cho tiếp xúc với tế bào T và/hoặc gây ra sự sản sinh xytokin khi được cho tiếp xúc với tế bào T. Sáng chế đề cập với protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; và/hoặc SEQ ID NO:6. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế liên quan đến liệu pháp miễn dịch trong việc điều trị bệnh ở người và việc làm giảm biến chứng bất lợi liên quan đến các bệnh này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein liên kết ICOS bao gồm kháng thể chủ vận ICOS và việc sử dụng chúng làm chất điều biến miễn dịch trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc tăng cường chức năng tế bào T chống khối u và cảm ứng sự tăng sinh tế bào T là phương pháp mới và hiệu quả để điều trị bệnh ung thư. Ba kháng thể miễn dịch điều trị ung thư (ví dụ, chất điều biến miễn dịch) hiện có bán trên thị trường. Kháng thể kháng CTLA-4 (YERVOY/ipilimumab) được cho là làm tăng đáp ứng miễn dịch ở thời điểm miễn cảm kỳ đầu của tế bào T và kháng thể kháng PD-1 (OPDIVO/nivolumab và KEYTRUDA/pembrolizumab) được cho là tác động trong vi môi trường khối u cục bộ, bằng cách làm giảm mức kiểm soát ức chế trong tế bào T đặc hiệu khối u mà đã được miễn cảm và được hoạt hóa.

ICOS là thụ thể tế bào T đồng kích thích bằng mối quan hệ chức năng và cấu trúc với siêu họ CD28/CTLA-4-Ig (Hutloff, et al., "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28", *Nature*, 397: 263-266 (1999)). Sự hoạt hóa ICOS xảy ra qua liên kết bởi ICOS-L (B7RP-1/B7-H2). Cả B7-1 và B7-2 (phối tử của CD28 và CTLA4) đều không liên kết hoặc hoạt hóa ICOS. Tuy nhiên, ICOS-L đã được xác định là liên kết yếu với cả CD28 và CTLA-4 (Yao S et al., "B7-H2 is an costimulatory ligand for CD28 in human", *Immunity*, 34(5): 729-40 (2011)). Sự biểu hiện ICOS được cho là bị giới hạn ở tế bào T. Mức biểu hiện ICOS thay đổi giữa các nhóm phụ tế bào T khác nhau và dựa trên trạng thái hoạt hóa tế bào T. Sự biểu hiện ICOS đã được xác định trên TH17 nghỉ, tế bào T trợ giúp có nang (TFH) và tế bào T điều hòa (Treg); tuy nhiên, không giống với CD28; nó không được biểu hiện nhiều trên quần thể tế bào T hiệu lực TH1 và TH2 nguyên vẹn (Paulos CM et al., "The inducible costimulator (ICOS) is a critical for development of human Th17 cells", *Sci Transl Med*, 2(55): 55ra78 (2010)). Sự biểu hiện ICOS được cảm ứng mạnh trên tế bào T hiệu lực CD4+ và CD8+ sau khi hoạt hóa nhờ sự

gắn kết TCR (Wakamatsu E, et al., “Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4⁺ T cells”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(3); 1023-8 (2013)). Tín hiệu đồng kích thích nhờ thụ thể ICOS chỉ xảy ra trong tế bào T mà nhận được tín hiệu hoạt hóa TCR đồng thời (Sharpe AH and Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”, *Nat. Rev Immunol*, 2(2); 116-26 (2002)). Đối với tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được hoạt hóa, ICOS điều hòa quá trình sản sinh của cả xytokin T_H1 và T_H2 bao gồm IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, IL-13 và các yếu tố khác. ICOS còn kích thích sự tăng sinh tế bào T hiệu lực, mặc dù ở mức thấp hơn CD28 (Sharpe AH và Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”, *Nat. Rev Immunol*, 2(2); 116-26 (2002))

Sự tăng nhanh về số lượng các tài liệu chuyên ngành đã hỗ trợ ý tưởng rằng việc hoạt hóa ICOS trên tế bào T hiệu lực CD4⁺ và CD8⁺ có tác dụng chống khối u. Protein dung hợp ICOS-L-Fc làm chậm sự phát triển khối u và việc loại bỏ hoàn toàn khối u ở chuột có các khối u đồng ghép SA-1 (sarcoma, hay các khối u ung thư (ác tính) của mô liên kết), Meth (sarcoma sợi), EMT6 (ung thư vú) và P815 (u tế bào bón) và EL-4 (u tương bào), ngược lại không quan sát thấy tác dụng đối với mẫu khối u B16-F10 (khối u ác tính) mà được xác định là có tính tạo miễn dịch kém (Ara G et al., “Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts”, *Int. J Cancer*, 103(4); 501-7 (2003)). Hoạt tính chống khối u của ICOS-L-Fc phụ thuộc vào đáp ứng miễn dịch nguyên vẹn, vì hoạt tính này bị mất hiệu lực hoàn toàn trong khối u được phát triển trong chuột thiếu hụt miễn dịch. Việc phân tích khối u ở chuột được điều trị bằng ICOS-L-Fc cho thấy sự tăng đáng kể về sự thâm nhiễm tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ trong khối u đáp ứng với việc điều trị, mà hỗ trợ cho tác dụng kích thích miễn dịch của ICOS-L-Fc trong các mẫu này.

Một báo cáo khác sử dụng chuột ICOS^{-/-} và ICOS-L^{-/-} đã cho thấy sự cần thiết của việc truyền tín hiệu ICOS trong việc tạo ra hoạt tính chống khối u của kháng thể kháng CTLA4 trong mẫu khối u đồng ghép ác tính B16/B16 (Fu T et al., “The ICOS/ICOSL pathway required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy”, *Cancer Res*, 71(16); 5445-54 (2011)). Chuột thiếu hụt ICOS hoặc ICOS-L có mức giảm đáng kể về tỷ lệ sống sót so với chuột dòng hoang dại sau khi được điều trị bằng kháng thể kháng CTLA4. Trong một nghiên cứu khác, tế bào khối u B16/B16 được biến đổi để biểu hiện quá mức ICOS-L ở chuột tái tổ hợp. Các khối u này được xác định là nhạy hơn một cách đáng kể với việc điều trị bằng kháng thể kháng CTLA4 so với tế bào khối u B16/B16 được biến đổi với protein đối chứng (Allison J et al., “Combination immunotherapy for the

treatment of cancer”, WO2011/041613 A2 (2009)). Các nghiên cứu này cung cấp các dữ liệu về hiệu lực chống khối u của chất chủ vận ICOS, riêng rẽ và kết hợp với kháng thể điều hòa miễn dịch khác.

Việc kết hợp dữ liệu từ bệnh nhân được điều trị bằng kháng thể kháng CTLA4 còn cho thấy vai trò quan trọng của tế bào T hiệu lực ICOS⁺ trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch chống khối u. Bệnh nhân có khối u ác tính di căn (Giacomo AMD et al., “Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who respond to ipilimumab 10mg/kg within expanded access program”, *Cancer Immunol Immunother.*, 62(6); 1021-8 (2013)); urothelial (Carthon BC et al., “Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in setting of presurgical clinical trial” *Clin Cancer Res.*, 16(10); 2861-71 (2010)); ung thư vú (Vonderheide RH et al., “Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patients T cells”, *Clin Cancer Res.*, 16(13); 3485-94 (2010)); và bệnh ung thư tuyến tiền liệt mà gia tăng số lượng tuyệt đối của các tế bào T CD4⁺ICOS⁺ và CD8⁺ICOS⁺ tuần hoàn và xâm nhập khối u sau khi điều trị bằng ipilimumab có hiệu quả điều trị tốt hơn một cách đáng kể so với bệnh nhân trong đó quan sát được sự tăng rất nhỏ hoặc không tăng. Điều quan trọng là, nó cho thấy rằng ipilimumab làm thay đổi tỷ lệ T hiệu lực ICOS⁺:T_{reg}, mà làm đảo ngược mức dư thừa của việc điều trị sơ bộ T_{regs} đến mức có ý nghĩa của T hiệu lực so với T_{regs} sau khi điều trị (Liakou CI et al., “CTLA-4 blockade increases IFN-gamma producing CD4⁺ICOS⁺ cells to shift ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients”, *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(39); 14987-92 (2008)) và (Vonderheide RH et al., *Clin Cancer Res.*, 16(13); 3485-94 (2010)). Do đó, tế bào T hiệu lực dương tính với ICOS là chất chỉ thị sinh học dự báo dương tính của đáp ứng với ipilimumab mà hướng đến lợi ích tiềm năng của việc hoạt hóa quần thể tế bào này bằng kháng thể ICOS chủ vận.

Do đó, có nhu cầu đối với phân tử cảm ứng sự tăng sinh tế bào T khác trong việc điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều: CDRH1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:1; CDRH2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:2; CDRH3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:3;

CDRL1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:4; CDRL2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:5 và/hoặc CDRL3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:6 hoặc dạng tương đương trực tiếp của mỗi CDR trong đó dạng tương đương trực tiếp có không nhiều hơn hai sự thể axit amin trong CDR.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với ICOS từ người trong đó protein liên kết ICOS này bao gồm vùng V_H chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:7 và/hoặc vùng V_L chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:8.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được nhân hóa hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa CDR chuỗi nặng có trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; và SEQ ID NO:3 và CDR chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; và SEQ ID NO:6. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được nhân hóa mà chứa bộ khung isotyp hIgG4PE; vùng V_H chứa trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:7; và vùng V_L chứa trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Kháng thể theo sáng chế có thể kích thích sự sản sinh xytokin khi được tiếp xúc với tế bào T.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết ICOS mà cạnh tranh liên kết với ICOS từ người với bất kỳ một trong số protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết bằng protein liên kết ICOS hoặc được phẩm chứa ít nhất một protein liên kết ICOS theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Quá trình sản sinh IFN- γ từ tế bào T CD4+CD25-.

Fig. 2: Sự tăng sinh trong tế bào T CD4+CD25-.

Fig. 3: Biến thể được nhân hóa H2L5 của kháng ICOS 422.2 thể hiện sự sản sinh xytokin tốt hơn trong tế bào PBMC.

Fig. 4: 422 H2L5 IgG1 làm giảm tỷ lệ sống sót của tế bào T mà không xuất hiện với isotyp hIgG4PE hoặc được làm bất hoạt Fc.

Fig. 5: Đáp ứng liều của H2L5 hIgG4PE cảm ứng xytokin gây viêm trong tế bào T CD4+ từ người.

Fig. 6: H2L5 hIgG4PE cảm ứng sự tăng sinh, sự sản sinh xytokin và làm tăng khả năng gây độc tế bào trong PBMC được hoạt hóa từ người cho khỏe mạnh.

Fig. 7: Thử nghiệm phát hiện cỡ trung bình (Meso Scale Discovery- MSD) thể hiện sự ức chế việc liên kết ICOS-L với ICOS bằng H2L5 hIgG4PE, mà chỉ ra rằng nó liên kết với cùng một epitop (quyết định kháng nguyên) trên ICOS như ICOS-L và cạnh tranh liên kết.

Fig. 8: Gen VH và VL của kháng thể được thu hồi từ ARN của dòng tế bào lai 422.2.

Fig. 9: Trình tự protein của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của H2L5 hIgG4PE với trình tự tín hiệu.

Fig. 10: Trình tự ADN của vùng mã hóa của chuỗi nặng H2L5 hIgG4PE với trình tự tín hiệu.

Fig. 11: Trình tự ADN của vùng mã hóa của chuỗi nhẹ H2L5 hIgG4PE với trình tự tín hiệu.

Fig. 12: Nồng độ trong huyết tương của H2L5 hIgG4PE trong khỉ Cynomolgus. Nồng độ được xác định sau liều thứ nhất (A) hoặc liều thứ hai (B) (ngày 15) của H2L5 hIgG4PE. Động vật được làm an tử 48 giờ sau liều thứ hai để thu gom mẫu mô và phân tích mô bệnh học.

Fig. 13: Sự phát hiện H2L5 hIgG4PE liên kết với tế bào T CD4+ từ lá lách và hạch bạch huyết trong nách của khỉ. Mô được thu gom 48 giờ sau liều thứ hai (ngày 17).

Fig. 14: Sự chiếm giữ thụ thể của H2L5 hIgG4PE trong tế bào T CD4+ trong máu khỉ Cynomolgus.

(A) “Thụ thể không có” ICOS như được xác định bởi sự có mặt của liên kết của kháng thể kháng ICOS được đánh dấu huỳnh quang được sử dụng để đếm tế bào theo dòng, mà chỉ liên kết nếu H2L5 hIgG4PE không có mặt.

(B) H2L5 hIgG4PE được liên kết thụ thể trên tế bào CD4+ máu ngoại vi như được xác định bởi kháng thể kháng IgG từ người được đánh dấu huỳnh quang.

Fig. 15 (a) Mức biểu hiện Phospho-AKT (T308) trong tế bào Ba/F3-ICOS được điều trị bằng H2L5 hIgG4PE - Kiểu mảng một chiều của kháng thể truyền tín hiệu nội bào (b) Mức biểu hiện Phospho-AKT (S473) trong tế bào Ba/F3-ICOS được điều trị bằng H2L5 hIgG4PE - Kiểu mảng một chiều của kháng thể truyền tín hiệu nội bào.

Fig. 16: H2L5 hIgG4PE kết hợp với ipilimumab làm tăng mức sản sinh xytokin gây viêm so với việc điều trị chỉ bằng kháng thể trong thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC.

Fig. 17: H2L5 hIgG4PE kết hợp với pembrolizumab làm tăng mức sản sinh xytokin gây viêm so với việc điều trị chỉ bằng kháng thể trong thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC.

Fig. 18: Hỗn hợp H2L5 hIgG4PE với ipilimumab làm tăng mức sản sinh xytokin gây viêm trong thử nghiệm MLR được cải biến bằng peptit CEFT và ủ sơ bộ.

Fig. 19: Hỗn hợp H2L5 hIgG4PE với pembrolizumab làm tăng mức sản sinh xytokin gây viêm trong thử nghiệm MLR được cải biến bằng peptit CEFT và ủ sơ bộ.

Fig. 20: mAb chủ vận kháng ICOS H2L5 hIgG4PE riêng rẽ và kết hợp với pembrolizumab gây ức chế phát triển khối u trong mẫu khối u ở chuột có khối u ác tính PBMC A2058 từ người.

Fig. 21: mAb thay thế ở chuột kháng ICOS ức chế một cách đáng kể sự phát triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống sót kết hợp với mAb thay thế ở chuột kháng PD1 trong mẫu khối u của chuột CT26.

Fig. 22: mAb thay thế ở chuột kháng ICOS ức chế một cách đáng kể sự phát triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống sót kết hợp với mAb thay thế ở chuột kháng PD1 trong mẫu khối u của chuột EMT6.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ICOS” có nghĩa là protein đồng kích thích tế bào T cảm ứng bất kỳ. Tên gọi khác đối với ICOS (Yếu tố đồng kích thích tế bào T cảm ứng) bao gồm AILIM; CD278; CVID1, JTT-1 hoặc JTT-2, MGC39850, hoặc 8F4. ICOS là phân tử đồng kích thích siêu họ CD28 mà được biểu hiện trên tế bào T được hoạt hóa. Protein được mã hóa bằng gen này thuộc họ thụ thể bề mặt tế bào CD28 và CTLA-4. Nó tạo ra homodime và đóng vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu tế bào-tế bào, đáp ứng

miễn dịch, và điều hòa sự tăng sinh tế bào. Trình tự axit amin của ICOS từ người là SEQ ID NO:10 được thể hiện dưới đây.

MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQL
LKGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCN
LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKK
M (SEQ ID NO:10)

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ICOS-L” và “phối tử ICOS” được sử dụng thay thế lẫn nhau và đề cập đến phối tử tự nhiên liên kết màng của ICOS từ người. Phối tử ICOS là protein mà từ người được mã hóa bởi gen *ICOSLG*. *ICOSLG* còn được ký hiệu là CD275 (cụm biệt hóa 275). Tên gọi khác cho ICOS-L bao gồm B7RP-1 và B7-H2.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất chủ vận” đề cập đến protein liên kết kháng nguyên, ví dụ protein liên kết ICOS, mà khi tiếp xúc với ICOS tạo ra một hoặc nhiều yếu tố sau (1) kích thích hoặc hoạt hóa thụ thể ICOS, (2) nâng cao, gia tăng hoặc đẩy mạnh, cảm ứng hoặc kéo dài hoạt tính, chức năng hoặc sự có mặt của ICOS và/hoặc (3) nâng cao, gia tăng, đẩy mạnh hoặc tạo ra sự biểu hiện của ICOS. Hoạt tính chủ vận có thể được xác định *in vitro* bằng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc đo tín hiệu tế bào, sự tăng sinh tế bào, đầu Ứn hoạt hóa tế bào miễn dịch, sự sản sinh xytokin. Hoạt tính chủ vận còn có thể được xác định *in vivo* bằng các thử nghiệm mà xác định điểm cuối thay thế như, nhưng không chỉ giới hạn ở việc đo mức tăng sinh tế bào T hoặc mức sản sinh xytokin.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “cạnh tranh liên kết” đề cập đến protein liên kết ICOS bất kỳ mà sẽ cạnh tranh liên kết với ICOS với bất kỳ trong số các protein liên kết ICOS theo sáng chế. Việc cạnh tranh liên kết giữa hai phân tử đối với ICOS có thể được kiểm tra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này bao gồm phương pháp đếm tế bào theo dòng, phương pháp phát hiện cỡ trung bình và phương pháp ELISA. Liên kết có thể được xác định một cách trực tiếp, nghĩa là hai hoặc nhiều liên kết protein có thể được cho tiếp xúc với ICOS và việc liên kết có thể được xác định đối với một hoặc mỗi trong số chúng. Theo một phương án khác, liên kết của phân tử hoặc phân tử liên quan có thể được kiểm tra bằng liên kết hoặc phối tử tự nhiên và được so sánh định lượng với nhau.

Thuật ngữ “protein liên kết ICOS” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến các kháng thể và cấu trúc protein khác, như các vùng, mà có thể liên kết với ICOS.

Trong một số trường hợp, ICOS là ICOS từ người. Thuật ngữ “protein liên kết ICOS” có thể được sử dụng thay thế cho “protein liên kết kháng nguyên ICOS”. Do đó, như được xác định trong lĩnh vực này, kháng thể kháng ICOS và/hoặc protein liên kết kháng nguyên ICOS sẽ được xác định là protein liên kết ICOS. Trong bản mô tả này, “protein liên kết kháng nguyên” là protein bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể, vùng và cấu trúc khác như được mô tả trong bản mô tả này, mà liên kết với kháng nguyên, như ICOS. Trong bản mô tả này, “phần liên kết kháng nguyên” của protein liên kết ICOS sẽ bao gồm phần bất kỳ của protein liên kết ICOS có thể liên kết với ICOS, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể liên kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất đề cập đến phân tử có vùng giống globulin miễn dịch (ví dụ IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE) và bao gồm các kháng thể đơn dòng, tái tổ hợp, đa dòng, khảm, từ người, được nhân hóa, đa đặc hiệu, bao gồm kháng thể đặc hiệu kép, và kháng thể cộng hợp đa loài; một vùng biến đổi đơn (ví dụ, V_H , V_{HH} , V_L , kháng thể vùng (dAb^{TM})), kháng thể liên kết kháng nguyên, Fab, $F(ab')_2$, Fv, Fv có liên kết disulfua, Fv chuỗi đơn, scFv có liên kết disulfua, dime của mảnh globin miễn dịch (diabody), TANDABSTM, v.v. và dạng cải biến của bất kỳ trong số các kháng thể trên đây.

Dạng mẫu kháng thể khác bao gồm bộ khung khác trong đó một hoặc nhiều CDR của protein liên kết kháng nguyên có thể được bố trí trên bộ khung thích hợp hoặc khung protein globulin không miễn dịch, như protein cải biến có ái lực cao, bộ khung SpA, vùng A nhóm thụ thể LDL, avime (protein nhân tạo) hoặc vùng EGF.

Thuật ngữ “vùng” đề cập đến cấu trúc protein gấp nếp mà duy trì được cấu trúc bậc ba của nó phụ thuộc vào trạng thái nghỉ của protein này. Nói chung, vùng chịu trách nhiệm đối với đặc tính chức năng riêng biệt của protein và trong nhiều trường hợp có thể được bổ sung, được loại bỏ hoặc được chuyển đến protein khác mà không làm mất chức năng của phần còn lại của protein và/hoặc của vùng này.

Thuật ngữ “vùng biến đổi đơn” đề cập đến vùng polypeptit gấp nếp chứa trình tự đặc trưng của vùng biến đổi của kháng thể. Do đó nó bao gồm vùng biến đổi hoàn chỉnh của kháng thể như V_H , V_{HH} và V_L và vùng biến đổi của kháng thể được cải biến, ví dụ, trong đó một hoặc nhiều vòng được thay thế bằng trình tự mà không đặc trưng của vùng biến đổi của kháng thể, hoặc vùng biến đổi của kháng thể mà bị cắt đứt hoặc chứa phần

kéo dài đầu chặn mạch C hoặc N, cũng như mảnh gấp nếp của vùng biến đổi mà giữ được ít nhất là sự liên kết hoạt tính và tính đặc hiệu của vùng có chiều dài đầy đủ. Một vùng biến đổi đơn có thể liên kết kháng nguyên hoặc epitop độc lập với vùng hoặc miền biến đổi khác. “Kháng thể vùng” hoặc “dAb^(TM)” có thể được cho là giống như “vùng biến đổi đơn”. Vùng biến đổi đơn có thể là vùng biến đổi đơn từ người, nhưng cũng bao gồm vùng biến đổi đơn từ loài khác như cá mập Rodent Nurse Shark và V_{HH} dAbsTM họ lạc đà. V_{HH} họ lạc đà là polypeptit vùng biến đổi đơn globulin miễn dịch mà được tạo ra từ loài bao gồm lạc đà, lạc đà không bướu, lạc đà không bướu ở Nam Mỹ, lạc đà một bướu, và lạc đà rừng không bướu, mà tạo ra kháng thể có chuỗi nặng tự nhiên không có chuỗi nhẹ. Vùng V_{HH} này có thể được nhân hóa theo kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, và vùng này được gọi là “vùng biến đổi đơn”. Trong bản mô tả này, V_H bao gồm vùng V_{HH} họ lạc đà.

Mảnh liên kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách sắp xếp một hoặc nhiều CDR trên bộ khung protein không kháng thể. “Bộ khung protein” trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bộ khung globulin miễn dịch (Ig), ví dụ bộ khung IgG, mà có thể là kháng thể bốn chuỗi hoặc hai chuỗi, hoặc có thể chỉ chứa vùng Fc của kháng thể, hoặc có thể chứa một hoặc nhiều vùng hằng định từ kháng thể, vùng hằng định có thể có nguồn gốc từ người hoặc có nguồn gốc từ động vật linh trưởng, hoặc có thể là thể khám nhân tạo của vùng hằng định từ người và động vật linh trưởng.

Bộ khung protein có thể là bộ khung Ig, ví dụ IgG, hoặc bộ khung IgA. Bộ khung IgG có thể chứa một vài hoặc tất cả các vùng của kháng thể (cụ thể là CH1, CH2, CH3, V_H, V_L). Protein liên kết kháng nguyên có thể chứa bộ khung IgG được chọn từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 hoặc IgG4PE. Ví dụ, bộ khung có thể là IgG1. Bộ khung có thể bao gồm, hoặc chứa, vùng Fc của kháng thể, hoặc một phần của nó.

Bộ khung protein có thể được tạo ra từ bộ khung được chọn từ nhóm bao gồm CTLA-4, lipocalin, phân tử được tạo ra từ protein như vùng Z của protein (Protein được biến đổi có ái lực cao, SpA), vùng A (Avime/Maxibody); protein sốc nhiệt như GroEl và GroES; transferrin (trans-body); protein chứa vùng lặp lại ankyrin (DARPin); aptame peptit; vùng lectin loại C (Tetranectin); γ -crystallin từ người và ubiquitin từ người (affilin); vùng PDZ; vùng loại kunitz độc tính từ nọc độc bọ cạp của chất ức chế proteaza từ người; và fibronectin/adnectin; mà được biến đổi protein để liên kết với kháng nguyên, như ICOS, mà không phải phối tử tự nhiên.

Vị trí liên kết kháng nguyên đề cập đến vị trí trên protein liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết với kháng nguyên, mà có thể là vùng biến đổi đơn, hoặc có thể là vùng V_H/V_L được bắt cặp như có thể được tìm thấy trên kháng thể chuẩn. Vùng Fv chuỗi đơn (ScFv) còn có thể tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ “vùng liên kết epitop” đề cập đến vùng mà liên kết đặc hiệu với vùng của kháng nguyên được gọi là epitop độc lập với vùng khác.

Thuật ngữ protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu đề cập đến protein liên kết kháng nguyên mà chứa ít nhất hai vị trí liên kết kháng nguyên khác nhau. Mỗi trong số các vị trí liên kết kháng nguyên này sẽ có thể liên kết với epitop khác, mà có thể có mặt trên cùng một kháng nguyên hoặc các kháng nguyên khác nhau. Protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu sẽ có tính đặc hiệu đối với nhiều hơn một kháng nguyên, ví dụ hai kháng nguyên, hoặc với ba kháng nguyên, hoặc với bốn kháng nguyên.

Ví dụ về protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu bao gồm các protein mà bao gồm, hoặc chủ yếu bao gồm, vùng Fc của kháng thể, hoặc một phần của nó, được liên kết ở mỗi đầu, một cách trực tiếp hoặc một cách gián tiếp (ví dụ, thông qua trình tự liên kết) với vùng liên kết. Protein liên kết kháng nguyên này có thể chứa hai vùng liên kết được tách riêng bởi vùng Fc, hoặc một phần của nó. Tách riêng nghĩa là vùng liên kết không được liên kết một cách trực tiếp với một vùng khác, và có thể được bố trí ở đầu đối diện (đầu chặn mạch C và N) của vùng Fc, hoặc vùng bộ khung bất kỳ khác.

Protein liên kết kháng nguyên có thể chứa hai vùng bộ khung, mỗi vùng được liên kết với hai vùng liên kết, ví dụ ở đầu chặn mạch N và C của mỗi vùng bộ khung, một cách trực tiếp hoặc một cách gián tiếp thông qua liên kết. Mỗi vùng liên kết có thể liên kết với các kháng nguyên khác nhau.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ mAbdAb đề cập đến kháng thể đơn dòng được liên kết với vùng liên kết khác, cụ thể là vùng biến đổi đơn như kháng thể vùng. mAbdAb có ít nhất hai vị trí liên kết kháng nguyên, ít nhất một trong số chúng là từ kháng thể vùng, và ít nhất một là từ vùng V_H/V_L được bắt cặp.

"Thể tiếp hợp dAbTM" đề cập đến hỗn hợp thành phần chứa dAb mà hoạt chất được liên kết hóa học bằng liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Tốt hơn là, dAb và hoạt chất được liên kết cộng hóa trị. Liên kết cộng hóa trị có thể là thông qua liên kết peptit hoặc cách khác như thông qua chuỗi phụ được biến đổi. Liên kết không cộng hóa trị có thể

trực tiếp (ví dụ, tương tác tĩnh điện, tương tác kỵ nước) hoặc không trực tiếp (ví dụ, thông qua liên kết không cộng hóa trị với thành phần liên kết hỗ trợ (ví dụ, biotin và avidin), trong đó một thành phần được liên kết cộng hóa trị với hoạt chất và thành phần liên kết hỗ trợ được liên kết cộng hóa trị với dAbTM). Nếu thành phần liên kết hỗ trợ được sử dụng, một trong số các thành phần liên kết có thể được liên kết cộng hóa trị với hoạt chất một cách trực tiếp hoặc thông qua gốc liên kết thích hợp, và thành phần liên kết hỗ trợ có thể được liên kết cộng hóa trị với dAbTM một cách trực tiếp hoặc thông qua gốc liên kết thích hợp.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể dung hợp dAbTM" đề cập đến protein dung hợp mà chứa dAbTM và hoạt chất polypeptit (mà có thể là dAbTM hoặc mAb). DAbTM và hoạt chất polypeptit có mặt dưới dạng các phần riêng biệt (các gốc) của chuỗi polypeptit đơn liên tục.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính chéo giữa ICOS từ người và ICOS từ loài khác, như ICOS từ khỉ *Cynomolgus*. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết đặc hiệu ICOS từ người và từ khỉ *Cynomolgus*. Việc tạo ra hoạt chất mà có thể liên kết các loài người và khỉ cho phép thử nghiệm kết quả trong hệ này và so sánh trực tiếp dữ liệu sử dụng cùng một thuốc. Ngoài ra, hoạt tính chéo giữa loài khác được sử dụng trong mẫu bệnh như chó hoặc khỉ, cụ thể là khỉ cũng được dự tính.

Sự cạnh tranh giữa protein liên kết ICOS và protein tham chiếu liên kết ICOS có thể được xác định bằng phương pháp cạnh tranh MSD, ELISA, FMAT hoặc BIAcore. Theo một phương án, thử nghiệm cạnh tranh được thực hiện bằng cách so sánh protein liên kết ICOS với liên kết phối tử ICOS. Có thể có một vài lý do cho sự cạnh tranh này: hai protein có thể liên kết với cùng một epitop hoặc các epitop tương tự nhau, có thể có sự ức chế về mặt không gian đối với liên kết, hoặc sự liên kết của protein thứ nhất có thể làm thay đổi hình dáng đối với kháng nguyên mà ngăn ngừa hoặc làm giảm sự liên kết của protein thứ hai.

Thuật ngữ "thể trung hòa" trong bản mô tả này nghĩa là tương tác giữa ICOS và ICOS-L bị làm giảm với sự có mặt của protein liên kết kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả này so với tương tác của ICOS và ICOS-L mà không có protein liên kết ICOS, in vitro hoặc in vivo. Việc trung hòa có thể do một hoặc nhiều sự phong bế ICOS liên kết

với phối tử của nó, mà ngăn ngừa ICOS không được hoạt hóa bằng phối tử của nó, giảm điều hòa ICOS hoặc thụ thể của nó, hoặc ảnh hưởng đến chức năng hiệu lực. Ví dụ, sự cạnh tranh liên kết phối tử được mô tả trong ví dụ 3 và 5 có thể được sử dụng để đánh giá khả năng trung hòa của protein liên kết ICOS.

Tác dụng của protein liên kết ICOS đối với tương tác giữa ICOS và ICOS-L có thể là một phần hoặc toàn bộ. Protein liên kết ICOS trung hòa có thể phong bế tương tác của ICOS với ICOS-L đến ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% so với tương tác ICOS – ICOS-L mà không có protein liên kết ICOS.

Việc trung hòa có thể được xác định hoặc được đo bằng cách sử dụng một hoặc nhiều thử nghiệm đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả trong bản mô tả này.

Ái lực là độ bền liên kết của một phân tử, ví dụ protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, với phân tử khác, ví dụ kháng nguyên đích của nó, ở một vị trí liên kết. Ái lực liên kết của protein liên kết kháng nguyên với đích của nó có thể được xác định bằng phương pháp cân bằng (ví dụ thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA)), hoặc động học (ví dụ phân tích BIACORE™). Ví dụ, phương pháp Biacore™ được mô tả trong ví dụ 5 có thể được sử dụng để xác định ái lực liên kết.

Ái lực là tổng của độ bền liên kết của hai phân tử với một vùng khác ở các vị trí, ví dụ liên quan đến hóa trị của tương tác.

Theo một phương án, hằng số phân ly cân bằng (KD) của tương tác protein liên kết ICOS-ICOS là 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 2nM hoặc nhỏ hơn hoặc 1nM hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án khác, KD có thể nằm trong khoảng 5 và 10 nM; hoặc nằm trong khoảng 1 và 2 nM. KD có thể nằm trong khoảng 1 pM và 500 pM; hoặc nằm trong khoảng 500 pM và 1 nM. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng trị số KD càng nhỏ, liên kết càng bền. Số nghịch đảo của KD (cụ thể là 1/KD) là hằng số kết hợp cân bằng (KA) có đơn vị M⁻¹. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng trị số KA càng lớn, liên kết càng bền.

Hằng số tốc độ phân ly (kd) hoặc “mức độ tách hai phân tử ra khỏi nhau” thể hiện độ bền của phức hợp protein liên kết ICOS-ICOS, cụ thể là tỷ lệ của phức hợp mà phân

hủy mỗi giây. Ví dụ, k_d là $0,01 \text{ s}^{-1}$ tương đương với 1% của phức hợp phân hủy mỗi giây. Theo một phương án, hằng số tốc độ phân ly (k_d) là $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn. k_d có thể nằm trong khoảng $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ và $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; hoặc nằm trong khoảng $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ và $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Hằng số tốc độ kết hợp (k_a) hoặc “mức độ kết hợp hai phân tử với nhau” mô tả tốc độ của sự tạo thành phức hợp protein liên kết ICOS-ICOS. Theo một phương án, hằng số tốc độ kết hợp (k_a) là khoảng $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Thuật ngữ “được phân lập” nghĩa là phân tử, như protein liên kết kháng nguyên hoặc axit nucleic, được loại bỏ khỏi môi trường mà trong đó nó có thể được tìm thấy ở trạng thái tự nhiên. Ví dụ, phân tử có thể được tinh chế từ hỗn hợp chất mà nó thường tồn tại cùng ở trạng thái tự nhiên. Ví dụ, khối lượng của phân tử trong mẫu có thể là 95% tính theo tổng khối lượng.

Thuật ngữ “vector biểu hiện” trong bản mô tả này nghĩa là axit nucleic được phân lập mà có thể được sử dụng để bổ sung axit nucleic của phân tử liên quan vào trong tế bào, như tế bào nhân thực hoặc tế bào nhân sơ, hoặc hệ biểu hiện không chứa tế bào trong đó trình tự axit nucleic của phân tử liên quan được biểu hiện dưới dạng chuỗi peptit như protein. Vector biểu hiện này có thể là, ví dụ, cosmit, plasmit, trình tự của virus, phân tử chuyển vị, và axit nucleic mạch thẳng chứa axit nucleic của phân tử liên quan. Một khi vector biểu hiện được bổ sung vào trong tế bào hoặc hệ biểu hiện không chứa tế bào (ví dụ, dịch thủy phân hồng cầu lưới) protein được mã hóa bằng axit nucleic của phân tử liên quan được tạo ra bằng cơ chế phiên mã/dịch mã. Vector biểu hiện theo sáng chế có thể tạo ra phân tử cần thiết đối với sự biểu hiện nhân thực hoặc nhân sơ và bao gồm vector bị tác động bởi vùng khởi động của virus, như vector bị tác động bởi vùng khởi động CMV, ví dụ, pcADN3.1, pCEP4, và các dạng được tạo ra của chúng, vector biểu hiện Baculovirus, vector biểu hiện Drosophila, và vector biểu hiện mà bị tác động bởi vùng khởi động gen từ động vật có vú, như ở vùng khởi động gen Ig từ người. Ví dụ khác bao gồm vector biểu hiện nhân sơ, như vector T7 bị tác động bởi vùng khởi động, ví dụ, pET41, vector bị tác động bởi vùng khởi động lactoza và vector bị tác động bởi vùng khởi động gen arabinosa. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được các vector biểu hiện và hệ biểu hiện thích hợp khác.

Thuật ngữ “tế bào vật chủ tái tổ hợp” trong bản mô tả này nghĩa là tế bào mà chứa trình tự axit nucleic của phân tử liên quan mà được phân lập trước khi nó được bổ sung vào trong tế bào. Ví dụ, trình tự axit nucleic của phân tử liên quan có thể là ở dạng vector biểu hiện trong khi đó tế bào có thể là nhân sơ hoặc nhân thực. Ví dụ về tế bào nhân thực là tế bào động vật có vú, chẳng hạn như, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, 653, SP2/0, NS0, 293, HeLa, u tuỷ, u lympho hoặc dạng bất kỳ được tạo ra từ chúng. Tốt nhất nếu tế bào nhân thực là tế bào HEK293, NS0, SP2/0, hoặc CHO. *E. Coli* là ví dụ về tế bào nhân sơ. Tế bào tái tổ hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng quá trình chuyển nhiễm, dung hợp tế bào, làm bất tử, hoặc phương pháp đã biết khác trong lĩnh vực này. Trình tự axit nucleic của phân tử liên quan, như vector biểu hiện, được chuyển nhiễm vào trong tế bào có thể là ngoài nhiễm sắc thể hoặc được kết hợp một cách ổn định vào trong nhiễm sắc thể của tế bào.

“Kháng thể khảm” đề cập đến loại kháng thể được cải biến mà chứa vùng biến đổi tự nhiên (chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) được tạo ra từ kháng thể thể cho kết hợp với vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tạo ra từ kháng thể nhận.

“Kháng thể được nhân hóa” đề cập đến loại kháng thể được cải biến có CDR của nó được tạo ra từ globulin miễn dịch thể cho không phải người, phần được tạo ra từ globulin miễn dịch còn lại của phân tử được tạo ra từ một hoặc nhiều globulin miễn dịch từ người. Ngoài ra, các gốc hỗ trợ khung có thể được biến đổi để duy trì ái lực liên kết (xem, ví dụ, Queen et al. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, *et al.*, *Bio/Technology*, 9:421 (1991)). Kháng thể thể nhận từ người thích hợp có thể là kháng thể được chọn từ cơ sở dữ liệu thông dụng, ví dụ, cơ sở dữ liệu KABAT™, cơ sở dữ liệu Los Alamos, và cơ sở dữ liệu Swiss Protein, bởi tính tương đồng với trình tự axit amin và nucleotit của kháng thể thể cho. Kháng thể từ người đặc trưng bởi tính tương đồng với vùng khung của kháng thể thể cho (trên cơ sở axit amin) có thể thích hợp để tạo ra vùng hằng định chuỗi nặng và/hoặc vùng khung biến đổi chuỗi nặng để chèn CDR thể cho. Kháng thể thể nhận thích hợp có thể cho vùng khung biến đổi hoặc hằng định của chuỗi nhẹ có thể được chọn theo cách tương tự. Cần lưu ý rằng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thể nhận không cần phải có nguồn gốc từ cùng một kháng thể thể nhận. Các giải pháp kỹ thuật đã biết mô tả một số cách tạo ra kháng thể được nhân hóa như vậy – xem, ví dụ, EP-A-0239400 và EP-A-054951.

Thuật ngữ "kháng thể hoàn toàn từ người" bao gồm kháng thể có vùng hằng định và biến đổi (nếu có) được tạo ra từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm từ người. Trình tự kháng thể từ người theo sáng chế có thể bao gồm gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm từ người (ví dụ, đột biến được bổ sung bởi đột biến đặc hiệu vị trí hoặc ngẫu nhiên in vitro hoặc bởi đột biến tế bào xôma in vivo). Kháng thể hoàn toàn từ người chứa trình tự axit amin được mã hóa chỉ bằng polynucleotit mà có nguồn gốc từ người hoặc trình tự axit amin mà tương đồng với trình tự này. Trong bản mô tả này, kháng thể được mã hóa bằng ADN mã hóa globulin miễn dịch từ người được chèn vào bộ gen chuột được tạo ra ở chuột chuyển gen là kháng thể hoàn toàn từ người vì chúng được mã hóa bằng ADN mà có nguồn gốc từ người. Trong trường hợp này, ADN mã hóa globulin miễn dịch từ người có thể được sắp xếp lại (để mã hóa kháng thể) ở chuột, và đột biến tế bào xôma cũng có thể xảy ra. Kháng thể được mã hóa bởi ADN có nguồn gốc từ người mà trải qua sự cải biến như vậy ở chuột là kháng thể hoàn toàn từ người như được ngụ ý trong bản mô tả này. Việc sử dụng chuột chuyển gen như vậy có thể giúp chọn lựa kháng thể hoàn toàn từ người dựa trên kháng nguyên từ người. Như được xác định trong lĩnh vực này, kháng thể hoàn toàn từ người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật hiển thị trên thể thực khuẩn trong đó thư viện ADN từ người được chèn vào thể thực khuẩn để tạo ra kháng thể chứa trình tự ADN dòng mầm từ người.

Thuật ngữ "kháng thể thể cho" đề cập đến kháng thể mà góp trình tự axit amin của vùng biến đổi của nó, CDR, hoặc mảnh chức năng khác hoặc dạng tương tự của nó vào thành phần kết hợp globulin miễn dịch thứ nhất. Kháng thể thể cho, do đó, tạo ra vùng mã hóa globulin miễn dịch được biến đổi và nhờ đó biểu hiện kháng thể được cải biến với tính đặc hiệu kháng nguyên và làm trung hòa hoạt tính đặc trưng của kháng thể thể cho.

Thuật ngữ "kháng thể thể nhận" đề cập đến kháng thể mà khác loại với kháng thể thể cho, mà góp tất cả (hoặc phần bất kỳ) của các trình tự axit amin mã hóa vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của nó và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của nó vào thành phần kết hợp globulin miễn dịch thứ nhất. Kháng thể từ người có thể là kháng thể thể nhận.

Thuật ngữ " V_H " và " V_L " được sử dụng trong bản mô tả này lần lượt đề cập đến vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng nguyên.

“CDR” được xác định là trình tự axit amin vùng quyết định hỗ trợ của protein liên kết kháng nguyên. Chúng là vùng siêu biến của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Có ba chuỗi nặng và ba chuỗi nhẹ của CDR (hoặc vùng CDR) trong phần biến đổi của globulin miễn dịch. Do đó, “CDR” trong bản mô tả này đề cập đến cả ba CDR chuỗi nặng, cả ba CDR chuỗi nhẹ, tất cả các CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, hoặc ít nhất hai CDR.

Trong bản mô tả này, gốc axit amin trong trình tự miễn biến đổi và trình tự kháng thể có chiều dài đầy đủ được đánh số theo quy ước đánh số Kabat. Tương tự, thuật ngữ “CDR”, “CDRL1”, “CDRL2”, “CDRL3”, “CDRH1”, “CDRH2”, “CDRH3” được sử dụng trong phần ví dụ thực hiện sáng chế cũng theo quy ước đánh số Kabat. Cụ thể hơn, xem Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1991).

Rõ ràng là đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, có các quy ước đánh số khác nhau đối với gốc axit amin trong trình tự vùng biến đổi và trình tự kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các quy ước đánh số khác nhau đối với trình tự CDR, ví dụ, các quy ước được mô tả trong Chothia et al. (1989) *Nature* 342: 877-883. Cấu trúc và việc gấp nếp protein của kháng thể có thể có nghĩa là các gốc khác được coi là một phần của trình tự CDR và sẽ được hiểu như vậy bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Các quy ước đánh số khác cho trình tự CDR là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bao gồm phương pháp “AbM” (University of Bath) và phương pháp “tiếp xúc” (University College London). Vùng ít trùng lặp nhất sử dụng ít nhất hai trong số các phương pháp Kabat, Chothia, AbM và phương pháp tiếp xúc có thể được xác định để tạo ra “đơn vị liên kết nhỏ nhất”. Đơn vị liên kết nhỏ nhất có thể là tiểu phần của CDR.

Bảng 1 sau đây thể hiện một phương pháp xác định sử dụng mỗi quy ước đánh số đối với mỗi CDR hoặc đơn vị liên kết. Sơ đồ đánh số Kabat được sử dụng trong Bảng 1 để đánh số trình tự axit amin vùng biến đổi. Cần lưu ý rằng một số định nghĩa về CDR có thể thay đổi phụ thuộc vào mỗi công bố được sử dụng.

Bảng 1

	CDR theo Kabat	CDR theo Chothia	CDR theo AbM	CDR theo phương pháp tiếp xúc	Đơn vị liên kết nhỏ nhất
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

Do đó, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS, mà chứa bất kỳ một hoặc dạng kết hợp của các CDR sau đây:

CDRH1: DYAMH (SEQ ID NO:1)

CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG (SEQ ID NO:2)

CDRH3: NNYGNYGWYFDV (SEQ ID NO:3)

CDRL1: SASSSVSYM (SEQ ID NO:4)

CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO:5)

CDRL3: FQGSGYPYT (SEQ ID NO:6)

Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết ICOS chứa CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), và CDRH3 (SEQ ID NO:3) trong vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:7. Protein liên kết ICOS theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được nhân hóa được thể hiện ở SEQ ID NO:7 được ký hiệu là “H2”. Theo một số phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 90% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:7. Tốt hơn là, protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:7.

Vùng biến đổi (H2) chuỗi nặng được nhân hóa (V_H)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAMHWVRQA PGQGLEWMGL
ISIYSDHTNY NQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN

YGNYGWYFDV WGQGT TVTVS S

(SEQ ID NO:7)

Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết ICOS chứa CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5), và CDRL3 (SEQ ID NO:6) trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Protein liên kết ICOS theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nhân hóa được thể hiện ở SEQ ID NO:8 được ký hiệu là “L5”. Do đó, protein liên kết ICOS theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SEQ ID NO:8 có thể được ký hiệu là H2L5 trong bản mô tả này.

Tốt hơn là gen khởi đầu của cấu trúc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi được thể hiện trong Fig. 9 và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:11)

Theo một số phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 90% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Tốt hơn là, protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự tương đồng với SEQ ID NO:8.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) được nhân hóa (L5)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT
SKLASGIPAR FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCFQG SGYPYTFGQG
 TKLEIK (SEQ ID NO:8)

CDR hoặc đơn vị liên kết nhỏ nhất có thể được cải biến bằng cách thế, loại bỏ hoặc bổ sung ít nhất một axit amin, trong đó protein liên kết kháng nguyên biến thể về cơ bản giữ lại đặc trưng sinh học của protein không được biến đổi, như kháng thể của chuột được tạo ra từ dòng 422.2 hoặc kháng thể chứa SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8.

Cần phải hiểu rằng mỗi trong số CDR H1, H2, H3, L1, L2, L3 có thể được cải biến riêng rẽ hoặc kết hợp với CDR bất kỳ khác, trong dạng biến đổi vị trí hoặc kết hợp bất kỳ. Theo một phương án, CDR được cải biến bằng cách thế, loại bỏ hoặc bổ sung đến 3 axit amin, ví dụ 1 hoặc 2 axit amin, ví dụ 1 axit amin. Nói chung, việc biến đổi thường là thế, cụ thể là thế bảo toàn, ví dụ như được mô tả trong Bảng 2 sau đây.

Bảng 2

Mạch nhánh	Thành phần
Kỵ nước	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Trung hòa ưa nước	Cys, Ser, Thr
Axit	Asp, Glu
Bazơ	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Gốc ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi	Gly, Pro
Thơm	Trp, Tyr, Phe

Ví dụ, trong CDR biến đổi, gốc axit amin của đơn vị liên kết nhỏ nhất có thể giữ nguyên không đổi, nhưng gốc hai bên mà chứa CDR là một phần của (các) định nghĩa Kabat hoặc Chothia có thể được thế bằng gốc axit amin bảo toàn.

Protein liên kết kháng nguyên như vậy chứa CDR được biến đổi hoặc đơn vị liên kết nhỏ nhất như được mô tả trên đây có thể được đề cập ở đây là “biến thể CDR chức năng” hoặc “biến thể đơn vị liên kết chức năng”. Thích hợp là, theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS chứa một hoặc nhiều CDR có trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, và/hoặc 6 và/hoặc biến thể CDR chức năng của nó.

Thuật ngữ "epitop" trong bản mô tả này đề cập đến phần của kháng nguyên mà giúp tiếp xúc với miền liên kết cụ thể của protein liên kết kháng nguyên. Epitop có thể là mạch thẳng hoặc dạng có hình thể/gián đoạn. Epitop dạng có hình thể hoặc gián đoạn chứa gốc axit amin mà được tách riêng bằng trình tự khác, tức là không ở dạng trình tự liên tục trong trình tự nguyên thủy của kháng nguyên. Mặc dù gốc có thể là từ các vùng khác nhau của chuỗi peptit, chúng gần như ở dạng cấu trúc ba chiều của kháng nguyên. Đối với trường hợp của kháng nguyên nhiều chuỗi polypeptit, epitop dạng có hình thể hoặc gián đoạn có thể bao gồm các gốc từ chuỗi peptit khác nhau. Gốc cụ thể trong epitop có thể được xác định thông qua chương trình tạo mẫu bằng máy tính hoặc thông qua cấu trúc ba chiều thu được từ phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như tinh thể học tia X.

Các CDR L1, L2, L3, H1 và H2 có xu hướng thể hiện về mặt cấu trúc một trong các dạng có hình thể mạch chính. Nhóm cấu trúc khuôn mẫu cụ thể của CDR được xác định bằng cả chiều dài của CDR và bằng cách nén vòng, được xác định bởi các gốc được bố trí ở các vị trí chính trong cả CDR và vùng khung (gốc quyết định cấu trúc hoặc SDR). Martin và Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815) đã tạo ra phương pháp tự động để xác định

khuôn mẫu của “gốc chính”. Phép phân tích cụm được sử dụng để xác định nhóm khuôn mẫu đối với bộ các CDR, và khuôn mẫu sau đó được xác định bằng cách phân tích gốc kỵ nước bị che khuất, gốc liên kết hydro, và glyxin và prolin được bảo tồn. CDR của trình tự kháng thể có thể được ký hiệu cho nhóm khuôn mẫu bằng cách so sánh trình tự với khuôn mẫu của gốc chính và đánh giá điểm mỗi khuôn mẫu sử dụng ma trận xác định hoặc tương đồng.

Có thể có nhiều vị trí khuôn mẫu CDR biến đổi trên mỗi CDR, mỗi CDR tương ứng, mỗi đơn vị liên kết, mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, mỗi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, và mỗi protein liên kết kháng nguyên, và do đó dạng kết hợp bất kỳ của sự thể có thể có mặt trong protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, miễn là cấu trúc khuôn mẫu của CDR được duy trì sao cho protein liên kết kháng nguyên có thể liên kết đặc hiệu với ICOS.

Như được mô tả trên đây, nhóm cấu trúc khuôn mẫu cụ thể của CDR được xác định bằng cả chiều dài của CDR và bằng cách nén vòng, được xác định bằng gốc được bố trí ở các vị trí chính trong cả CDR và vùng khung.

“Phần trăm độ tương đồng” giữa trình tự axit nucleic truy vấn và trình tự axit nucleic đích là giá trị “độ tương đồng”, được tính theo phần trăm, mà được tính theo thuật toán BLASTN nếu trình tự axit nucleic đích có 100% mức độ trung bình truy vấn với trình tự axit nucleic truy vấn sau khi sắp xếp theo trình tự cặp BLASTN được thực hiện. Việc sắp xếp theo trình tự cặp BLASTN như vậy giữa trình tự axit nucleic truy vấn và trình tự axit nucleic đích được thực hiện bằng cách sử dụng thiết lập mặc định của thuật toán BLASTN có sẵn trên trang web của Trung tâm Quốc gia thuộc Viện Công nghệ Sinh học (National Center for Biotechnology Institute’s website) với bộ lọc đối với vùng phức hợp thấp ở trạng thái tắt. Điều quan trọng là, trình tự axit nucleic truy vấn có thể được mô tả theo trình tự axit nucleic được xác định trong một hoặc các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trình tự truy vấn có thể là 100% tương đồng với trình tự đích, hoặc nó có thể là số nguyên cụ thể của các biến đổi axit amin hoặc nucleotit so với trình tự đích sao cho % độ tương đồng là ít hơn 100%. Ví dụ, trình tự truy vấn tương đồng ít nhất 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, hoặc 99% với trình tự đích. Các cải biến như vậy bao gồm ít nhất một cải biến loại bỏ, thế (bao gồm thế bảo toàn và không bảo toàn), hoặc chèn axit amin, và trong đó các cải biến này có thể xảy ra ở vị trí đầu chặn mạch amino hoặc carboxy của

trình tự truy vấn hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí đầu chặn mạch này, được đặt một cách độc lập giữa axit amin hoặc nucleotit trong trình tự truy vấn hoặc trong một hoặc nhiều nhóm kề nhau trong trình tự truy vấn.

% độ tương đồng có thể được xác định xuyên suốt toàn bộ chiều dài của trình tự truy vấn, bao gồm (các) CDR. Theo một phương án khác, % độ tương đồng có thể không bao gồm (các) CDR, ví dụ (các) CDR là 100% tương đồng với trình tự đích và % thay đổi về độ tương đồng là trong phần còn lại của trình tự truy vấn, sao cho trình tự CDR được cố định/không thay đổi.

Trình tự biến đổi về cơ bản giữ lại được đặc trưng sinh học của protein không được biến đổi, như SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8.

Trình tự V_H hoặc V_L có thể là trình tự biến đổi với sự thế, bổ sung hoặc loại bỏ đến 15 axit amin. Ví dụ, trình tự biến đổi có thể có đến 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 biến đổi thế, bổ sung hoặc loại bỏ axit amin.

Sự cải biến về trình tự có thể không bao gồm (các) CDR, ví dụ (các) CDR là giống như trình tự V_H hoặc V_L (hoặc HC hoặc LC) và sự cải biến là trong phần còn lại của trình tự V_H hoặc V_L (hoặc HC hoặc LC), sao cho trình tự CDR được cố định/không thay đổi.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng, sau sự sản sinh protein liên kết kháng nguyên như kháng thể, cụ thể là tùy thuộc vào dòng tế bào được sử dụng và trình tự axit amin cụ thể của protein liên kết kháng nguyên, việc biến đổi sau dịch mã có thể xảy ra. Ví dụ, biến đổi này có thể bao gồm sự phân cắt một số gen khởi đầu, bổ sung các gốc đường vào các mẫu glycosyl hóa và phosphoryl hóa, khử amit, oxy hóa, xáo trộn liên kết disulfua, isome hóa, cắt lysin đầu chặn mạch C, và vòng hóa glutamin đầu chặn mạch N. Sáng chế bao gồm việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên mà được, hoặc phải trải qua, một hoặc nhiều sự cải biến sau dịch mã. Do đó, “protein liên kết kháng nguyên” hoặc “kháng thể” theo sáng chế lần lượt bao gồm “protein liên kết kháng nguyên” hoặc “kháng thể” như được xác định trên đây mà được trải qua biến đổi sau dịch mã như được mô tả trong bản mô tả này.

Khử amit là phản ứng enzym chủ yếu chuyển hóa asparagin (N) thành axit iso-aspartic và axit aspartic (D) ở tỷ lệ khoảng 3:1. Với mức độ nhỏ hơn nhiều, quá trình khử amit có thể xảy ra với gốc glutamin theo cách tương tự. Khử amit trong CDR tạo ra sự thay

đổi về điện tích của phân tử, nhưng nói chung không tạo ra sự thay đổi về liên kết kháng nguyên, cũng như không ảnh hưởng đến PK/PD.

Sự oxy hóa có thể xảy ra trong quá trình sản xuất và cất giữ (tức là, với sự có mặt của các điều kiện oxy hóa) và tạo ra sự cải biến cộng hóa trị của protein, được cảm ứng một cách trực tiếp bởi chất chứa oxy hoạt tính hoặc một cách gián tiếp bởi phản ứng với sản phẩm phụ thứ cấp của tình trạng mất cân bằng oxy hóa. Quá trình oxy hóa xảy ra chủ yếu với gốc methionin, nhưng đôi khi có thể xảy ra ở gốc tryptophan và xystein tự do.

Sự xáo trộn liên kết disulfua có thể xảy ra trong quá trình sản xuất và điều kiện cất giữ cơ sở. Dưới một số điều kiện, liên kết disulfua có thể bị gãy hoặc hình thành theo cách không phù hợp, mà tạo ra gốc xystein không được bắt cặp (-SH). Các sulfhydryl (-SH) tự do (không được bắt cặp) này có thể thúc đẩy sự xáo trộn.

Quá trình isome hóa thường xảy ra trong quá trình sản xuất, tinh chế, và cất giữ (ở độ pH axit) và thường xảy ra nếu axit aspartic được chuyển hóa thành axit isoaspartic thông qua quá trình hóa học.

Glutamin đầu chặn mạch N trong chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể tạo ra pyroglutamat (pGlu). Hầu hết quá trình tạo thành pGlu xảy ra trong bình phản ứng sinh học của quá trình sản xuất, nhưng nó có thể được tạo ra mà không cần enzym, tùy thuộc vào độ pH và nhiệt độ của điều kiện xử lý và cất giữ. Sự tạo thành pGlu được xác định là một trong số các con đường phân hủy chính đối với các mAb tái tổ hợp.

Việc cắt lysin đầu chặn mạch C là phản ứng enzym được xúc tác bởi carboxypeptidaza, và thường quan sát được trong các mAb tái tổ hợp. Biến thể của quá trình này bao gồm việc loại bỏ lysin ra khỏi một hoặc cả hai chuỗi nặng. Việc cắt lysin không gây ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học và không có tác dụng trên mAb hiệu lực chức năng.

Kháng thể tự miễn tồn tại tự nhiên ở người có thể liên kết với protein. Do đó, kháng thể tự miễn có thể liên kết với protein nội sinh (có mặt ở các đối tượng nguyên vẹn) cũng như với protein hoặc peptit mà được sử dụng cho đối tượng để điều trị. Kháng thể tự miễn liên kết protein có tác dụng trị liệu và kháng thể mà mới được tạo ra đáp ứng với việc điều trị bằng thuốc được gọi chung là kháng thể kháng thuốc (các ADA). Kháng thể đã có từ trước chống lại phân tử như protein và peptit trị liệu, được sử dụng cho đối tượng có thể ảnh hưởng đến hiệu quả trị liệu của chúng và có thể tạo ra phản ứng sau khi sử dụng, sự

quá mẫn, đáp ứng lâm sàng được thay đổi từ bệnh nhân được điều trị và độ sinh khả dụng được thay đổi bằng cách kéo dài, loại trừ hoặc làm trung hòa phân tử. Có thể có lợi để tạo ra phân tử cho việc trị liệu mà chứa vùng biến đổi đơn của globulin miễn dịch từ người (kháng thể) hoặc dAbsTM mà giảm tính sinh miễn dịch (tức là, giảm khả năng liên kết với các ADA đã có từ trước nếu được sử dụng cho đối tượng, cụ thể là người).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến dAbTM được biến đổi mà giảm khả năng liên kết với kháng thể đã có từ trước (các ADA) so với phân tử không được biến đổi tương đương. Khả năng liên kết giảm có nghĩa là phân tử được biến đổi liên kết với ADA đã có từ trước với ái lực giảm hoặc độ bám dính giảm. DAbTM được biến đổi này chứa một hoặc nhiều biến đổi được chọn từ: (a) bổ sung, kéo dài, loại bỏ hoặc thất (tag) đầu chặn mạch C, và/hoặc (b) một hoặc nhiều sự thể khung axit amin.

Polypeptit và dAbsTM theo sáng chế và chất chủ vận chứa chúng có thể được định dạng để có kích thước thủy động lớn hơn, ví dụ, bằng cách gắn nhóm PEG, huyết thanh, transferrin, thụ thể transferrin hoặc ít nhất là phần liên kết transferrin của nó, kháng thể vùng Fc, hoặc bằng cách tiếp hợp với vùng kháng thể. Ví dụ, polypeptit dAbsTM và chất chủ vận có thể được định dạng ở dạng mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể lớn hơn hoặc ở dạng kháng thể (ví dụ, được định dạng ở dạng Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kích thước thủy động” đề cập đến kích thước biểu kiến của phân tử (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên) trên cơ sở sự khuếch tán của phân tử thông qua dung dịch nước. Sự khuếch tán hoặc chuyển động của protein thông qua dung dịch có thể được xử lý để tạo ra kích thước biểu kiến của protein, trong đó kích thước được thể hiện bằng “Bán kính Stokes” hoặc “bán kính thủy động” của hạt protein. “Kích thước thủy động” của protein phụ thuộc vào cả khối lượng và hình dạng (hình thể), sao cho hai protein có cùng một khối lượng phân tử có thể có kích thước thủy động khác nhau trên cơ sở hình thể và điện tích chung của protein. Sự gia tăng về kích thước thủy động có thể tạo ra sự giảm tương ứng về sự thanh thải ở thận dẫn đến sự gia tăng có thể được quan sát về thời gian bán hủy ($t_{1/2}$).

Kích thước thủy động của protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, vùng kháng thể monome và multime) theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sắc ký lọc gel có thể được sử dụng để xác định kích thước thủy động của protein liên kết kháng nguyên. Ma trận lọc gel thích hợp để xác định kích

thước thủy động của protein liên kết kháng nguyên, như ma trận agaroza được liên kết ngang, là đã biết và có sẵn.

Kích thước của dạng protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kích thước của gốc PEG được gắn vào vùng kháng thể monome), có thể được cải biến tùy theo ứng dụng cụ thể mong muốn. Ví dụ, nếu protein liên kết kháng nguyên dự định rời chuyển khỏi hệ tuần hoàn và đi vào mô ngoại biên, thì mong muốn là giữ cho kích thước thủy động của protein liên kết ICOS thấp để tạo thuận lợi cho sự thoát mạch khỏi dòng máu. Theo cách khác, nếu mong muốn có protein liên kết kháng nguyên giữ lại được trong hệ tuần hoàn trong khoảng thời gian dài hơn, kích thước của protein liên kết kháng nguyên có thể được gia tăng, ví dụ bằng cách tạo hình ở dạng protein giống Ig.

Dược phẩm

Protein liên kết kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả này có thể được kết hợp thành dược phẩm để sử dụng trong việc điều trị bệnh ở người như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều chất mang và/hoặc tá dược được sử dụng.

Dược phẩm như vậy chứa chất mang được sử dụng như đã biết và được sử dụng trong thực hành dược dụng.

Dược phẩm có thể được sử dụng bằng cách tiêm hoặc truyền liên tục (ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong tĩnh mạch, trong bụng, trong da, dưới da, trong cơ và qua da). Theo một phương án, dược phẩm thích hợp để sử dụng trong tĩnh mạch. Dược phẩm có thể thích hợp để sử dụng khu trú (mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bằng miếng dán trên da, được xông hít, trong mũi hoặc trong mắt) hoặc sử dụng trong ruột (mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sử dụng theo đường ruột hoặc trực tràng).

Dược phẩm có thể chứa từ 0,5mg đến 10g protein liên kết ICOS, ví dụ từ 5mg đến 1g protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án khác, dược phẩm có thể chứa từ 5mg đến 500mg, ví dụ từ 5mg đến 50mg.

Phương pháp bào chế dược phẩm như vậy là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tá dược khác có thể được bổ sung vào dược phẩm nếu cần theo chế độ sử dụng và protein cụ thể được sử dụng. Ví dụ về các tá dược khác nhau và việc sử dụng chúng được mô tả trong tài liệu Lowe et al., (2011).

Liều hiệu quả và chế độ điều trị để sử dụng protein liên kết kháng nguyên có thể phụ thuộc vào các yếu tố như độ tuổi, thể trọng và tình trạng sức khỏe của bệnh nhân và bệnh cần điều trị. Các yếu tố này đều trong tầm hiểu biết của bác sỹ. Hướng dẫn để chọn liều thích hợp được mô tả, ví dụ trong tài liệu Bai et al., (2012).

Dược phẩm có thể bao gồm kit đa thành phần gồm protein liên kết kháng nguyên cùng với các thuốc khác, tùy ý kèm hướng dẫn sử dụng. Để thuận tiện sử dụng, kit có thể chứa các chất với lượng xác định cùng với hướng dẫn sử dụng.

Thuật ngữ “cá thể”, “đối tượng” và “bệnh nhân” được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Theo một phương án, đối tượng là động vật có vú, như động vật linh trưởng, ví dụ khỉ đuôi sóc hoặc khỉ. Theo một phương án khác, đối tượng là người.

Protein liên kết kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả này còn có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị. Việc điều trị có thể là trị liệu, ngăn ngừa hoặc dự phòng. Việc điều trị bao gồm làm thuyên giảm, giảm nhẹ, hoặc ngăn ngừa ít nhất một khía cạnh hoặc triệu chứng của bệnh và bao gồm việc ngăn ngừa hoặc chữa khỏi bệnh như được mô tả trong bản mô tả này.

Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng với lượng hữu hiệu để điều trị trị liệu, phòng ngừa hoặc ngăn ngừa. Lượng hữu hiệu trị liệu của protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong bản mô tả này là lượng hữu hiệu để cải thiện hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh, hoặc để ngăn ngừa hoặc chữa khỏi bệnh.

Do đó, theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được tạo ra để sử dụng trong việc trị liệu. Theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được tạo ra để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết.

Do đó, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS được phân lập hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm chứa protein liên kết ICOS được phân lập hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết.

Phương pháp sản xuất

Protein liên kết kháng nguyên có thể được điều chế bằng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật thông dụng. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên có thể được tinh chế từ tế bào mà tự biểu hiện chúng (ví dụ, kháng thể có thể được tinh chế từ tế bào lai mà tạo ra nó), hoặc được tạo ra trong hệ biểu hiện tái tổ hợp.

Các hệ biểu hiện và phương pháp tinh chế khác nhau có thể được sử dụng để tạo ra protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Nói chung, tế bào vật chủ được biến đổi với vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa protein liên kết kháng nguyên mong muốn. Các tế bào vật chủ có thể được sử dụng, bao gồm sinh vật nhân nguyên thủy (bao gồm vi khuẩn Gram âm hoặc Gram dương, ví dụ *Escherichia coli*, *Bacilli sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.*), sinh vật nhân thực bao gồm nấm men (ví dụ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), nấm (ví dụ *Aspergillus sp.*), hoặc sinh vật nhân thực cao cấp bao gồm tế bào côn trùng và dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú (ví dụ, CHO, Perc6, HEK293, HeLa).

Tế bào vật chủ có thể là tế bào vật chủ được phân lập. Tế bào vật chủ thường không phải là một phần của sinh vật đa bào (ví dụ, thực vật hoặc động vật). Tế bào vật chủ có thể là tế bào vật chủ không phải người.

Các vector biểu hiện và nhân dòng thích hợp để sử dụng với vi khuẩn, nấm, nấm men, và vật chủ tế bào động vật có vú và phương pháp nhân dòng là đã biết trong lĩnh vực này.

Tế bào có thể được nuôi cấy dưới các điều kiện mà thúc đẩy sự biểu hiện của protein liên kết kháng nguyên, và polypeptit được thu hồi theo quy trình tinh chế protein thông thường. Protein liên kết kháng nguyên dự định để sử dụng trong bản mô tả này về cơ bản bao gồm protein liên kết kháng nguyên đồng nhất về cơ bản không chứa tạp chất.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được rằng, tùy thuộc vào quy trình sản xuất protein liên kết kháng nguyên, cụ thể là tùy thuộc vào dòng tế bào được sử dụng và trình tự axit amin cụ thể của protein liên kết kháng nguyên, các biến đổi sau dịch mã có thể xảy ra. Sự cải biến này có thể bao gồm sự phân cắt một số gen khởi đầu, bổ sung các gốc đường trong mẫu glycosyl hóa, khử amit (ví dụ ở gốc asparagin hoặc glutamin), oxy hóa (ví dụ ở gốc methionin, tryptophan hoặc xystein tự do), xáo trộn liên kết disulfua, isome hóa (ví dụ ở gốc axit aspartic), cắt lysin đầu chặn mạch C (ví dụ từ một

hoặc cả hai chuỗi nặng), và vòng hóa glutamin đầu chặn mạch N (ví dụ trong chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ). Sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể mà được, hoặc phải trải qua, một hoặc nhiều biến đổi sau dịch mã. Sự cải biến có thể xảy ra trong CDR, vùng khung biến đổi, hoặc vùng hằng định. Sự cải biến có thể tạo ra sự thay đổi về điện tích phân tử. Sự cải biến nói chung không tạo ra sự thay đổi về liên kết kháng nguyên, chức năng, hoạt tính sinh học, cũng như không ảnh hưởng đến đặc trưng dược động học (PK) hoặc dược lực học (PD) của protein liên kết ICOS.

Thuật ngữ “chức năng hiệu lực” trong bản mô tả này có nghĩa là đề cập đến một hoặc nhiều trong số hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), đáp ứng qua trung gian hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), sự thực bào qua trung gian Fc hoặc sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) và tái tuần hoàn kháng thể thông qua thụ thể FcRn.

Tương tác giữa vùng hằng định của protein liên kết kháng nguyên và các thụ thể Fc (FcR) bao gồm FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16) được cho là qua trung gian chức năng hiệu lực của protein liên kết kháng nguyên. Tác dụng sinh lý đáng kể có thể là do chức năng hiệu lực. Khả năng tạo ra chức năng hiệu lực thường đòi hỏi liên kết của protein liên kết kháng nguyên với kháng nguyên và không phải tất cả các protein liên kết kháng nguyên đều tạo ra mọi chức năng hiệu lực.

Chức năng hiệu lực có thể được xác định theo nhiều cách bao gồm, ví dụ, thông qua liên kết của FcγRIII trên tế bào tự diệt hoặc thông qua FcγRI trên bạch cầu đơn nhân/đại thực bào để xác định chức năng hiệu lực ADCC/ADCP. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được đánh giá về chức năng hiệu lực ADCC trong thử nghiệm tế bào tự diệt. Phương pháp thực tiễn để đánh giá chức năng ADCC và/hoặc CDC được mô tả trong tài liệu (Kellner C et al., “Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions”, *Methods*, 1;65(1):105-13 (2014)).

Một số isotyp của vùng hằng định từ người, cụ thể là isotyp IgG4 và IgG2, có chức năng giảm về a) sự hoạt hóa bổ thể bằng con đường cổ điển; và b) độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể. Các biến đổi đối với vùng hằng định chuỗi nặng của protein liên kết kháng nguyên có thể được thực hiện tùy thuộc đặc tính hiệu lực mong muốn. Vùng hằng định IgG1 chứa các đột biến cụ thể đã được mô tả riêng rẽ là làm giảm liên kết với thụ thể Fc và do đó làm giảm chức năng ADCC và CDC (Kellner C et al., “Boosting ADCC and CDC

activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions”, *Methods*, 1;65(1):105-13 (2014)).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên bao gồm vùng hằng định sao cho protein liên kết kháng nguyên có chức năng hiệu lực và/hoặc sự hoạt hóa bổ thể ADCC giảm. Theo một phương án, vùng hằng định chuỗi nặng có thể chứa vùng hằng định bất hoạt tự nhiên của isotyp IgG2 hoặc IgG4 hoặc vùng hằng định IgG1 đột biến. Một ví dụ bao gồm sự thể gốc alanin ở vị trí 235 và 237 (Đánh số theo chỉ số EU).

Nhóm phụ của kháng thể xác định một phần chức năng hiệu lực thứ cấp, như sự hoạt hóa bổ thể hoặc liên kết thụ thể Fc (FcR) và độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Huber, et al., *Nature* 229(5284): 419-20 (1971); Brunhouse, et al., *Mol Immunol* 16(11): 907-17 (1979)). Để xác định loại kháng thể tối ưu cho ứng dụng cụ thể, chức năng hiệu lực của kháng thể có thể được xem xét. Ví dụ, kháng thể hIgG1 có thời gian bán hủy tương đối dài, rất hiệu quả trong việc cố định bổ thể, và chúng liên kết với cả FcγRI và FcγRII. Ngược lại, kháng thể IgG4 từ người có thời gian bán hủy ngắn hơn, không cố định bổ thể và có ái lực đối với các FcR thấp hơn. Việc thay thế serin 228 bằng prolin (S228P) trong vùng Fc của IgG4 làm giảm tính không đồng nhất được quan sát với hIgG4 và kéo dài thời gian bán hủy trong huyết thanh (Kabat, et al., “Sequences of proteins of immunological interest” 5th Edition (1991); Angal, et al., *Mol Immunol* 30(1): 105-8 (1993)). Thể đột biến thứ hai mà thay thế leuxin 235 bằng axit glutamic (L235E) loại bỏ liên kết FcR và hoạt tính liên kết bổ thể dư (Alegre, et al., *J Immunol* 148(11): 3461-8 (1992)). Kháng thể tạo thành với cả hai thể đột biến được ký hiệu là IgG4PE. Việc đánh số axit amin hIgG4 được thực hiện theo phương pháp đánh số theo EU: Edelman, G.M. Et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ICOS theo sáng chế bao gồm vùng IgG4 Fc bao gồm thể thay thế S228P và L235E có thể được ký hiệu là IgG4PE. Do đó, protein liên kết ICOS có vùng biến đổi chuỗi nặng H2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ L5 và vùng IgG4PE Fc sẽ được ký hiệu là H2L5 IgG4PE hoặc theo cách tương đồng H2L5 hIgG4PE.

Hoạt tính ADCC/CDC gia tăng

Như được xác định trong lĩnh vực này, các kỹ thuật mà gia tăng hoạt tính của kháng thể ADCC và/hoặc CDC là đã biết. Chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kỹ thuật đột biến trong vùng Fc, kỹ thuật Compelgent và Potelligent. Theo một khía cạnh của

sáng chế, một hoặc nhiều kỹ thuật gia tăng hoạt tính ADCC/CDC có thể được sử dụng cho protein liên kết ICOS theo sáng chế.

Đột biến

Vùng hằng định IgG1 từ người bao gồm đột biến cụ thể hoặc glycosyl hóa được biến đổi trên gốc Asn297 cũng được mô tả để gia tăng liên kết với thụ thể Fc. Trong một vài trường hợp, các đột biến này cũng được thể hiện để gia tăng hoạt tính ADCC và CDC, xem ví dụ, Kellner (2013).

Theo một phương án của sáng chế, các đột biến như vậy là một hoặc nhiều vị trí được chọn từ 239, 332 và 330 (IgG1), hoặc vị trí tương đương trong các isotyp IgG khác. Ví dụ về đột biến thích hợp là S239D và I332E và A330L. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế trong bản mô tả này được gây đột biến ở vị trí 239 và 332, ví dụ S239D và I332E hoặc theo phương án khác nữa, nó được gây đột biến ở ba hoặc nhiều vị trí được chọn từ 239 và 332 và 330, ví dụ S239D và I332E và A330L (Đánh số theo chỉ số EU).

Kỹ thuật Complegent

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng thể khảm, ví dụ protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng thể khảm với ít nhất một vùng CH2 từ IgG3 sao cho protein liên kết kháng nguyên có chức năng hiệu lực được gia tăng, ví dụ trong đó có ADCC gia tăng hoặc CDC gia tăng, hoặc chức năng ADCC và CDC gia tăng. Theo một phương án như vậy, protein liên kết kháng nguyên có thể chứa một vùng CH2 từ IgG3 hoặc cả hai vùng CH2 có thể là từ IgG3.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra protein liên kết kháng nguyên bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó vector biểu hiện bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa vùng Fc có cả gốc axit amin vùng Fc IgG1 và IgG3; và
- b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên.

Phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên này có thể được thực hiện, ví dụ, sử dụng hệ thống công nghệ COMPLEGENT™ có bán từ BioWa, Inc. (Princeton, NJ)

và Kyowa Hakko Kogyo (hiện nay là Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd., trong đó tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện trong đó trình tự axit nucleic mã hóa thể khảm vùng Fc có cả gốc axit amin vùng Fc IgG1 và IgG3 được biểu hiện để tạo ra protein liên kết kháng nguyên có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được gia tăng mà gia tăng so với protein liên kết kháng nguyên tương đồng khác mà không có vùng Fc thể khảm này. Các đặc điểm của hệ thống công nghệ COMPLEGENT™ được mô tả trong WO2007011041 và US20070148165 mà nội dung của chúng được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Theo phương án khác, hoạt tính CDC có thể được gia tăng bằng cách đưa đột biến đặc hiệu trình tự vào vùng Fc của chuỗi IgG. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ xác định được hệ thích hợp khác.

Kỹ thuật Potelligent

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó gen FUT8 mã hóa alpha-1,6-fucosyltransferaza không được hoạt hóa trong tế bào vật chủ tái tổ hợp; và
- b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên.

Phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên này có thể được thực hiện, ví dụ, sử dụng hệ thống công nghệ POTEILLIGENT™ có bán từ BioWa, Inc. (Princeton, NJ) trong đó tế bào CHOK1SV thiếu hụt chức năng sao chép của gen FUT8 tạo ra kháng thể đơn dòng có độc tính qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) được gia tăng mà được gia tăng so với kháng thể đơn dòng tương đồng được tạo ra trong tế bào với gen FUT8 chức năng. Các đặc điểm của hệ thống công nghệ POTEILLIGENT™ được mô tả trong US7214775, US6946292, WO0061739 và WO0231240 mà đều được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng xác định được hệ thống thích hợp khác.

Rõ ràng là, đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, các biến đổi như vậy không những có thể được sử dụng riêng rẽ mà còn có thể được sử dụng kết hợp với nhau để gia tăng hơn nữa chức năng hiệu lực.

Theo một phương án như vậy, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng mà chứa vùng hằng định chuỗi nặng thể khảm và được gây đột biến, ví dụ trong đó protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất một vùng CH2 từ IgG3 và một vùng CH2 từ IgG1, trong đó vùng CH2 từ IgG1 có một hoặc nhiều đột biến ở vị trí được chọn từ 239 và 332 và 330 (ví dụ đột biến có thể được chọn từ S239D và I332E và A330L) sao cho protein liên kết kháng nguyên có chức năng hiệu lực được gia tăng, ví dụ trong đó có một hoặc nhiều các chức năng sau: ADCC được gia tăng hoặc CDC được gia tăng, ví dụ trong đó có ADCC được gia tăng và CDC được gia tăng. Theo một phương án, vùng CH2 từ IgG1 có đột biến S239D và I332E.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng thể khảm và có profin glycosyl hóa thay đổi. Theo một phương án như vậy, vùng hằng định chuỗi nặng chứa ít nhất một vùng CH2 từ IgG3 và một vùng CH2 từ IgG1 và có profin glycosyl hóa thay đổi sao cho tỷ lệ của fucoza so với mannoza là 0,8:3 hoặc nhỏ hơn, ví dụ trong đó protein liên kết kháng nguyên được khử fucosyl sao cho protein liên kết kháng nguyên này có chức năng hiệu lực được gia tăng so với protein liên kết kháng nguyên tương đương với vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch không có các đột biến và profin glycosyl hóa thay đổi như vậy, ví dụ trong đó có một hoặc nhiều trong số các chức năng sau: ADCC được gia tăng hoặc CDC được gia tăng, ví dụ trong đó có ADCC được gia tăng và CDC được gia tăng.

Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có ít nhất một vùng CH2 từ IgG3 và ít nhất một vùng hằng định chuỗi nặng từ IgG1, trong đó cả hai vùng CH2 từ IgG đều được gây đột biến theo các giới hạn như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp bao gồm vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả trong bản mô tả này, vector biểu hiện này còn chứa trình tự axit nucleic Fc mã hóa vùng Fc thể khảm có cả gốc axit amin vùng Fc IgG1 và IgG3, và trong đó gen FUT8 mã hóa alpha-1,6-fucosyltransferaza không được hoạt hóa trong tế bào vật chủ tái tổ hợp; và
- b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên.

Phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên này có thể được thực hiện, ví dụ, sử dụng hệ thống công nghệ ACCRETAMAB™ có bán sẵn từ BioWa, Inc. (Princeton, NJ) mà kết hợp hệ thống công nghệ POTEILLIGENT™ và COMPLEGENT™ để tạo ra protein liên kết kháng nguyên có cả hai hoạt tính ADCC và CDC được gia tăng mà được gia tăng so với kháng thể đơn dòng tương đồng khác không có vùng Fc thể khảm và có fucoza trên oligosacarit.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng thể khảm và được gây đột biến, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có profin glycosyl hóa thay đổi sao cho protein liên kết kháng nguyên có chức năng hiệu lực được gia tăng, ví dụ trong đó có một hoặc nhiều các chức năng sau, ADCC được gia tăng hoặc CDC được gia tăng. Theo một phương án, đột biến được chọn từ vị trí 239 và 332 và 330, ví dụ đột biến được chọn từ S239D và I332E và A330L. Theo một phương án khác, vùng hằng định chuỗi nặng chứa ít nhất một vùng CH2 từ IgG3 và một vùng CH2 từ IgG1. Theo một phương án, vùng hằng định chuỗi nặng có profin glycosyl hóa thay đổi sao cho tỷ lệ của fucoza so với mannoza là 0,8:3 hoặc nhỏ hơn, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên được khử fucosyl, sao cho protein liên kết kháng nguyên này có chức năng hiệu lực được gia tăng so với protein liên kết kháng nguyên không được khảm tương đương hoặc với vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch không có các đột biến này và profin glycosyl hóa thay đổi.

Thời gian bán hủy dài của IgG kháng thể được báo cáo là phụ thuộc liên kết của nó với FcRn. Do đó, việc thể mà gia tăng ái lực liên kết của IgG với FcRn ở độ pH 6,0 trong khi duy trì sự phụ thuộc độ pH của tương tác bằng kỹ thuật vùng hằng định đã được tập trung nghiên cứu bởi Kuo và Aveson (2011).

Cách khác để biến đổi protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm việc gia tăng thời gian bán hủy in-vivo của protein này bằng cách biến đổi vùng hằng định globulin miễn dịch hoặc vùng liên kết FcRn (thụ thể Fc nguyên vẹn).

Ở động vật có vú trưởng thành, FcRn, còn được gọi là thụ thể Fc nguyên vẹn, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì mức kháng thể trong huyết thanh bằng cách đóng vai trò như là thụ thể bảo vệ mà liên kết và ngăn kháng thể của isotyp IgG không bị thoái biến. Phân tử IgG được nhập bào bởi tế bào nội mô, và nếu chúng liên kết với FcRn, được tuần

hoàn vào vòng tuần hoàn. Ngược lại, phân tử IgG mà không liên kết với FcRn đi vào tế bào và được hướng đích đến con đường lysosom ở đó chúng bị thoái biến.

Thụ thể FcRn nguyên vẹn được cho là tham gia vào cả sự thanh thải kháng thể và sự nhập bào qua mô, Kuo và Aveson, (2011). Gốc IgG1 từ người được xác định là tương tác một cách trực tiếp với FcRn từ người bao gồm Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 và His435. Sự dịch chuyển ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí này được mô tả trong phần này có thể giúp gia tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh và/hoặc đặc tính hiệu lực được biến đổi của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Đột biến để gia tăng thời gian bán hủy bằng cách gia tăng ái lực với FcRn

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều biến đổi axit amin mà gia tăng ái lực của vùng hằng định hoặc mảnh của nó đối với FcRn. Sự cải biến này có thể gia tăng thời gian bán hủy của các protein này (Kuo and Aveson (2011)). Việc gia tăng thời gian bán hủy của các phân tử IgG có trị liệu và chẩn đoán và các phân tử có hoạt tính sinh học khác có nhiều lợi ích bao gồm làm giảm lượng và/hoặc tần suất sử dụng liều lượng của các phân tử này. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết với kháng nguyên hoặc protein dung hợp chứa tất cả hoặc một phần (phần liên kết FcRn) của vùng hằng định IgG có một hoặc nhiều thể biến đổi axit amin và phân tử không protein IgG hoặc phân tử không protein được tiếp hợp với vùng hằng định IgG được biến đổi như vậy, trong đó sự có mặt của vùng hằng định IgG được biến đổi gia tăng thời gian bán hủy in vivo của protein liên kết kháng nguyên.

Các phương pháp đã biết mà có thể gia tăng thời gian bán hủy (Kuo and Aveson, (2011)), bao gồm biến đổi axit amin có thể được tạo ra thông qua kỹ thuật bao gồm đột biến quét ghi hình bằng alanin, đột biến ngẫu nhiên và sàng lọc để đánh giá liên kết với FcRn và/hoặc đặc tính in vivo. Phương pháp sử dụng máy tính sau đột biến còn có thể được sử dụng để chọn lựa một trong số các đột biến axit amin để gây đột biến.

Do đó, sáng chế đề cập đến biến thể của protein liên kết kháng nguyên với sự liên kết với FcRn được tối ưu hóa. Theo phương án được ưu tiên, biến thể của protein liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một thể biến đổi axit amin trong vùng Fc của protein liên kết kháng nguyên này, trong đó biến đổi này được chọn từ nhóm bao gồm 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309,

311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 và 447 của vùng Fc so với polypeptit gốc đã nêu, trong đó việc đánh số axit amin trong vùng Fc là đánh số theo chỉ số EU theo Kabat.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, thể biến đổi là M252Y/S254T/T256E.

Ngoài ra, các công bố khác mô tả phương pháp tạo ra phân tử có hoạt tính sinh lý mà có thời gian bán hủy được biến đổi, xem ví dụ Kontermann (2009) bằng cách đưa polypeptit liên kết FcRn vào phân tử hoặc bằng cách dung hợp phân tử với kháng thể mà có ái lực liên kết với FcRn được bảo toàn nhưng ái lực đối với thụ thể Fc khác bị làm giảm đáng kể hoặc dung hợp với vùng liên kết FcRn của kháng thể.

Kỹ thuật chuyển đổi độ pH để gia tăng thời gian bán hủy

Mặc dù việc thể trong vùng hằng định có thể gia tăng đáng kể chức năng của kháng thể IgG trị liệu, tuy nhiên sự thể trong vùng hằng định được bảo tồn nghiêm ngặt gặp phải nguy cơ về tính sinh miễn dịch ở người và việc thể trong trình tự vùng biến đổi đa dạng ở mức cao có thể ít sinh miễn dịch. Các báo cáo liên quan đến vùng biến đổi bao gồm kỹ thuật biến đổi gốc CDR để gia tăng ái lực liên kết với kháng nguyên và kỹ thuật biến đổi CDR và các gốc của khung để gia tăng độ bền và làm giảm nguy cơ về tính sinh miễn dịch. Như đã biết, ái lực được gia tăng với kháng nguyên có thể thu được bằng quá trình bão hòa ái lực sử dụng kỹ thuật biểu hiện trên thể thực khuẩn hoặc ribosom của thư viện ngẫu nhiên.

Độ bền gia tăng có thể thu được một cách hợp lý từ việc thiết kế hợp lý trên cơ sở trình tự và cấu trúc. Việc giảm nguy cơ về tính sinh miễn dịch (sự khử miễn dịch) có thể được hoàn thành bằng các phương pháp nhân hóa và loại bỏ các epitop tế bào T, mà có thể được dự đoán bằng cách sử dụng kỹ thuật in silico hoặc được xác định bằng thử nghiệm in vitro. Ngoài ra, vùng biến đổi được thiết kế để giảm pI. Thời gian bán hủy dài hơn được quan sát đối với các kháng thể này so với kháng thể kiểu đại bất chấp việc liên kết với FcRn là tương đương. Việc thiết kế hoặc chọn lựa kháng thể với liên kết kháng nguyên phụ thuộc độ pH để biến đổi thời gian bán hủy của kháng thể và/hoặc kháng nguyên, ví dụ thời gian bán hủy của kháng thể IgG2 có thể được rút ngắn nếu cơ chế thanh thải qua trung gian kháng nguyên thường làm thoái biến kháng thể khi được liên kết với kháng nguyên. Tương

tự, phức hợp kháng nguyên:kháng thể có thể ảnh hưởng đến thời gian bán hủy của kháng nguyên, nhờ đó kéo dài thời gian bán hủy bằng cách bảo vệ kháng nguyên không bị thoái biến, hoặc làm giảm thời gian bán hủy thông qua sự thoái biến qua trung gian kháng thể. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể có ái lực đối với kháng nguyên ở độ pH là 7,4 cao hơn so với độ pH trong hồng cầu nội thể (cụ thể là, độ pH là 5,5-6,0) sao cho tỷ lệ KD ở độ pH 5,5/ độ pH 7,4 hoặc ở độ pH 6,0/ độ pH 7,4 là 2 hoặc cao hơn. Ví dụ, để gia tăng đặc tính dược động học (PK) và dược lực học (PD) của kháng thể, có thể thiết kế liên kết với kháng thể nhạy với độ pH bằng cách bổ sung histidin vào gốc CDR.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán hủy sinh lý giảm. Biến thể IgG trong đó His435 được gây đột biến đối với alanin làm mất độ chọn lọc của liên kết FcRn và thời gian bán hủy trong huyết thanh bị làm giảm đáng kể (xem, ví dụ, US6,165,745 bộc lộ phương pháp tạo ra protein liên kết kháng nguyên với thời gian bán hủy sinh lý được làm giảm bằng cách đưa đột biến vào đoạn ADN mã hóa protein liên kết kháng nguyên. Thể đột biến bao gồm thể axit amin ở vị trí 253, 310, 311, 433, hoặc 434 của vùng bản lề Fc.

Chất liên kết

Khung protein có thể là giống như trình tự tự nhiên, như trình tự Ig, hoặc mảnh của trình tự tự nhiên, và có thể chứa trình tự bổ sung mà có thể là tự nhiên, từ nguồn khác hoặc tổng hợp, và mà có thể được bổ sung ở đầu chặn mạch N hoặc C của khung. Trình tự bổ sung này có thể được xác định là chất liên kết nếu chúng liên kết vùng liên kết epitop và khung protein, như được xác định trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, cấu trúc liên kết kháng nguyên bao gồm, hoặc chủ yếu bao gồm vùng Fc của kháng thể, hoặc một phần của nó, được liên kết ở mỗi đầu, một cách trực tiếp hoặc một cách gián tiếp (ví dụ, thông qua trình tự liên kết) với vùng liên kết epitop. Cấu trúc liên kết kháng nguyên này có thể chứa 2 vùng liên kết epitop được tách riêng bởi vùng Fc, hoặc một phần của nó. Tách riêng có nghĩa là vùng liên kết epitop không được liên kết một cách trực tiếp với một vùng khác, và theo một khía cạnh, được bố trí ở đầu đối diện (đầu chặn mạch C và N) của vùng Fc, hoặc vùng khung bất kỳ khác.

Theo một khía cạnh, cấu trúc liên kết kháng nguyên chứa 2 vùng khung mỗi vùng được liên kết với 2 vùng liên kết epitop, ví dụ ở đầu chặn mạch N và C của mỗi vùng khung, một cách trực tiếp hoặc một cách gián tiếp thông qua liên kết.

Khung protein theo sáng chế có thể được liên kết với vùng liên kết epitop bằng việc sử dụng các liên kết. Ví dụ về liên kết thích hợp bao gồm trình tự axit amin mà có thể có chiều dài từ 1 axit amin đến 150 axit amin, hoặc từ 1 axit amin đến 140 axit amin, ví dụ, từ 1 axit amin đến 130 axit amin, hoặc từ 1 đến 120 axit amin, hoặc từ 1 đến 80 axit amin, hoặc từ 1 đến 50 axit amin, hoặc từ 1 đến 20 axit amin, hoặc từ 1 đến 10 axit amin, hoặc từ 5 đến 18 axit amin. Trình tự này có thể có cấu trúc bậc ba riêng của chúng, ví dụ, liên kết theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi đơn. Kích thước của liên kết theo một phương án là tương đương với vùng biến đổi đơn. Liên kết thích hợp có thể có kích thước từ 1 đến 100 angstrom, ví dụ có thể có kích thước từ 20 đến 80 angstrom hoặc ví dụ có thể có kích thước từ 20 đến 60 angstrom hoặc ví dụ nhỏ hơn 40 angstrom, hoặc nhỏ hơn 20 angstrom, hoặc nhỏ hơn 5 angstrom theo chiều dài.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS chứa một hoặc nhiều: CDRH1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:1; CDRH2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:2; CDRH3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:3; CDRL1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:4; CDRL2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:5 và/hoặc CDRL3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:6 hoặc dạng tương đương trực tiếp của mỗi CDR trong đó dạng tương đương trực tiếp có không nhiều hơn hai phần thể axit amin trong CDR này.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS mà liên kết đặc hiệu với ICOS từ người chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:7 và/hoặc vùng V_L chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh, protein liên kết ICOS theo sáng chế còn liên kết với ICOS từ khỉ *Cynomolgus*. Theo một khía cạnh, chúng không liên kết với ICOS từ chuột.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế là chất chủ vận ICOS. Theo một khía cạnh, protein liên kết ICOS gia tăng mức sản sinh IFN-gamma với sự có mặt của tế bào T. Theo một khía cạnh khác, protein liên kết ICOS theo sáng chế kích thích sự tăng sinh tế bào T.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế liên kết với ICOS từ người với:

hằng số tốc độ kết hợp (kon) ít nhất là $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; và hằng số tốc độ phân ly (koff) là nhỏ hơn $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; hoặc

hằng số phân ly (Kd) là nhỏ hơn 100 nM;

trong đó ái lực cao được xác định bằng Biacore.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS chứa CDRH3 (SEQ ID NO:3) hoặc biến thể của SEQ ID NO. 3. Theo một phương án khác, protein liên kết ICOS chứa một hoặc nhiều: CDRH1 (SEQ ID NO:1); CDRH2 (SEQ ID NO:2); CDRH3 (SEQ ID NO:3); CDRL1 (SEQ ID NO:4); CDRL2 (SEQ ID NO:5); và/hoặc CDRL3 (SEQ ID NO:6). Theo một phương án, protein liên kết ICOS chứa CDR chuỗi nặng như được thể hiện ở SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; và SEQ ID NO:3 và CDR chuỗi nhẹ như được thể hiện ở SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; và SEQ ID NO:6,

Theo một phương án, protein liên kết ICOS chứa vùng V_H có 90% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:7; và vùng V_L có 90% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được thể hiện trong trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh, protein liên kết ICOS chứa vùng V_H có trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO.7 và vùng V_L chứa trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh, protein liên kết ICOS chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:7. Theo một khía cạnh, protein liên kết ICOS chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:8.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7; và vùng V_L chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8, trong đó, protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với ICOS từ người. Theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7; và vùng V_L chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8, trong đó protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với ICOS từ người còn chứa CDR chuỗi nặng có trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; và SEQ ID NO:3 và CDR chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; và SEQ ID NO:6. Theo một khía cạnh, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin được mô tả trong

SEQ ID NO:7; và vùng VL chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:8. Theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó là chất chủ vận đối với ICOS từ người. Theo một phương án protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó còn chứa khung isotyp IgG4 hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa khung isotyp hIgG4PE.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế là kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa trình tự axit amin chuỗi nặng có ít nhất 90%, 91%, 92,%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:23.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISL
YSDHTNYNQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGW
YFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:23)

Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế là kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa trình tự axit amin chuỗi nhẹ có ít nhất 90%, 91%, 92,%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% trình tự tương đồng với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:24.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKSLASG
IPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCFQSGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:24)

Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế là kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa trình tự axit amin chuỗi nặng được mô tả trong SEQ ID NO:23 và

trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được mô tả trong SEQ ID NO:24. Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế còn chứa khung hIgGPE.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, trong đó protein liên kết ICOS này là kháng thể đơn dòng được nhân hóa. Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó và chất mang được dụng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh được chọn từ bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng, và/hoặc nhiễm khuẩn huyết cho người cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước sử dụng được phẩm theo sáng chế cho người. Theo một khía cạnh, phương pháp còn bao gồm bước sử dụng ít nhất một chất chống ung thư, ít nhất một chất điều biến miễn dịch thứ hai, và/hoặc ít nhất một chất bổ trợ kích thích miễn dịch cho người cần điều trị. Theo một khía cạnh, chất điều biến miễn dịch thứ hai là chất được chọn từ: kháng thể kháng CTLA4, và kháng thể kháng PD-1, kháng PDL1 kháng thể và kháng thể kháng OX40. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CTLA4 là ipilimumab. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng PD-1 được chọn từ pembrolizumab và/hoặc nivolumab.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư cho người bao gồm bước sử dụng lượng chấp nhận có tác dụng trị liệu của protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó cho người. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ ung thư đại trực tràng (CRC), thực quản, cổ, bàng quang, ung thư vú, đầu và cổ, buồng trứng, khối u ác tính, ung thư biểu mô thận (RCC), ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tế bào phổi không nhỏ, u trung biểu mô, và bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh nhiễm trùng cho người bao gồm bước sử dụng lượng chấp nhận có tác dụng trị liệu của protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó cho người. Theo một khía cạnh, bệnh nhiễm trùng là HIV.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị nhiễm khuẩn huyết cho người bao gồm bước sử dụng lượng chấp nhận có tác dụng trị liệu của protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó cho người.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến phương pháp kích thích sự tăng sinh tế bào T, cảm ứng sự hoạt hóa tế bào T và/hoặc cảm ứng sự sản sinh xytokin cho người bao gồm bước sử dụng được phẩm theo sáng chế cho người cần điều trị.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào vật chủ được tạo ra chứa polynucleotit mã hóa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó bao gồm bước a) nuôi cấy tế bào vật chủ chứa polynucleotit mã hóa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế dưới điều kiện thích hợp để biểu hiện protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó; và b) phân lập protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được nhân hóa được phân lập chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7; vùng V_L chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:8; và khung hIgG4 hoặc biến thể của nó. Theo một khía cạnh, khung hIgG4 là hIgG4PE.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó được đề cập, trong đó protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh chéo để liên kết ICOS từ người với kháng thể tham chiếu hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7; và vùng V_L chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:8.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế kích thích sự tăng sinh tế bào T nếu được cho tiếp xúc với tế bào T. Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế cảm ứng sự hoạt hóa tế bào T nếu được cho tiếp xúc với tế bào T. Sự hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng sự gia tăng phần trăm mức biểu hiện của một số dấu ấn hoạt hóa như, nhưng không chỉ giới hạn ở, CD69, CD25, và/hoặc OX40. Theo một phương án, protein liên kết ICOS theo sáng chế kích thích sự sản sinh xytokin nếu được cho tiếp xúc với tế bào T. Protein liên kết ICOS liên kết với $Fc\gamma RIIb$ từ người nhưng không liên kết với $Fc\gamma RIIa$ từ người hoặc $Fc\gamma RIIIa$ từ người. Ngoài ra, protein liên kết ICOS tốt hơn là không làm thiếu hụt tế bào T biểu hiện ICOS khi được tiếp xúc với tế bào T biểu hiện ICOS. Theo một số phương án, protein liên kết ICOS liên kết chéo tế bào T với tế bào thứ

hai khi được tiếp xúc với tế bào T với sự có mặt của tế bào thứ hai. Việc liên kết chéo này có thể xảy ra thông qua sự tiếp hợp protein liên kết ICOS với Fc γ R trên tế bào thứ hai. Tế bào biểu hiện Fc γ R bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bạch cầu đơn nhân, tế bào bạch huyết B, tế bào hình sao vùng nang, tế bào tự diệt, đại thực bào, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa eosin, bạch cầu ưa bazơ và dưỡng bào. Do đó, theo một phương án, protein liên kết ICOS có thể được sử dụng cho động vật có vú trong đó protein liên kết ICOS sẽ có tác dụng như là chất chủ vận đối với ICOS trên tế bào T và còn tiếp hợp Fc γ R trên tế bào thứ hai.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS chứa khung được chọn từ isotyp IgG1 từ người hoặc biến thể của nó và isotyp IgG4 từ người hoặc biến thể của nó. Tốt hơn là, khung chứa khung isotyp IgG4 từ người hoặc biến thể của nó. Theo một khía cạnh, khung chứa khung isotyp hIgG4PE.

Theo một phương án, protein liên kết ICOS là kháng thể đơn dòng. Tốt hơn nếu protein liên kết ICOS là kháng thể đơn dòng được nhân hóa. Theo một khía cạnh, kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể là hoàn toàn từ người.

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết ICOS là mảnh mà là Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diabody, triabody, tetrabody, tiểu kháng thể, tiểu thể, V_H được phân lập hoặc V_L được phân lập. Theo một phương án, protein liên kết ICOS là phân liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một số khía cạnh, protein liên kết ICOS liên kết với ICOS từ người với ái lực lớn hơn 0,6 nM. Theo một khía cạnh, ái lực là 100nM hoặc lớn hơn. Theo một phương án, protein liên kết ICOS có K_d là 100nM đối với ICOS. Thích hợp là, K_d của protein liên kết ICOS đối với ICOS là 100nM hoặc nhỏ hơn, 50nM hoặc nhỏ hơn, 25nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 2nM hoặc nhỏ hơn hoặc 1nM hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được nhân hóa mà là chất chủ vận đối với ICOS từ người. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa CDR vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; và SEQ ID NO:3 và CDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; và SEQ ID NO:6. Theo một khía cạnh, kháng thể đơn dòng được nhân hóa có thể kích thích sự sản sinh xytokin và/hoặc sự tăng sinh tế bào T khi được tiếp xúc với tế bào T trong khi không

cảm ứng bổ thể, ADCC hoặc CDC. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được nhân hóa có vùng Fc IgG1 biến đổi từ người. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được nhân hóa có vùng Fc IgG4 từ người hoặc biến thể của nó. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được nhân hóa có vùng Fc hIgG4PE. Theo một khía cạnh, kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:7; và vùng V_L chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh, kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7; và vùng V_L chứa trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh, kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa khung isotyp hIgG4PE. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng được nhân hóa theo sáng chế còn kích thích sự tăng sinh tế bào T khi được tiếp xúc với tế bào T CD4⁺ hoặc CD8⁺. Kháng thể đơn dòng được nhân hóa theo sáng chế còn cảm ứng sự hoạt hóa tế bào T và kích thích sự sản sinh xytokin.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được nhân hóa chứa khung isotyp hIgG4PE và chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7 và vùng V_L chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:8. Kháng thể theo sáng chế có thể kích thích sự sản sinh xytokin khi được tiếp xúc với tế bào T.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến protein liên kết ICOS mà cạnh tranh trong việc liên kết ICOS với bất kỳ một trong số protein liên kết ICOS theo sáng chế. Như được xác định trong lĩnh vực này và như được mô tả trong bản mô tả này, cạnh tranh trong việc liên kết có thể được xác định bằng cách so sánh sự cạnh tranh đối với phối tử liên kết với ICOS với sự có mặt của một hoặc nhiều protein liên kết ICOS. Ngoài ra, như được xác định trong lĩnh vực này, ICOS được biểu hiện trên tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ cũng như tế bào Treg. Protein liên kết ICOS theo sáng chế có tác dụng như là chất chủ vận đối với ICOS trên tế bào T. Chúng còn có tác dụng phong bế tương tác giữa ICOS-L và ICOS được biểu hiện trên cả hai tế bào T và tế bào Treg. Do đó, theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phong bế tương tác của ICOS-L với ICOS trên tế bào Treg. Tế bào Treg biểu hiện ICOS được tìm thấy trong các loại khối u bao gồm khối u lỏng như u lympho. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước sử dụng protein liên kết ICOS theo sáng chế trong đó protein liên kết ICOS phong bế tương tác của ICOS-L với ICOS trên tế bào Treg.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa protein liên kết ICOS hoặc kháng thể đơn dòng như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một khía cạnh, dược phẩm theo sáng chế còn chứa ít nhất một chất chống ung thư. Theo một khía cạnh, dược phẩm theo sáng chế còn chứa ít nhất một chất điều biến miễn dịch thứ hai. Theo một khía cạnh, dược phẩm theo sáng chế còn chứa ít nhất một chất hỗ trợ kích thích miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh nhiễm trùng cho người cần điều trị trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng dược phẩm theo sáng chế cho người cần điều trị. Theo một phương án, người này mắc bệnh ung thư. Theo một phương án, người này mắc bệnh nhiễm trùng. Theo một phương án, người này mắc HIV. Theo một khía cạnh, phương pháp còn bao gồm bước sử dụng ít nhất một chất chống ung thư cho người cần điều trị. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng ít nhất một chất điều biến miễn dịch thứ hai cho người cần điều trị. Theo một khía cạnh khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng chất hỗ trợ kích thích miễn dịch cho người cần điều trị.

Theo một khía cạnh, người cần điều trị có khối u rắn. Theo một khía cạnh, khối u được chọn từ bệnh ung thư đầu và cổ, ung thư dạ dày, khối u ác tính, ung thư biểu mô thận (RCC), bệnh ung thư thực quản, ung thư biểu mô tế bào phổi không nhỏ, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư buồng trứng và ung thư tuyến tụy. Theo một khía cạnh, người cần điều trị mắc một hoặc nhiều các bệnh sau: ung thư đại trực tràng (CRC), thực quản, cổ, bàng quang, ung thư vú, đầu và cổ, buồng trứng, khối u ác tính, ung thư biểu mô thận (RCC), ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư biểu mô tế bào phổi không nhỏ, u trung biểu mô, và bệnh ung thư tuyến tiền liệt. Theo một khía cạnh khác, người này mắc khối u lỏng như u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), các u tủy, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), u lympho thể nang, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính và bệnh bạch cầu cấp tính do tủy xương.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị hoặc làm thuyên giảm mức nghiêm trọng của bệnh ung thư được chọn từ: não (u thần kinh đệm), u nguyên bào đệm, hội chứng Bannayan-Zonana, bệnh Cowden, bệnh Lhermitte-Duclos, ung thư vú, ung thư vú gây viêm, khối u Wilm, ung thư mô liên kết của Ewing, ung thư mô liên kết từ các cơ xương, u màng não thất, u nguyên bào tủy, ruột kết, đầu và cổ, thận, phổi, gan, khối u ác tính, buồng trứng, tuyến tụy, tuyến tiền liệt, ung thư mô liên kết, ung thư mô liên kết xương, tế bào khối u lớn của xương, tuyến giáp, bệnh bạch cầu tế bào T nguyên bào lympho, bệnh

bạch cầu cấp tính do tủy xương, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào hình tóc, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu cấp tính từ tủy xương, bệnh bạch cầu ưa bạch cầu trung tính mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào T nguyên bào lympho cấp tính, u tương bào, bệnh bạch cầu tế bào lớn nguyên bào miễn dịch, bệnh bạch cầu tế bào vôi, bệnh bạch cầu u tủy tiểu cầu mẹ, u tủy, bệnh bạch cầu tế bào nhân khổng lồ cấp tính, bệnh bạch cầu tiền tủy bào, chứng tăng hồng cầu - bạch cầu, u lympho ác tính, u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào T nguyên bào lympho, u lympho Burkitt, u lympho thể nang, u nguyên bào thần kinh, ung thư bàng quang, ung thư tế bào chuyển tiếp, ung thư phổi, ung thư âm hộ, ung thư cổ, ung thư niêm mạc tử cung, ung thư thận, u trung biểu mô, ung thư thực quản, ung thư tuyến nước bọt, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày, ung thư mũi hầu, ung thư thuộc má, ung thư miệng, GIST (khối u mô đệm đường tiêu hoá) và ung thư tinh hoàn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" và thuật ngữ tương đương của nó có nghĩa là có tác dụng trị liệu. Liên quan đến tình trạng bệnh lý cụ thể, điều trị có nghĩa là: (1) cải thiện hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý của một hoặc nhiều biểu hiện sinh lý của tình trạng bệnh lý, (2) can thiệp vào (a) một hoặc nhiều thời điểm trong quá trình sinh lý mà dẫn đến hoặc chịu trách nhiệm đối với tình trạng bệnh lý hoặc (b) một hoặc nhiều sự biểu hiện sinh lý của tình trạng bệnh lý, (3) làm giảm nhẹ một hoặc nhiều triệu chứng, tác dụng hoặc tác dụng phụ liên quan tới tình trạng bệnh lý hoặc việc điều trị của nó, (4) làm chậm sự tiến triển tình trạng bệnh lý hoặc một hoặc nhiều sự biểu hiện sinh lý của tình trạng bệnh lý và/hoặc (5) chữa khỏi tình trạng bệnh lý hoặc một hoặc nhiều sự biểu hiện sinh lý của tình trạng bệnh lý bằng cách loại trừ hoặc làm giảm đến mức không thể phát hiện một hoặc nhiều sự biểu hiện sinh lý của tình trạng bệnh lý trong khoảng thời gian xác định đến trạng thái thuyên giảm dần đối với sự biểu hiện mà không cần điều trị bổ sung trong thời gian thuyên giảm dần. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xác định được khoảng thời gian được xác định là thuyên giảm dần đối với bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cụ thể. Do đó, việc điều trị dự phòng cũng được xem là có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng "việc ngăn ngừa" không phải là thuật ngữ tuyệt đối. Đối với thuốc, "việc ngăn ngừa" được hiểu là đề cập đến việc phòng ngừa bằng cách sử dụng hoạt chất để về cơ bản giảm bớt khả năng xảy ra hoặc mức nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý hoặc sự biểu hiện sinh lý của nó, hoặc để trì hoãn sự khởi phát của tình trạng bệnh lý hoặc sự biểu hiện sinh

lý của nó. Việc điều trị dự phòng là thích hợp, ví dụ, nếu đối tượng được xác định là có nguy phát triển bệnh ung thư cao, như nếu đối tượng có tiền sử gia đình mắc ung thư hoặc nếu đối tượng bị phơi nhiễm với chất gây ung thư.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "ung thư", "bệnh ung thư", và "khối u" được sử dụng thay thế cho nhau và đề cập đến tế bào mà trải qua sự biến đổi ác tính mà khiến chúng gây bệnh cho cơ thể vật chủ. Tế bào ung thư nguyên phát có thể được phân biệt một cách dễ dàng với tế bào không ung thư bằng kỹ thuật đã biết, cụ thể là xét nghiệm mô bệnh học. Định nghĩa về tế bào ung thư, trong bản mô tả này, bao gồm không chỉ tế bào ung thư nguyên phát, mà còn bao gồm tế bào bất kỳ được tạo ra từ tế bào ung thư nguyên phát. Định nghĩa này bao gồm tế bào ung thư di căn, và môi trường nuôi cấy in vitro và dòng tế bào được tạo ra từ tế bào ung thư. Khi đề cập đến loại ung thư mà thường biểu thị dưới dạng khối u rắn, khối u "có thể phát hiện lâm sàng" là khối u mà có thể phát hiện trên cơ sở khối lượng khối u; ví dụ, bằng các phương pháp như chụp cắt lớp vi tính (CT), tạo ảnh cộng hưởng từ (MRI), tia X, sóng siêu âm hoặc bắt mạch để xét nghiệm vật lý, và/hoặc khối u có thể phát hiện nhờ sử dụng sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên đặc hiệu ung thư trong mẫu có thể thu được từ bệnh nhân. Khối u có thể là bệnh ung thư sinh huyết (hoặc tạo máu hoặc liên quan đến máu), ví dụ, ung thư được tạo ra từ tế bào máu hoặc tế bào miễn dịch, mà có thể được gọi là "khối u lỏng". Ví dụ cụ thể về tình trạng bệnh lý lâm sàng trên cơ sở khối u tạo máu bao gồm bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính và bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính; bệnh lý ác tính huyết tương bào như u tủy, macroglobulin huyết của MGUS và Waldenstrom; u lympho như u lympho không Hodgkin, u lympho Hodgkin; và bệnh tương tự.

Bệnh ung thư có thể là ung thư bất kỳ trong đó các tế bào non ác tính bất thường hoặc sự tăng sinh tế bào không mong muốn có mặt hoặc được chẩn đoán là ung thư tạo máu, bao gồm cả bệnh lý ác tính dạng lympho và dạng tủy. Bệnh lý dạng tủy ác tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính (hoặc từ tủy bào hoặc tủy xương hoặc nguyên tủy bào) (không biệt hóa hoặc biệt hóa), bệnh bạch cầu cấp tính tiền tủy bào (hoặc tiền tủy bào hoặc tiền tủy xương hoặc tiền nguyên tủy bào), bệnh bạch cầu cấp tính dòng bạch cầu đơn nhân (hoặc dòng bạch cầu đơn nhân nguyên tủy bào), bệnh bạch cầu cấp tính bạch cầu đơn nhân to (hoặc nguyên bạch cầu đơn nhân), chứng tăng hồng cầu - bạch cầu và bệnh bạch cầu tế bào nhân khổng lồ (hoặc tiểu cầu mẹ). Chứng bệnh

bạch cầu còn có thể được gọi là bệnh bạch cầu cấp tính dạng tủy (hoặc từ tủy bào hoặc tủy xương) (AML). Bệnh lý dạng tủy ác tính còn bao gồm rối loạn tủy xương (MPD) mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh bạch cầu mạn tính từ tủy xương (hoặc dạng tủy) (CML), bệnh bạch cầu mạn tính dòng bạch cầu đơn nhân (CMML), tăng tiểu cầu tiên phát (hoặc chứng tăng tiểu cầu), và đa hồng cầu nguyên phát (PCV). Bệnh lý dạng tủy ác tính còn bao gồm loạn sản tủy (hoặc hội chứng loạn sản tủy hoặc MDS), mà có thể được gọi là thiếu máu dai dẳng (RA), thiếu máu dai dẳng với sự dư thừa tế bào non (RAEB), và thiếu máu dai dẳng với sự dư thừa tế bào non biến đổi (RAEBT); cũng như xơ hóa tủy xương (MFS) có hoặc không có dị sản dạng tủy không rõ căn nguyên.

Ung thư sinh huyết còn bao gồm bệnh lý dạng lympho ác tính, mà có thể ảnh hưởng đến hạch bạch huyết, lá lách, tủy xương, máu ngoại vi, và/hoặc vị trí ung thư đã lan rộng ra các hạch. Ung thư dạng lympho bao gồm bệnh lý ác tính tế bào B, mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, u lympho không Hodgkin tế bào B (B-NHL). B-NHL có thể không đau (hoặc loại nhỏ), loại trung bình (hoặc xâm thực) hoặc loại lớn (xâm thực rất nhanh). U lympho tế bào B không đau bao gồm u lympho thể nang (FL); u lympho tế bào nhỏ (SLL); u lympho vùng rìa (MZL) bao gồm MZL hạch, MZL đã lan rộng ra các hạch, MZL lách và MZL lách với tế bào bạch huyết có lông; u lympho loại lympho-tương bào (LPL); và u lympho mô dạng lympho liên quan đến niêm mạc (MALT hoặc ung thư đã lan rộng ra các hạch vùng rìa). B-NHL loại trung bình bao gồm u lympho tế bào vỏ (MCL) có hoặc không có sự tham gia của bạch cầu, u lympho tế bào lớn khuếch tán (DLBCL), u lympho tế bào lớn thể nang (loại 3 hoặc loại 3B), và u lympho ở trung thất nguyên phát (PML). B-NHL loại lớn bao gồm u lympho Burkitt (BL), u lympho giống Burkitt, u lympho tế bào nhỏ không bị phân cắt (SNCL) và u lympho nguyên bào lympho. B-NHL khác bao gồm u lympho nguyên bào miễn dịch (hoặc u tế bào miễn dịch), u lympho nguyên phát tràn dịch, u lympho liên quan đến HIV (hoặc liên quan đến AIDS), và rối loạn tăng sinh lympho sau cấy ghép (PTLD) hoặc u lympho. Bệnh lý ác tính tế bào B còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tiền tế bào lympho (PLL), macroglobulin huyết của Waldenstrom (WM), bệnh bạch cầu tế bào hình tóc (HCL), bệnh bạch cầu lympho bào hạt lớn (LGL), bệnh bạch cầu cấp tính dạng lympho (hoặc tế bào lympho hoặc nguyên bào lympho), và bệnh Castleman. NHL còn có thể bao gồm u lympho không Hodgkin tế bào T (T-NHL), mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở u lympho không Hodgkin tế bào T chưa xác định (NOS), u lympho tế bào T ngoại biên

(PTCL), u lympho tế bào lớn tự ghép (ALCL), rối loạn dạng lympho phù mạch (AILD), u lympho tế bào tự diệt ở mũi (NK)/tế bào T, u lympho gamma/delta, u lympho tế bào T da, u sùi dạng nấm, và hội chứng Sezary.

Ung thư sinh huyết còn bao gồm u lympho Hodgkin (hoặc bệnh) bao gồm u lympho Hodgkin cổ điển, u lympho Hodgkin xơ cứng mạch máu, u lympho Hodgkin tế bào hỗn hợp, u lympho Hodgkin ưu thế tế bào lympho hạt (LP), u lympho Hodgkin hạch LP, và u lympho Hodgkin thiếu hụt lympho hạt. Ung thư sinh huyết còn bao gồm bệnh hoặc ung thư huyết tương bào như u tuỷ (MM) bao gồm MM âm ỉ, bệnh lý gamma đơn dòng không xác định (hoặc chưa biết hoặc không rõ ràng) (MGUS), u tương bào (xương, ngoài tuỷ sống), u lympho dạng lympho-tương bào (LPL), macroglobulin huyết Waldenström, bệnh bạch cầu huyết tương bào, và chứng thoái hóa dạng tinh bột nguyên phát (AL). Ung thư sinh huyết còn có thể bao gồm bệnh ung thư khác có tế bào sinh huyết bổ sung, bao gồm bạch cầu đa nhân (hoặc bạch cầu trung tính), bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu ưa eosin, tế bào hình cây, tiểu huyết cầu, hồng cầu và tế bào tự diệt. Mô mà bao gồm tế bào sinh huyết trong bản mô tả này được gọi là "tế bào sinh huyết mô" bao gồm tuỷ xương; máu ngoại vi; tuyến ức; và mô lympho ngoại biên, như lá lách, hạch bạch huyết, mô lympho liên quan đến niêm mạc (như mô lympho liên quan đến gut), amidan, các phiến Peyer và ruột thừa, và mô lympho liên quan đến niêm mạc khác, ví dụ, đường cuống phổi.

Protein liên kết ICOS, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế còn có thể được sử dụng để chữa khỏi, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm trùng và bệnh nhiễm trùng. Protein liên kết ICOS có thể được sử dụng ở dạng riêng rẽ, hoặc kết hợp với vacxin, để kích thích đáp ứng miễn dịch đối với tác nhân gây bệnh, độc tố, và chính kháng nguyên. Protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch đối với virus lây nhiễm cho người, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus gây suy giảm miễn dịch từ người, virus gây bệnh viêm gan nhóm A, B và C, virus gây ung thư vòm họng Epstein Barr, virus cự bào từ người, virus u nhú từ người, virus gây bệnh mụn rộp (Herpes). Protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch đối với bệnh nhiễm trùng với vi khuẩn hoặc nấm ký sinh, và tác nhân gây bệnh khác. Tốt hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị từ người mà tiếp xúc với độc tố hoặc tác nhân gây bệnh cụ thể. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh nhiễm trùng cho đối tượng bao gồm bước sử dụng cho đối tượng protein liên kết ICOS, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó.

Ví dụ về bệnh nhiễm trùng mà protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể hữu dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, HIV, bệnh viêm gan (A, B, & C), bệnh cúm, bệnh mụn rộp (Herpes), bệnh do nhiễm ký sinh trùng gây nhiễm trùng ở ruột (*Giardia*), bệnh sốt rét (Malaria), bệnh do nhiễm ký sinh trùng (*Leishmania*), tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*), trực khuẩn mủ xanh (*Pseudomonas Aeruginosa*). Một số ví dụ về virus gây bệnh gây nhiễm trùng có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm HIV, virus gây bệnh viêm gan (A, B, hoặc C), virus Herpes (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, và CMV, virus Epstein Barr), virus gây bệnh hô hấp adenovirus, virus cúm, virus flavivirus, virus đường tiêu hóa echovirus, virus gây cảm lạnh rhinovirus, virus tay chân miệng, virus gây hội chứng hô hấp Trung Đông, virus hợp bào hô hấp, virus quai bị, virus rota, virus sởi, virus rubella, virus gây bệnh parvo ở chó, virus đậu mùa, virus HTLV, virus gây sốt vàng, virus u nhú, virus u mềm lây, virus bại liệt, virus dại, virus JC và virus gây viêm não.

Một số ví dụ về vi khuẩn gây bệnh gây ra bệnh nhiễm trùng có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm vi khuẩn chlamydia, rickettsial, mycobacteria, staphylococci, streptococci, pneumonococci, meningococci và conococci, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, diphtheria, salmonella, bacilli, cholera, tetanus, botulism, anthrax, plague, leptospirosis, và vi khuẩn bệnh Lyme.

Một số ví dụ về nấm gây bệnh gây ra bệnh nhiễm trùng có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm nấm *Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, v.v.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (fumigatus, niger, v.v.), Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizophus), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brailiensis*, *Coccidioides immitis* và *Histoplasma capsulatum*.

Một số ví dụ về ký sinh trùng gây bệnh gây ra bệnh nhiễm trùng có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế 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*, Toxohuyết tương gondi, và *Nippostrongylus brailiensis*.

Nhiễm khuẩn huyết là tình trạng bệnh lý có thể gây tử vong mà đặc trưng bởi tình trạng viêm toàn thân (còn gọi là hội chứng đáp ứng viêm hệ thống hoặc SIRS) và sự có mặt của bệnh nhiễm trùng đã biết hoặc nghi ngờ. Cơ thể có thể phát triển đáp ứng viêm

này bằng hệ miễn dịch đối với vi khuẩn trong máu, nước tiểu, phổi, da, hoặc mô khác. Thời gian ngắn đối với nhiễm khuẩn huyết là gây độc máu, sau đây thường được gọi là gây nhiễm trùng máu. Nhiễm khuẩn huyết nghiêm trọng là đáp ứng viêm hệ thống, cùng với bệnh nhiễm trùng, và sự có mặt của rối loạn chức năng các cơ quan.

Nhiễm trùng máu là thuật ngữ có liên quan trong y tế đề cập đến sự có mặt của sinh vật gây bệnh trong dòng máu, dẫn đến nhiễm khuẩn huyết. Tình trạng này chưa xác định được một cách rõ ràng.

Nhiễm khuẩn huyết và ung thư có chung cơ chế ngăn ngừa miễn dịch tương tự bao gồm sự gia tăng tế bào T điều hòa, gia tăng tế bào ngăn ngừa được tạo ra từ tủy, gia tăng sự biểu hiện của phân tử đồng kích thích âm, giảm sự biểu hiện bạch cầu đơn nhân/đại thực bào HLA-DR. Nhiễm khuẩn huyết và ung thư là rối loạn đầu tiên của viêm mạn tính. Viêm mạn tính kích thích đáp ứng điều hòa miễn dịch hiệu quả và kéo dài, bao gồm việc gia tăng tế bào điều hòa T và tăng điều hòa PD-1 và các chất điều hòa âm khác trên tế bào hiệu lực. Barouch D.H. and Deeks S.G.; Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. *Science* 345:169-174 2014. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị nhiễm khuẩn huyết cho người cần điều trị bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của protein liên kết kháng nguyên ICOS theo sáng chế cho người cần điều trị. Xem tài liệu: Boomer, et al. *JAMA* 306:2594-2605 (2011); Meisel, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 180:640-648 (2009); và Hall, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 37:525-532 (2011).

Protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với protein và/hoặc peptit tái tổ hợp khác (như kháng nguyên khối u hoặc tế bào ung thư) để gia tăng đáp ứng miễn dịch đối với các protein này (cụ thể là, trong quy trình tạo chủng ngừa).

Ví dụ, protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên bằng cách sử dụng đồng thời ít nhất là một protein liên kết ICOS với kháng nguyên liên quan (ví dụ, vaccin). Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên cho đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng: (i) kháng nguyên; và (ii) protein liên kết

ICOS theo sáng chế, 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 khối u, kháng nguyên virus, kháng nguyên vi khuẩn hoặc kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh. Ví dụ về kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên khối u, hoặc kháng nguyên virus, vi khuẩn hoặc tác nhân gây bệnh khác.

Rào cản lớn đối với việc loại bỏ HIV là việc duy trì tế bào có thể bị nhiễm mà không biểu hiện kháng nguyên virus, và tránh sự giám sát miễn dịch. Chiến lược hiện nay để loại bỏ nguồn chứa virus tiềm ẩn được gọi là phương pháp “đá và tiêu diệt”, nhằm hoạt hóa lại sự biểu hiện gen HIV (“đá”) dưới dạng hoạt hóa tế bào dẫn đến sự hoạt hóa lại HIV, và thanh thải tế bào đã được hoạt hóa lại (“tiêu diệt”). Sự hoạt hóa tế bào được kiểm soát bởi sự cân bằng của chất điều hòa dương và âm được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T. Việc thay đổi sự cân bằng này bằng cách chủ vận chất điều hòa dương và chủ vận chất điều hòa âm có thể tạo thuận lợi hoạt hóa lại HIV.

Yếu tố đồng kích thích tế bào T cảm ứng (ICOS) là chất điều hòa dương mà sự biểu hiện của nó tăng trên tế bào T CD4 sau khi được kích thích. ICOS có chức năng thúc đẩy sự tăng sinh tế bào T, sự sản sinh xytokin và sự biệt hóa. Một nhóm phụ tế bào T quan trọng mà biểu hiện mức cao của PD-1 và ICOS là tế bào trợ giúp có nang T (T_{fh}). Tế bào T_{fh} giúp tế bào B được biệt hóa, chuyển đổi nhóm, siêu đột biến tế bào xoma và cần cho sự tạo ra trung tâm phôi. Tế bào T_{fh} được gia tăng đáng kể sau khi nhiễm trùng HIV/SIV và sự rối loạn điều hòa của chúng trong bệnh nhiễm trùng mạn tính vào tế bào góp phần vào tính miễn dịch tế bào B không được bắt cặp. Tế bào T_{fh} đã được phân loại cho thấy là có mức ADN của HIV cao hơn các nhóm phụ CD4 lympho khác và sự phát triển quá nhanh của virus được quan sát sau khi được kích thích. Tế bào T_{fh} nằm trong trung tâm phôi và tiếp xúc với hạt virus HIV được giữ lại trên vùng nang tế bào hình sao mà có thể tạo thuận lợi cho việc lây nhiễm chúng. Ngoài ra, tế bào T CD8 tiếp cận rất ít đến trung tâm phôi và tế bào CD8 thể nang thường có độc tính bị làm giảm, do đó giúp tế bào T_{fh} tránh khỏi sự theo dõi kháng virus. Do đó, tế bào T_{fh} là nguồn chứa HIV được bảo vệ quan trọng và phương pháp mà hướng đích PD-1 và ICOS có thể hướng đích một cách chọn lọc tế bào T_{fh} và có khả năng ứng dụng làm một phần của chế độ điều trị HIV. Thích hợp là, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị từ người nhiễm HIV bao gồm bước sử dụng protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng nguyên khối u” là protein mà được tạo ra bằng tế bào khối u mà tạo ra đáp ứng miễn dịch, cụ thể là đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T. Thuật ngữ “kháng nguyên khối u” trong bản mô tả này bao gồm cả kháng nguyên đặc hiệu khối u và kháng nguyên liên quan đến khối u. Kháng nguyên đặc hiệu khối u đặc biệt đối với tế bào khối u và không xảy ra trên tế bào khác trong cơ thể. Kháng nguyên liên quan đến khối u không đặc biệt đối với tế bào khối u và thay vào đó còn được biểu hiện trên tế bào bình thường dưới các điều kiện mà không cảm ứng trạng thái dung nạp gây miễn dịch với kháng nguyên. Sự biểu hiện của kháng nguyên trên khối u có thể xảy ra dưới điều kiện mà giúp hệ miễn dịch đáp ứng với kháng nguyên. Kháng nguyên liên quan đến khối u có thể là kháng nguyên mà được biểu hiện trên tế bào bình thường trong sự phát triển của thai nhi khi hệ miễn dịch chưa trưởng thành và không thể đáp ứng hoặc chúng có thể là kháng nguyên mà thường có mặt ở mức rất thấp trên tế bào bình thường nhưng được biểu hiện ở mức cao hơn rất nhiều trên tế bào khối u.

Ví dụ về kháng nguyên khối u bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên sau đây: kháng nguyên biệt hóa như MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tyrosinaza, TRP-1, TRP-2 và kháng nguyên đa dòng đặc hiệu khối u như họ kháng nguyên MAGE bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, MAGE1, MAGE3, MAGE10, MAGE11, MAGE12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA6, MAGEA8, MAGEA9, MAGEB18, MAGEB6, mAbEC1, MAGED2, MAGEE1, MAGEH1, MAGEL2, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; MEL4, kháng nguyên liên quan đến khối u ác tính 100+, khối u ác tính gp100, NRIP3, NYS48, OCIAD1, OFA-iLRP, OIP5, kháng nguyên liên quan đến ung thư biểu mô buồng trứng (OV632), PAGE4, PARP9, PATE, plastin L, PRAME, kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt, proteinaza 3, prostein, Reg3a, RHAMM, ROPN1, SART2, SDCCAG8, SEL1L, SEPT1, SLC45A2, SPANX, SSX5, STXGALNAC1, STEAP4, survivin, TBC1D2, TEM1, TRP1, kháng nguyên khối u có nguồn gốc biểu mô, XAGE1, XAGE2, WT-1; kháng nguyên phôi được biểu hiện quá mức như CEA; gen đột biến gây bệnh ung thư được biểu hiện quá mức và gen ngăn ngừa khối u được gây đột biến như p53, Ra, HER-2/neu; kháng nguyên khối u đặc biệt tạo ra sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể; như BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; và kháng nguyên của virus, như kháng nguyên virus Epstein Barr EBVA và kháng nguyên virus u nhú từ người (HPV) E6 và E7.

Kháng nguyên khối u khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ra, beta-Catenin, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alpha-fetoprotein, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27,29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 liên kết protein\protein liên quan đến xyclophilin C, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, kháng nguyên liên quan đến u thần kinh đệm, gonadotropin β màng đệm từ người, alphafetoprotein (AFP), AFP phản ứng với lectin, thyroglobulin, RAGE-1, MN-CA IX, enzym phiên mã ngược telomeraza từ người, RU1, RU2 (AS), intestinal carboxyl esteraza, mut hsp70-2, M-CSF, prostaza, kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prostein, PSMA, Her2/neu, survivin và telomeraza, kháng nguyên khối u tuyến tiền liệt-ung thư biểu mô 1 (PCTA-1), ELF2M, elastaza ura bạch cầu trung tính, ephrinB2, CD19, CD20, CD22, ROR1, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, Glycolipid F77, EGFRvIII, GD-2, yếu tố tăng trưởng insulin (IGF)-I, IGF-II, thụ thể IGF-I và mesothelin.

Nói chung, chất chống ung thư bất kỳ mà có hoạt tính chống lại khối u nhạy đang được điều trị có thể cùng được sử dụng trong việc điều trị ung thư theo sáng chế. Ví dụ về chất này được mô tả trong tài liệu Cancer Principles and Practice of Oncology by V.T. Devita and S. Hellman (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể xác định được hỗn hợp của các chất nào là hữu dụng căn cứ vào đặc trưng cụ thể của hoạt chất và bệnh ung thư có liên quan. Chất chống ung thư điển hình hữu dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất kháng vi cấu trúc hình ống như diterpenoit và vinca alkalnoit; phức hợp phối trí platin; chất alkyl hóa như mù tạc nitơ, oxazaphosphorin, alkylsulfonat, nitrosoure, và triazen; chất kháng sinh như anthracyclin, actinomycin và bleomycin; chất ức chế topoisomeraza II như epipodophyllotoxin; chất chống chuyển hóa như purin và chất tương tự pyrimidin và chất kháng folat; chất ức chế topoisomeraza I như camptothecin; hormon và chất tương tự hormon; chất ức chế con đường truyền tín hiệu; chất ức chế tạo mạch tyrosin kinaza không thụ thể; chất trị liệu miễn dịch; chất gây chết tế bào theo chương trình; và chất ức chế tín hiệu chu trình tế bào.

Ví dụ về hoạt chất khác hoặc thành phần để sử dụng kết hợp hoặc cùng được sử dụng với protein liên kết ICOS theo sáng chế là chất chống ung thư bao gồm hóa chất trị liệu, chất điều hòa miễn dịch hoặc chất điều biến miễn dịch và chất bổ trợ kích thích miễn dịch bất kỳ.

Chất chống vi cấu trúc hình ống hoặc chất chống gián phân là hoạt chất đặc hiệu pha chống lại vi cấu trúc hình ống của tế bào khối u trong pha M hoặc nguyên phân của chu trình tế bào. Ví dụ về chất kháng vi cấu trúc hình ống bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, diterpenoit và vinca alkaloit.

Diterpenoit, mà được tạo ra từ nguồn tự nhiên, chất kháng ung thư đặc hiệu pha mà hoạt động ở pha G₂/M của chu trình tế bào. Được tin rằng diterpenoit làm ổn định tiểu đơn vị β -tubulin của vi cấu trúc hình ống, bằng cách liên kết với protein này. Sự phân tách protein xuất hiện sau đó bị ức chế với việc dừng quá trình nguyên phân và sau đó là quá trình chết tế bào. Ví dụ về diterpenoit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, paclitaxel và chất tương tự của nó docetaxel.

Paclitaxel, 5 β ,20-epoxy-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexa-hydroxytax-11-en-9-on 4,10-diaxetat 2-benzoat 13-este với (2R,3S)-N-benzoyl-3-phenylisoserin; là sản phẩm diterpen tự nhiên được phân lập từ cây thủy tùng thái bình dương *Taxus brevifolia* và có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm TAXOL®. Nó là thành viên họ taxan của terpen. Hợp chất này được phân lập lần đầu tiên vào năm 1971 bởi Wani et al. J. Am. Chem. Soc., 93:2325, 1971), mà đặc trưng cấu trúc của nó được xác định bằng phương pháp hóa học và tinh thể học tia X. Một cơ chế về hoạt tính của nó liên quan đến khả năng liên kết với tubulin của paclitaxel, nhờ đó ức chế sự phát triển tế bào ung thư. Xem, Schiff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1561-1565 (1980); Schiff et al., Nature, 277:665-667 (1979); Kumar, J. Biol. Chem, 256: 10435-10441 (1981). Về quá trình tổng hợp và hoạt tính kháng ung thư của một số dẫn xuất paclitaxel, xem tài liệu: D. G. I. Kingston et al., Studies in Organic Chemistry vol. 26, entitled "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P.W. Le Quesne, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1986) pp 219-235.

Paclitaxel đã được phê duyệt để sử dụng lâm sàng trong việc điều trị chống ung thư buồng trứng ở Mỹ (Markman et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intern. Med., 111:273) và điều trị ung thư vú (Holmes et al., J. Nat. Cancer Inst., 83:1797, 1991,) nó là thuốc tiềm năng để điều trị ung thư biểu mô da (Einzig

et. al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46) và đầu và cổ (Foratire et. al., Sem. Oncol., 20:56, 1990). Hợp chất này còn cho thấy hiệu quả điều trị bệnh thận đa u nang (Woo et. al., Nature, 368:750, 1994), ung thư phổi và sốt rét. Việc điều trị cho bệnh nhân bằng paclitaxel tạo ra sự ức chế tủy xương (nhiều dòng tế bào, Ignoff, R.J. et. al, Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998) liên quan đến thời gian định liều trên ngưỡng nồng độ (50nM) (Kearns, C.M. Et. al., Seminars in Oncology, 3(6) p.16-23, 1995).

Docetaxel, (2R,3S)- N-carboxy-3-phenylisoserin, N-*tert*-butyl este, 13-este với 5 β -20-epoxy-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahydroxytax-11-en-9-on 4-axetat 2-benzoat, trihydrat; có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm là TAXOTERE®. Docetaxel được chỉ định để điều trị ung thư vú. Docetaxel là dẫn xuất bán tổng hợp của paclitaxel *q.v.*, được điều chế bằng cách sử dụng tiền chất tự nhiên, 10-deacetyl-baccatin III, được chiết từ lá của cây thủy tùng châu Âu. Độc tính giới hạn liều của docetaxel là giảm bạch cầu trung tính.

Vinca alkalnoit là chất chống ung thư đặc hiệu pha được tạo ra từ cây dừa cạn. Vinca alkalnoit tác động ở pha M (nguyên phân) của chu trình tế bào bằng cách liên kết đặc hiệu với tubulin. Sau đó, phân tử tubulin được liên kết không thể trùng hợp vào vi cấu trúc hình ống. Sự nguyên phân được cho là bị dừng lại trong pha giữa với quá trình chết tế bào sau đó. Ví dụ về vinca alkalnoit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vinblastin, vincristin, và vinorelbin.

Vinblastin, vincalkebblastin sulfat, có bán sẵn trên thị trường dưới tên thương mại VELBAN® ở dạng dung dịch tiêm. Mặc dù có thể được chỉ định làm phác đồ trị liệu thứ hai cho các khối u rắn, tuy nhiên về cơ bản nó được chỉ định trong việc điều trị ung thư tinh hoàn và các u lympho bao gồm bệnh Hodgkin; và tế bào lympho và u lympho thuộc mô bào. Việc giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ giới hạn liều của vinblastin.

Vincristin, vincalkebblastin, 22-oxo-, sulfat, có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm dưới tên ONCOVIN®. Vincristin được chỉ định để điều trị bệnh bạch cầu cấp tính và còn được sử dụng trong chế độ điều trị đối với u lympho Hodgkin và không Hodgkin ác tính. Rụng tóc và tác động lên hệ thần kinh là tác dụng phụ thông thường nhất của vincristin và ở mức độ nhỏ hơn sự giảm chức năng tạo máu và viêm niêm mạc dạ dày - ruột non xảy ra.

Vinorelbin, 3',4'-didehydro -4'-deoxy-C'-norvincal leukoblastin [R-(R*,R*)-2,3-dihydroxybutandioat (1:2)(muối)], có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm chứa vinorelbin tartrat (NAVELBINE®), là vinca alkaloid bán tổng hợp. Vinorelbin được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác, như cisplatin, trong việc điều trị các khối u rắn, cụ thể là ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư vú di căn tiến, và ung thư tuyến tiền liệt chống lại hormone. Việc giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của vinorelbin.

Phức hợp phối trí platin là chất chống ung thư không đặc hiệu pha, mà tương tác với ADN. Phức hợp platin đi vào tế bào khối u và trải qua quá trình hydrat hóa và tạo ra kết chéo trong cùng một sợi và sợi đối diện liên với ADN gây ra tác dụng sinh lý bất lợi cho khối u. Ví dụ về phức hợp phối trí platin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cisplatin và carboplatin.

Cisplatin, cis-diamminedichloroplatin, có bán sẵn trên thị trường dưới tên PLATINOL® ở dạng dung dịch tiêm. Cisplatin về cơ bản được chỉ định trong việc điều trị di căn tinh hoàn, ung thư buồng trứng và ung thư bàng quang di căn tiến. Tác dụng phụ giới hạn liều cơ bản của cisplatin là gây độc thận, mà có thể được kiểm soát bằng quá trình hydrat hóa và đi tiểu, và gây hại thính giác.

Carboplatin, platin, diammin [1,1-xyclobutan-dicarboxylat(2-)-O,O'], có bán sẵn trên thị trường dưới tên PARAPLATIN® ở dạng dung dịch tiêm. Carboplatin về cơ bản được chỉ định trong phác đồ trị liệu thứ nhất và thứ hai cho ung thư biểu mô buồng trứng tiến triển. Sự ức chế tủy xương là độc tính giới hạn liều của carboplatin.

Chất alkyl hóa là chất chống ung thư không đặc hiệu pha và có ái lực điện tử mạnh. Nói chung, chất alkyl hóa tạo ra liên kết cộng hóa trị, bằng cách alkyl hóa, với ADN thông qua gốc ái điện tử của phân tử ADN như nhóm phosphat, amino, sulfhydryl, hydroxyl, carboxyl, và imidazol. Quá trình alkyl hóa này làm hỏng chức năng của axit nucleic dẫn đến sự chết tế bào. Ví dụ về chất alkyl hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mù tạc nitơ như cyclophosphamid, melphalan, và chlorambucil; alkyl sulfonat như busulfan; nitrosoure như carmustin; và triazen như dacarbazin.

Cyclophosphamid, 2-[bis(2-chloroetyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin 2-oxit monohydrat, có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm hoặc viên nén dưới tên CYTOXAN®. Cyclophosphamid được chỉ định làm hoạt chất

riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác, trong việc điều trị u lympho ác tính, u tuỷ, và bệnh bạch cầu. Rụng tóc, buồn nôn, nôn và giảm bạch cầu là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của cyclophosphamid.

Melphalan, 4-[bis(2-chloroethyl)amino]-L-phenylalanin, có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm hoặc viên nén dưới tên ALKERAN®. Melphalan được chỉ định để điều trị làm thuyên giảm u tuỷ và ung thư biểu mô không cắt bỏ của buồng trứng. Sự ức chế tủy xương là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của melphalan.

Chlorambucil, axit 4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzenbutanoic, có bán sẵn trên thị trường ở dạng viên nén LEUKERAN®. Chlorambucil được chỉ định để điều trị làm thuyên giảm bệnh bạch cầu bạch huyết mạn tính, và u lympho ác tính như ung thư mô liên kết dạng lympho, u lympho thể nang lớn, và bệnh Hodgkin. Sự ức chế tủy xương là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của chlorambucil.

Busulfan, 1,4-butandiol dimetansulfonat, có bán sẵn trên thị trường ở dạng viên nén MYLERAN®. Busulfan được chỉ định để điều trị làm thuyên giảm bệnh bạch cầu cấp tính do tủy xương. Sự ức chế tủy xương là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của busulfan.

Carmustin, 1,3-[bis(2-chloroethyl)-1-nitrosoure, có bán sẵn trên thị trường ở dạng lọ nhỏ riêng rẽ chứa thành phần được làm đông khô dưới tên BiCNU®. Carmustin được chỉ định để điều trị làm thuyên giảm ở dạng hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với chất khác đối với khối u não, u tuỷ, bệnh Hodgkin, và u lympho không Hodgkin. Việc trì hoãn giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của carmustin.

Dacarbazin, 5-(3,3-dimetyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamid, có bán sẵn trên thị trường ở dạng lọ nhỏ riêng rẽ chứa material làm DTIC-Dome®. Dacarbazin được chỉ định để điều trị khối u ác tính di căn và kết hợp với chất khác đối với liệu pháp trị liệu thứ hai cho bệnh Hodgkin. Chứng buồn nôn, nôn, và chán ăn là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của dacarbazin.

Thuốc kháng sinh chống ung thư là chất không đặc hiệu pha, mà liên kết hoặc xen kẽ với ADN. Nói chung, tác dụng này làm gây phức hợp ADN ổn định hoặc sợi, mà làm hỏng chức năng thông thường của axit nucleic dẫn đến sự chết tế bào. Ví dụ về chất kháng

sinh chống ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, actinomycin như dactinomycin, anthrocylin như daunorubicin và doxorubicin; và bleomycin.

Dactinomycin, còn được gọi là Actinomycin D, có bán sẵn trên thị trường ở dạng thuốc tiêm dưới tên COSMEGEN®. Dactinomycin được chỉ định để điều trị khối u Wilm và ung thư mô liên kết từ các cơ xương. Chứng buồn nôn, nôn và chán ăn là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của dactinomycin.

Daunorubicin, (8S-cis-)-8-axetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-metoxy-5,12 naphthaxendion hydroclorua, có bán sẵn trên thị trường ở dạng thuốc tiêm liposom dưới tên DAUNOXOME® hoặc dạng thuốc tiêm dưới tên CERUBIDINE®. Daunorubicin được chỉ định để cảm ứng làm thuyên giảm dần trong việc điều trị bệnh bạch cầu không tế bào lympho cấp tính và ung thư mô liên kết Kaposi liên quan đến HIV tiến triển. Việc giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của daunorubicin.

Doxorubicin, (8S, 10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-8-glycoloyl, 7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-metoxy-5,12 naphthaxendion hydroclorua, có bán sẵn trên thị trường ở dạng dạng thuốc tiêm dưới tên RUBEX® hoặc ADRIAMYCIN RDF®. Doxorubicin về cơ bản được chỉ định để điều trị bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính và bệnh bạch cầu nguyên tủy bào cấp tính, nhưng còn là thành phần hữu dụng trong việc điều trị một số khối u rắn và u lympho. Việc giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của doxorubicin.

Bleomycin, hỗn hợp của kháng sinh glycopeptit gây độc tế bào được phân lập từ chủng *Streptomyces verticillus*, có bán sẵn trên thị trường dưới tên BLENOXANE®. Bleomycin được chỉ định để điều trị làm thuyên giảm, ở dạng hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với chất khác, đối với tế bào ung thư biểu mô có vảy, u lympho, và ung thư biểu mô tinh hoàn. Tính gây độc phổi và da là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của bleomycin.

Chất ức chế topoisomeraza II bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, epipodophyllotoxin.

Epipodophyllotoxin là chất chống ung thư đặc hiệu pha được tạo ra từ cây cà sấm. Epipodophyllotoxin nói chung ảnh hưởng đến tế bào trong pha S và G₂ của chu trình tế bào bằng cách tạo ra phức hợp bậc ba với topoisomeraza II và ADN gây ra sự gãy sợi ADN. Sự gãy sợi tích tụ và sau đó làm chết tế bào. Ví dụ về epipodophyllotoxin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etoposid và teniposid.

Etoposid, 4'-demetyl-epipodophyllotoxin 9[4,6-O-(R)-etyliden-β-D-glucopyranosid], có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm hoặc viên nang dưới tên VePESID® và thường được gọi là VP-16. Etoposid được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị ung thư tinh hoàn và ung thư phổi không tế bào nhỏ. Việc giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ thông thường nhất của etoposid. Tỷ lệ gây ra giảm bạch cầu thường nghiêm trọng hơn giảm lượng tiểu cầu.

Teniposid, 4'-demetyl-epipodophyllotoxin 9[4,6-O-(R)-thenyliden-β-D-glucopyranosid], có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm là VUMON® và thường được gọi là VM-26. Teniposid được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị bệnh bạch cầu cấp tính ở trẻ em. Việc giảm chức năng tạo máu là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của teniposid. Teniposid có thể cảm ứng cả sự giảm bạch cầu và sự giảm lượng tiểu cầu.

Chất chống chuyển hóa khối u là chất chống ung thư đặc hiệu pha mà tác động ở pha S (Quá trình tổng hợp ADN) của chu trình tế bào bằng cách ức chế quá trình tổng hợp ADN hoặc bằng cách ức chế quá trình tổng hợp bazơ pyrimidin hoặc purin và nhờ đó làm hạn chế quá trình tổng hợp ADN. Sau đó, pha S không được tiếp tục và làm chết tế bào. Ví dụ về chất chống ung thư chống chuyển hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, fluorouracil, metotrexat, cytarabin, mecaptopurin, thioguanin, và gemcitabin.

5-fluorouracil, 5-fluoro-2,4- (1H,3H) pyrimidindion, có bán sẵn trên thị trường ở dạng fluorouracil. Việc sử dụng 5-fluorouracil dẫn đến sự ức chế quá trình tổng hợp thymidylat và còn được kết hợp vào cả ARN và ADN. Kết quả là thường gây ra sự chết tế bào. 5-fluorouracil được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị ung thư biểu mô ung thư vú, ruột kết, trực tràng, dạ dày và tuyến tụy. Việc giảm chức năng tạo máu và viêm niêm mạc là tác dụng phụ giới hạn liều của 5-fluorouracil. Chất tương tự fluoropyrimidin khác bao gồm 5-fluoro deoxyuridin (floxuridin) và 5-fluorodeoxyuridin monophosphat.

Cytarabin, 4-amino-1- β -D-arabinofuranosyl-2 (1H)-pyrimidinon, có bán sẵn trên thị trường dưới tên CYTOSAR-U® và thường được gọi là Ara-C. Cytarabin được cho là ức chế tính đặc hiệu pha tế bào ở pha S bằng cách ức chế sự kéo dài chuỗi ADN bằng cách kết hợp đầu chặn mạch của cytarabin vào mạch ADN đang phát triển. Cytarabin được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị bệnh bạch cầu cấp tính. Chất tương tự cytidin khác bao gồm 5-azacytidin và 2',2'-difluorodeoxycytidin (gemcitabin). Cytarabin gây giảm bạch cầu, giảm lượng tiểu cầu, và viêm niêm mạc.

Mercaptopurin, 1,7-dihydro-6H-purin-6-thion monohydrat, có bán sẵn trên thị trường dưới tên PURINETHOL®. Mercaptopurin ức chế tính đặc hiệu pha tế bào ở pha S bằng cách ức chế quá trình tổng hợp ADN bằng cơ chế hiện vẫn chưa xác định được. Mercaptopurin được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị bệnh bạch cầu cấp tính. Việc giảm chức năng tạo máu và viêm niêm mạc dạ dày - ruột non được cho là tác dụng phụ của mercaptopurin ở liều cao. Chất tương tự mercaptopurin hữu dụng là azathioprin.

Thioguanin, 2-amino-1,7-dihydro-6H-purin-6-thion, có bán sẵn trên thị trường dưới tên TABLNOIT®. Thioguanin ức chế tính đặc hiệu pha tế bào ở pha S bằng cách ức chế quá trình tổng hợp ADN bằng cơ chế hiện vẫn chưa xác định được. Thioguanin được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị bệnh bạch cầu cấp tính. Việc giảm chức năng tạo máu, bao gồm giảm bạch cầu, giảm lượng tiểu cầu, và thiếu máu, là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của việc sử dụng thioguanin. Tuy nhiên, tác dụng phụ đối với dạ dày - ruột non có thể xảy ra và có thể là giới hạn liều. Chất tương tự purin khác bao gồm pentostatin, erythrohydroxynonyladenine, fludarabin phosphat, và cladribin.

Gemcitabin, 2'-deoxy-2', 2'-difluorocytidin monohydroclorua (chất đồng phân β), có bán sẵn trên thị trường dưới tên GEMZAR®. Gemcitabin ức chế tính đặc hiệu pha tế bào ở pha S và bằng cách phong bế tiến trình tế bào thông qua ranh giới G1/S. Gemcitabin được chỉ định kết hợp với cisplatin trong điều trị cục bộ ung thư phổi không tế bào nhỏ tiến triển và ở dạng riêng rẽ trong việc điều trị cục bộ ung thư tuyến tụy tiến triển. Việc giảm chức năng tạo máu, bao gồm giảm bạch cầu, giảm lượng tiểu cầu, và thiếu máu, là tác dụng phụ giới hạn liều thông thường nhất của gemcitabin sử dụng.

Metotrexat, axit N-[4[[[2,4-diamino-6-pteridiny]l]metyl]metylamin] benzoyl]-L-glutamic, có bán sẵn trên thị trường ở dạng natri metotrexat. Metotrexat ức chế tế bào pha tác dụng đặc hiệu ở pha S bằng cách ức chế quá trình tổng hợp ADN, sửa chữa và/hoặc sao chép thông qua sự ức chế reductaza của axit dihydrofolic mà cần cho quá trình tổng hợp của purin nucleotit và thymidylat. Metotrexat được chỉ định làm hoạt chất riêng rẽ hoặc kết hợp với hóa chất trị liệu khác trong việc điều trị ung thư biểu mô rau, bệnh bạch cầu màng não, u lympho không Hodgkin, và ung thư biểu mô của ung thư vú, đầu, cổ, buồng trứng và bàng quang. Việc giảm chức năng tạo máu (sự giảm bạch cầu, sự giảm lượng tiểu cầu, và sự thiếu máu) và viêm niêm mạc được cho là tác dụng phụ của việc sử dụng metotrexat.

Camptothecin, bao gồm, dẫn xuất camptothecin và camptothecin có bán sẵn hoặc đang được phát triển làm chất ức chế Topoisomernaza I. Hoạt tính gây độc tế bào của Camptothecin được cho là liên quan đến hoạt tính ức chế Topoisomernaza I của nó. Ví dụ về camptothecin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, irinotecan, topotecan, và các dạng quang học của 7-(4-metylpipezazino-metylen)-10,11-etylendioxy-20-camptothecin được mô tả sau đây.

Irinotecan HCl, (4S)-4,11-dietyl-4-hydroxy-9-[(4-piperidinopiperidino) carbonyloxy]-1H-pyrano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H,12H)-dion hydroclorua, có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm CAMPTOSAR®.

Irinotecan được tạo ra từ camptothecin mà liên kết, cùng với chất chuyển hóa hoạt tính của nó SN-38, với phức hợp Topoisomernaza I – ADN. Độc tính xảy ra được cho là kết quả của sự gãy sợi kép không thể sửa chữa do tương tác của Topoisomernaza I : ADN : irinotecan hoặc phức hợp bậc ba SN-38 với enzym sao chép. Irinotecan được chỉ định để điều trị ung thư di căn của ruột kết hoặc trực tràng. Tác dụng phụ giới hạn liều của irinotecan HCl là việc giảm chức năng tạo máu, bao gồm giảm bạch cầu trung tính, và tác động lên GI, bao gồm tiêu chảy.

Topotecan HCl, (S)-10-[(dimetylamin)metyl]-4-etyl-4,9-dihydroxy-1H-pyrano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14-(4H,12H)-dion monohydroclorua, có bán sẵn trên thị trường ở dạng dung dịch tiêm HYCAMTIN®. Topotecan được tạo ra từ camptothecin mà liên kết với phức hợp Topoisomernaza I – ADN và ngăn ngừa sự gãy sợi đơn do Topoisomernaza I đáp ứng với sợi xoắn của phân tử ADN. Topotecan được

chỉ định cho liệu pháp trị liệu thứ hai ung thư di căn biểu mô buồng trứng và ung thư phổi tế bào nhỏ. Tác dụng phụ giới hạn liều của topotecan HCl là giảm chức năng tạo máu, về cơ bản là giảm bạch cầu trung tính.

Rituximab là kháng thể khảm đơn dòng mà được bán dưới tên RITUXAN® và mAbTHERA®. Rituximab liên kết với CD20 trên tế bào B và gây ra quá trình chết tế bào theo chương trình. Rituximab được sử dụng trong tĩnh mạch và được phê duyệt để điều trị bệnh thấp khớp và u lympho không Hodgkin tế bào B.

Ofatumumab là kháng thể đơn dòng hoàn toàn từ người mà được bán dưới tên ARZERRA®. Ofatumumab liên kết với CD20 trên tế bào B và được sử dụng để điều trị bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính CLL; loại ung thư tế bào máu trắng) từ người trưởng thành mà kháng lại việc điều trị bằng fludarabin (Fludara) và alemtuzumab (Campath).

Trastuzumab (HERCEPTIN®) là kháng thể đơn dòng được nhân hóa mà liên kết với thụ thể HER2. Chỉ định chính của nó là ung thư vú dương tính với HER2.

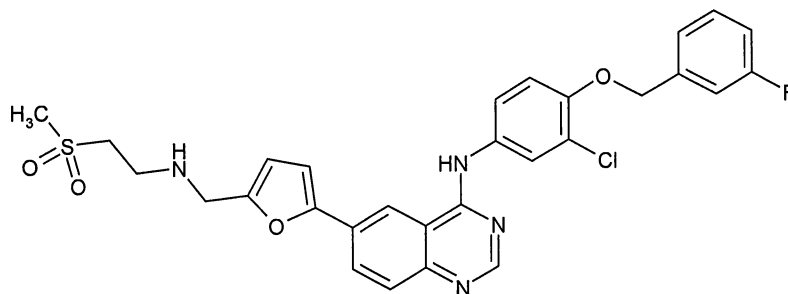
Cetuximab (ERBITUX®) là kháng thể khảm giữa chuột và người mà ức chế thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR).

Chất ức chế mTOR bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, rapamycin (FK506) và rapalog, RAD001 hoặc everolimus (Afinitor), CCI-779 hoặc temsirolimus, AP23573, AZD8055, WYE-354, WYE-600, WYE-687 và Pp121,

Bexaroten được bán dưới tên Targretin® và là thành viên nhóm phụ của retinoit mà hoạt hóa chọn lọc thụ thể retinoit X (RXR). Các thụ thể retinoit này có hoạt tính sinh học khác so với hoạt tính của thụ thể axit retinoic (RAR). Tên gọi hóa học là axit 4-[1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,8,8-pentamethyl-2-naphthalenyl) ethenyl] benzoic. Bexaroten được sử dụng để điều trị u lympho tế bào T da CTCL, loại ung thư da) từ người mà bệnh không thể điều trị được bằng ít nhất một thuốc khác.

Sorafenib được bán dưới tên Nexavar® trong nhóm thuốc còn gọi là thuốc ức chế multikinaza. Tên gọi hóa học của nó là 4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino] phenoxy]-N-methyl-pyridin-2-carboxamid. Sorafenib được sử dụng để điều trị ung thư biểu mô thận tiến triển (loại ung thư mà bắt đầu từ thận). Sorafenib còn được sử dụng để điều trị ung thư biểu mô tế bào gan không cắt bỏ (loại gan ung thư mà không thể điều trị được bằng phẫu thuật).

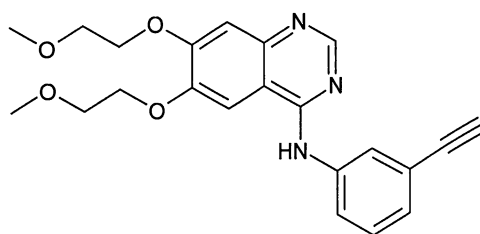
Ví dụ về chất ức chế erbB bao gồm lapatinib, erlotinib, và gefitinib. Lapatinib, *N*-(3-chloro-4-{[(3-fluorophenyl)methyl]oxy}phenyl)-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furanyl]-4-quinazolinamin (có công thức II, như được thể hiện dưới đây), là chất ức chế kép phân tử không nhỏ, dùng theo đường miệng, hiệu quả của erbB-1 và erbB-2 (EGFR và HER2) tyrosin kinaza mà được phê duyệt kết hợp với capecitabin để điều trị ung thư vú di căn dương tính với HER2.



II

Bazơ tự do, muối HCl, và muối ditosylat của hợp chất có công thức (II) có thể được điều chế theo quy trình được mô tả trong WO 99/35146, được công bố vào 15/07/1999; và WO 02/02552 được công bố vào 10/01/2002.

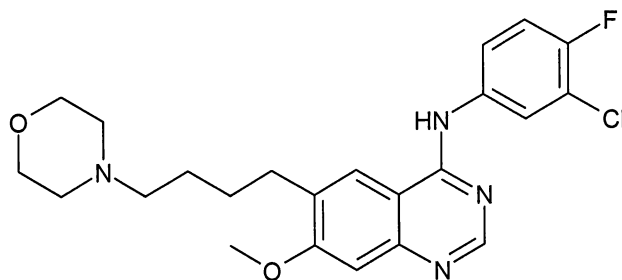
Erlotinib, *N*-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis{[2-(methoxy)ethyl]oxy}-4-quinazolinamin có bán sẵn trên thị trường dưới tên thương mại Tarceva có công thức III, như được thể hiện dưới đây:



III

Bazơ tự do và muối HCl của erlotinib có thể được điều chế, ví dụ, theo patent Mỹ số US 5,747,498, Ví dụ 20.

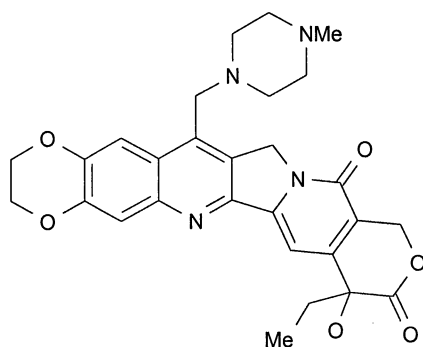
Gefitinib, 4-quinazolinamin, *N*-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-[3-(4-morpholin)propoxy] có công thức IV, như được thể hiện dưới đây:



IV

Gefitinib, mà có bán sẵn trên thị trường dưới tên thương mại IRESSA® (Astra-Zenenca) là chất ức chế erbB-1 mà được chỉ định làm liệu pháp đơn trị để điều trị cho bệnh nhân bị ung thư phổi tế bào không nhỏ tiến triển cục bộ hoặc di căn sau khi không thành công với cả liệu pháp hóa trị trên cơ sở platin và docetaxel. Bazo tự do, muối HCl, và muối diHCl của gefitinib có thể được điều chế theo quy trình của đơn quốc tế số PCT/GB96/00961, nộp ngày 23/04/1996, và được công bố với số công bố WO 96/33980 vào 31/10/1996.

Ngoài ra, dẫn xuất camptothecin có công thức sau, hiện đang được phát triển, bao gồm hỗn hợp raxemic dạng (R,S) cũng như chất đồng phân đối ảnh R và S:



A

với tên gọi hóa học “7-(4-metylpiperazino-metylen)-10,11-etylendioxy-20(R,S)-camptothecin (hỗn hợp raxemic) hoặc “7-(4-metylpiperazino-metylen)-10,11-etylendioxy-20(R)-camptothecin (chất đồng phân đối ảnh R) hoặc “7-(4-metylpiperazino-metylen)-10,11-etylendioxy-20(S)-camptothecin (chất đồng phân đối ảnh S). Hợp chất này cũng như hợp chất có liên quan được mô tả, kể cả phương pháp điều chế, trong patent Mỹ số US 6,063,923; 5,342,947; 5,559,235; 5,491,237 và đơn Mỹ số US 08/977,217 nộp ngày 24/11/1997.

Hormon và chất tương tự hormon là hữu dụng làm hợp chất để điều trị ung thư trong đó có mối quan hệ giữa (các) hormon và sự phát triển và/hoặc không có sự phát triển của ung thư. Ví dụ về hormon và chất tương tự hormon hữu dụng trong việc điều trị ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, adrenocorticosteroit như prednison và prednisolon mà hữu dụng trong việc điều trị u lympho ác tính và bệnh bạch cầu cấp tính ở trẻ em ; aminoglutethimid và chất ức chế aromataza khác như anastrozol, letrozol, vorazol, và exemestan hữu dụng trong việc điều trị ung thư biểu mô vú tuyến thượng thận - thận và ung thư biểu mô vú phụ thuộc hormon bao gồm thụ thể estrogen; progestrin như megestrol axetat hữu dụng trong việc điều trị ung thư vú phụ thuộc hormon và ung thư biểu mô niêm mạc tử cung; estrogen, androgen, và kháng androgen như flutamid, nilutamid, bicalutamid, cyproteron axetat và 5α -reductaza như finasterid và dutasterid, hữu dụng trong việc điều trị ung thư biểu mô tuyến tiền liệt và chứng phì đại tuyến tiền liệt lành tính; kháng estrogen như tamoxifen, toremifen, raloxifen, droloxifen, idoxifen, cũng như chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM) mà được mô tả trong patent Mỹ số US 5,681,835, 5,877,219, và 6,207,716, hữu dụng trong việc điều trị ung thư biểu mô vú phụ thuộc hormon và ung thư nhầy khác; và hormon giải phóng gonadotropin(GnRH) và chất tương tự của nó mà kích thích sự giải phóng hormon nội tiết tố kích thích thể vàng (LH) và/hoặc hormon kích thích nang trứng (FSH) để điều trị tuyến tiền liệt ung thư biểu mô, ví dụ, chất chủ vận LHRH và chất đối kháng như goserelin axetat và luproliđ.

Chất ức chế con đường truyền tín hiệu là chất ức chế, mà phong bế hoặc ức chế quá trình hóa học mà tạo ra sự thay đổi nội bào. Trong bản mô tả này, sự thay đổi này là sự tăng sinh tế bào hoặc sự biệt hóa. Chất ức chế truyền tín hiệu hữu dụng theo sáng chế bao gồm chất ức chế thụ thể tyrosin kinaza, tyrosin kinaza không thụ thể, chất phong bế vùng SH2/SH3, serin/threonin kinaza, phosphatidyl inositol-3 kinaza, truyền tín hiệu myo-inositol, và gen đột biến gây bệnh ung thư Ra.

Một số protein tyrosin kinaza xúc tác cho quá trình phosphoryl hóa của gốc tyrosyl cụ thể trong các protein có liên quan trong quá trình điều hòa sự phát triển của tế bào. Protein tyrosin kinaza này nói chung có thể được phân loại là kinaza thụ thể hoặc không thụ thể.

Thụ thể tyrosin kinaza là protein xuyên màng có vùng liên kết phối tử ngoại bào, vùng xuyên màng, và vùng tyrosin kinaza. Thụ thể tyrosin kinaza có liên quan đến sự điều

hòa phát triển của tế bào và thường được gọi là thụ thể yếu tố phát triển. Sự hoạt hóa không thích hợp hoặc không được kiểm soát các kinaza này, cụ thể là hoạt hóa thụ thể yếu tố phát triển kinaza bất thường, ví dụ bằng sự biểu hiện quá mức hoặc đột biến, được xác định là tạo ra sự phát triển không được kiểm soát của tế bào. Do đó, hoạt tính bất thường của kinaza có liên quan đến sự phát triển mô ác tính. Do đó, chất ức chế kinaza có thể tạo ra phương pháp điều trị ung thư. Thụ thể yếu tố phát triển bao gồm, ví dụ, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFr), thụ thể yếu tố phát triển được tạo ra từ tiểu huyết cầu (PDGFr), erbB2, erbB4, thụ thể yếu tố phát triển mạch nội mô (VEGFr), tyrosin kinaza với vùng giống globulin miễn dịch và vùng tương đồng yếu tố phát triển biểu bì (TIE-2), thụ thể yếu tố tăng trưởng insulin I (IGFI), yếu tố kích thích đại thực bào ruột kết (Cfms), BTK, ckit, cmet, thụ thể yếu tố phát triển nguyên bào sợi (FGF), thụ thể Trk (TrkA, TrkB, và TrkC), thụ thể ephrin (eph), và gen đột biến tiền ung thư RET. Một số chất ức chế thụ thể phát triển đang được phát triển và bao gồm chất đối kháng phối tử, kháng thể, chất ức chế tyrosin kinaza và oligonucleotit đối nghĩa. Thụ thể yếu tố phát triển và chất mà ức chế chức năng thụ thể yếu tố phát triển được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, No. 2 February 1997; và Loftis, F. J. Et al, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London.

Tyrosin kinaza, mà không phải là thụ thể yếu tố phát triển kinaza được gọi là tyrosin kinaza không thụ thể. Tyrosin kinaza không thụ thể hữu dụng theo sáng chế, mà là đích hoặc hướng đích của thuốc chống ung thư, bao gồm cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (kinaza bám dính tập trung), Bruton tyrosin kinaza, và Bcr-Abl. Kinaza không thụ thể và chất mà ức chế chức năng tyrosin kinaza không thụ thể được mô tả trong Sinh, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465 – 80; và Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404.

Chất phong bế vùng SH2/SH3 là chất mà làm hỏng vùng SH2 hoặc SH3 liên kết với các enzym hoặc protein thích ứng bao gồm, tiểu đơn vị PI3-K p85, kinaza họ Src, phân tử thích ứng (Shc, Crk, Nck, Grb2) và Ra-GAP. Vùng SH2/SH3 là đích đối với hoạt chất kháng ung thư được mô tả trong Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32.

Chất ức chế serin/threonin kinaza bao gồm chất phong bế chuỗi MAP kinaza mà bao gồm chất phong bế Raf kinaza (rafk), Mitogen hoặc kinaza được điều hòa ngoại bào

(MEK), và kinaza được điều hòa ngoại bào (ERK); và chất phong bế thành viên họ protein kinaza C bao gồm chất phong bế PKC (alpha, beta, gamma, epsilon, mu, lambda, iota, zeta). Họ I κ B kinaza (IKK α , IKK β), họ PKB kinaza, thành viên họ AKT kinaza, và kinaza thụ thể TGF beta. Serin/Threonin kinaza và chất ức chế của nó được mô tả trong Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), *Journal of Biochemistry*. 126 (5) 799-803; Brodt, P., Samani, A., và Navab, R. (2000), *Biochemical Pharmacology*, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) *Cancer Surveys*. 27:41-64; Philip, P.A., và Harris, A.L. (1995), *Cancer Treatment and Research*. 78: 3-27, Lackey, K. et al *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (10), 2000, 223-226; patent Mỹ số US 6,268,391; và Martinez-Iacaci, L., et al, *Int. J. Ung thư* (2000), 88(1), 44-52.

Chất ức chế thành viên họ Phosphatidylinositol-3 kinaza bao gồm chất phong bế PI3-kinaza, ATM, ADN-PK, và Ku còn hữu dụng theo sáng chế. Kinaza này được mô tả trong Abraham, R.T. (1996), *Current Opinion in Immunology*. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), *Oncogene* 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29 (7):935-8; và Zhong, H. et al, *Cancer res*, (2000) 60(6), 1541-1545.

Còn hữu dụng theo sáng chế là chất ức chế truyền tín hiệu myo-inositol như chất phong bế phospholipaza C và chất tương tự Myo-inositol. Chất ức chế tín hiệu này được mô tả trong tài liệu: Powis, G., and Kozikowski A., (1994 *New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy* ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London.

Nhóm khác của chất ức chế con đường truyền tín hiệu là chất ức chế gen đột biến gây bệnh ung thư Ra. Chất ức chế này bao gồm chất ức chế farnesyltransferaza, geranyl-geranyl transferaza, và CAAX proteaza cũng như oligonucleotit đối nghĩa, ribozym và liệu pháp trị liệu miễn dịch. Chất ức chế này được thể hiện là phong bế sự hoạt hóa Ras trong tế bào bao gồm Ras đột biến thể đại, nhờ đó hoạt động như chất chống tăng sinh. Sự ức chế gen đột biến gây bệnh ung thư Ras được mô tả trong Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), *Journal of Biomedical Science*. 7(4 292-8; Ashby, M.N. (1998), *Current Opinion in Lipidology*. 9 (2) 99 – 102; và Bennett, C.F. and Cowser, L.M. *Biochim. Biophys. Acta*, (1999) 1489(1):19-30.

Như được mô tả trên đây, chất đối kháng thể kháng đối với liên kết phối tử kinaza thụ thể còn có thể có tác dụng làm chất ức chế truyền tín hiệu. Nhóm chất ức chế con đường

truyền tín hiệu này bao gồm việc sử dụng kháng thể được nhân hóa cho vùng liên kết phối tử ngoại bào của thụ thể tyrosin kinaza. Ví dụ kháng thể đặc hiệu Imclone C225 EGFR (xem, Green, M.C. et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4, 269-286); Herceptin® erbB2 antibody (xem, Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183); và 2CB VEGFR2 specific antibody (xem, Brekken, R.A. et al, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124.

Chất ức chế tạo mạch kinaza không thụ thể cũng có thể hữu dụng theo sáng chế. Chất ức chế VEGFR và TIE2 liên quan đến sự tạo mạch được mô tả trên đây đối với chất ức chế truyền tín hiệu (cả hai thụ thể đều là thụ thể tyrosin kinaza). Nói chung, sự tạo mạch có liên quan đến việc truyền tín hiệu erbB2/EGFR vì chất ức chế erbB2 và EGFR ức chế sự tạo mạch, chủ yếu là sự biểu hiện VEGF. Do đó, được phẩm kết hợp của các chất ức chế erbB2/EGFR với chất ức chế tạo mạch là hữu ích. Do đó, chất ức chế tyrosin kinaza không thụ thể có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế EGFR/erbB2 theo sáng chế. Ví dụ, kháng thể kháng VEGF, mà không nhận diện VEGFR (thụ thể tyrosin kinaza), nhưng liên kết với phối tử; chất ức chế phân tử nhỏ của integrin ($\alpha_v\beta_3$) mà ức chế sự tạo mạch; endostatin và angiostatin (không RTK) còn có thể hữu dụng kết hợp với họ chất ức chế erb được mô tả. (xem, Bruns CJ et al (2000), Cancer Res., 60: 2926-2935; Schreiber AB, Winkler ME, và Derynck R. (1986), Science, 232: 1250-1253; Yen L et al. (2000), Oncogene 19: 3460-3469).

Chất được sử dụng trong chế độ miễn dịch trị liệu còn có thể hữu dụng khi kết hợp với hợp chất có công thức (I). Có nhiều phương pháp tạo miễn dịch để tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với erbB2 hoặc EGFR. Nói chung, các phương pháp này là trong lĩnh vực tạo chủng ngừa khối u. Hiệu quả của phương pháp tạo miễn dịch thường có thể được gia tăng bằng cách ức chế kết hợp con đường truyền tín hiệu erbB2/EGFR sử dụng chất ức chế phân tử nhỏ. Phần bản luận về phương pháp tạo miễn dịch/tạo chủng ngừa khối u đối với erbB2/EGFR có trong tài liệu Reilly RT et al. (2000), Cancer Res. 60: 3569-3576; và Chen Y, Hu D, Eling DJ, Robbin J, và Kipps TJ. (1998), Cancer Res. 58: 1965-1971,

Chất được sử dụng trong chế độ gây chết tế bào theo chương trình (ví dụ, oligonucleotit đối nghĩa bcl-2) còn có thể được sử dụng kết hợp theo sáng chế. Thành viên của họ protein Bcl-2 ức chế quá trình gây chết tế bào theo chương trình. Do đó, việc điều

hòa tăng bcl-2 liên quan đến sự kháng hóa chất. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng yếu tố phát triển biểu bì (EGF) kích thích thành viên của họ Bcl-2 (cụ thể là mcl-1) chống lại quá trình chế tế bào theo chương trình. Do đó, phương pháp được dùng để điều hòa giảm sự biểu hiện của bcl-2 trong khối u đã thể hiện các lợi ích lâm sàng và hiện nay là trong các thử nghiệm pha II/III, cụ thể là oligonucleotit đối nghĩa bcl-2 G3139 của Genta. Phương pháp gây chết tế bào theo chương trình bằng cách sử dụng oligonucleotit đối nghĩa đối với bcl-2 được mô tả trong Water JS et al. (2000), J. Clin. Oncol. 18: 1812-1823; và Kitada S et al. (1994, Antisense Res. Dev. 4: 71-79).

Tratuzumab (HEREPTIN®) là kháng thể đơn dòng được nhân hóa mà liên kết với thụ thể HER2. Chỉ định chính của nó là ung thư vú dương tính với HER2.

Tratuzumab emtansin (tên thương mại Kadcyla) là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc bao gồm kháng thể đơn dòng tratuzumab (Herceptin) được liên kết với chất gây độc tế bào mertansin (DM1). Tratuzumab ở dạng riêng rẽ làm dừng sự phát triển của tế bào ung thư bằng cách liên kết với thụ thể HER2/neu, ngược lại mertansin đi vào tế bào và phá hủy chúng bằng cách liên kết với tubulin. Vì kháng thể đơn dòng hướng đích HER2, và HER2 chỉ được biểu hiện quá mức trong tế bào ung thư, thể tiếp hợp chuyển độc tố đặc hiệu vào tế bào khối u. Thể tiếp hợp này còn được gọi là T-DM1.

Cetuximab (ERBITUX®) là kháng thể khảm giữa chuột và người mà ức chế thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR).

Pertuzumab (còn gọi là 2C4, tên thương mại Omnitarg) là kháng thể đơn dòng. Nhóm thứ nhất của nó là các chất được gọi là "chất ức chế dime hóa HER". Bằng cách liên kết với HER2, nó ức chế sự dime hóa của HER2 với thụ thể HER khác, mà được cho là làm chậm phát triển khối u. Pertuzumab được mô tả trong WO01/00245 được công bố vào ngày 01/04/2001.

Rituximab là kháng thể khảm đơn dòng mà được bán dưới tên RITUXAN® và mAbTHERA®. Rituximab liên kết với CD20 trên tế bào B và gây ra quá trình chết tế bào theo chương trình. Rituximab được sử dụng trong tĩnh mạch và được phê duyệt để điều trị bệnh thấp khớp và u lympho không Hodgkin tế bào B.

Ofatumumab là kháng thể đơn dòng hoàn toàn từ người mà được bán dưới tên ARZERRA®. Ofatumumab liên kết với CD20 trên tế bào B và được sử dụng để điều trị

bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL; loại ung thư tế bào máu trắng) từ người trưởng thành mà kháng điều trị bằng fludarabin (Fludara) và alemtuzumab (Campath).

Chất ức chế truyền tín hiệu chu trình tế bào ức chế phân tử tham gia vào việc kiểm soát chu trình tế bào. Họ các protein kinaza được gọi là kinaza phụ thuộc cyclin (CDK) và tương tác của chúng với họ các protein được gọi là cyclin kiểm soát tiến trình thông qua chu trình tế bào nhân thực. Sự hoạt hóa phối trí và sự bất hóa các phức hợp cyclin/CDK khác nhau là cần thiết cho tiến trình bình thường thông qua chu trình tế bào. Một số chất ức chế truyền tín hiệu chu trình tế bào đang được phát triển. Ví dụ về kinaza phụ thuộc cyclin, bao gồm CDK2, CDK4, và CDK6 và chất ức chế truyền tín hiệu chu trình tế bào được mô tả trong, ví dụ, Rosania et al, *Exp. Opin. Ther. Patents* (2000) 10(2):215-230,

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất điều biến miễn dịch” đề cập đến chất bất kỳ bao gồm kháng thể đơn dòng mà tác dụng đến hệ miễn dịch. Protein liên kết ICOS theo sáng chế có thể được xem là chất điều biến miễn dịch. Chất điều biến miễn dịch có thể được sử dụng làm chất chống ung thư để điều trị bệnh ung thư. Ví dụ, chất điều biến miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể kháng CTLA-4 như ipilimumab (YERVOY) và kháng thể kháng PD-1 (Opdivo/nivolumab và Keytruda/pembrolizumab). Chất điều biến miễn dịch khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể OX-40, kháng thể PD-L1, kháng thể LAG3, kháng thể TIM-3, kháng thể 41BB và kháng thể GITR.

Yervoy (ipilimumab) là kháng thể CTLA-4 hoàn toàn từ người được bán bởi Bristol Myers Squibb. Protein cấu trúc của ipilimumab và phương pháp sử dụng được mô tả trong patent Mỹ số US 6,984,720 và 7,605,238.

Opdivo/nivolumab là kháng thể đơn dòng hoàn toàn từ người được bán bởi Bristol Myers Squibb trực tiếp chống lại thụ thể bề mặt tế bào người điều hòa miễn dịch âm PD-1 (sự chết tế bào theo chương trình 1 hoặc sự chết tế bào theo chương trình 1/PCD-1) với hoạt tính tăng hiệu quả miễn dịch. Nivolumab liên kết với và phong bế sự hoạt hóa PD-1, protein xuyên màng siêu họ Ig, bằng phối tử PD-L1 và PD-L2 của nó, dẫn đến sự hoạt hóa tế bào T và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào chống lại tế bào khối u hoặc tác nhân gây bệnh. PD-1 đã được hoạt hóa điều hòa âm sự hoạt hóa tế bào T và chức năng hiệu lực thông qua việc ức chế sự hoạt hóa con đường P13k/Akt. Tên gọi khác của nivolumab bao

gồm: BMS-936558, MDX-1106, và ONO-4538. Trình tự axit amin của nivolumab và phương pháp sử dụng và sản xuất được mô tả trong patent Mỹ số US 8,008,449.

KEYTRUDA/pembrolizumab là kháng thể kháng PD-1 được bán để điều trị ung thư phổi bởi Merck. Trình tự axit amin của pembrolizumab và phương pháp sử dụng được mô tả trong Patent Mỹ số US 8,168,757.

CD134, còn được gọi là OX40, là thành viên của siêu họ của TNFR của các thụ thể mà không được biểu hiện chủ yếu trên tế bào T bất sinh nghi, không giống với CD28. OX40 là phân tử đồng kích thích thứ cấp, được biểu hiện sau 24 đến 72 giờ sau khi hoạt hóa; phối tử của nó, OX40L, cũng không được biểu hiện trên tế bào trình diện kháng nguyên nghi, nhưng được biểu hiện sau khi sự hoạt hóa của chúng. Sự biểu hiện của OX40 phụ thuộc vào sự hoạt hóa hoàn toàn tế bào T; mà không phải CD28, sự biểu hiện của OX40 bị trì hoãn và có mức thấp hơn 4 lần. Kháng thể OX-40, protein dung hợp OX-40 và phương pháp sử dụng chúng được mô tả trong patent Mỹ số: US 7,504,101; US 7,758,852; US 7,858,765; US 7,550,140; US 7,960,515; WO2012027328; WO2013028231.

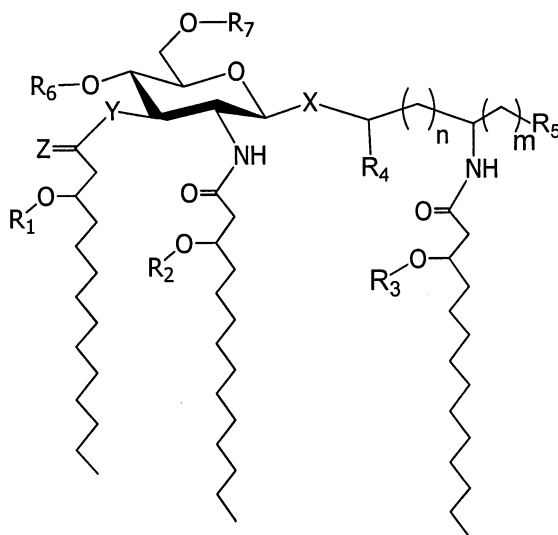
Kháng thể đối với PD-L1 (còn được gọi là CD274 hoặc B7-H1) và phương pháp sử dụng được mô tả trong patent Mỹ số US 7,943,743; patent Mỹ số US 8,383,796; US20130034559, WO2014055897, patent Mỹ số US 8,168,179; và patent Mỹ số US 7,595,048. Kháng thể PD-L1 đang được phát triển làm chất điều biến miễn dịch để điều trị ung thư.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất kích thích miễn dịch” đề cập đến chất bất kỳ mà có thể kích thích hệ miễn dịch. Trong bản mô tả này chất kích thích miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tá dược vaccin.

Aminoalkyl glucosaminid phosphat (AGP) đã biết là hữu dụng làm tá dược vaccin và chất kích thích miễn dịch để kích thích sự sản sinh xytokin, hoạt hóa đại thực bào, thúc đẩy đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, và gia tăng mức sản sinh kháng thể ở động vật được tạo miễn dịch. Aminoalkyl glucosaminid phosphat (AGP) là phối tử tổng hợp của thụ thể giống Toll 4 (TLR4). AGP và tác dụng điều hòa miễn dịch của chúng thông qua TLR4 được mô tả trong các công bố như WO 2006/016997, WO 2001/090129, và/hoặc patent Mỹ số US 6,113,918 và được mô tả trong các tài liệu chuyên ngành. Dẫn xuất AGP khác được mô tả trong patent Mỹ số US 7,129,219, patent Mỹ số US 6,525,028 và patent Mỹ số US

6,911,434. Một số AGP có tác dụng như là chất chủ vận của TLR4, trong khi đó số khác được xác định là chất đối kháng TLR4.

Hợp chất aminoalkyl glucosaminid phosphat được sử dụng theo sáng chế có cấu trúc được thể hiện trong công thức 1 sau đây:



(Công thức 1)

trong đó

m là 0 đến 6

n là 0 đến 4;

X là O hoặc S, tốt hơn là O;

Y là O hoặc NH;

Z là O hoặc H;

mỗi R₁, R₂, R₃ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm C₁₋₂₀ axyl và C₁₋₂₀ alkyl;

R₄ là H hoặc Me;

R₅ độc lập được chọn từ nhóm bao gồm -H, -OH, -(C₁₋₄) alkoxy, -PO₃R₈R₉, -OPO₃R₈R₉, -SO₃R₈, -OSO₃R₈, -NR₈R₉, -SR₈, -CN, -NO₂, -CHO, -CO₂R₈, và -CONR₈R₉, trong đó R₈ và R₉ độc lập với nhau được chọn từ H và (C₁₋₄) alkyl; và mỗi R₆ và R₇ độc lập là H hoặc PO₃H₂.

Trong công thức 1, cấu hình của trung tâm lập thể 3' trong đó gốc axyl béo mạch thẳng (cụ thể là, gốc axyloxy hoặc alkoxy bậc hai, ví dụ, R₁O, R₂O, và R₃O) được gắn vào là ở dạng R hoặc S, tốt hơn là R (như được ký hiệu theo Quy tắc ưu tiên tuyệt đối Cahn-Ingold-Prelog). Cấu hình của trung tâm lập thể aglycon trong đó R₄ và R₅ được gắn vào có thể là ở dạng R hoặc S. Tất cả các chất đồng phân lập thể, cả chất đồng phân đối ảnh và

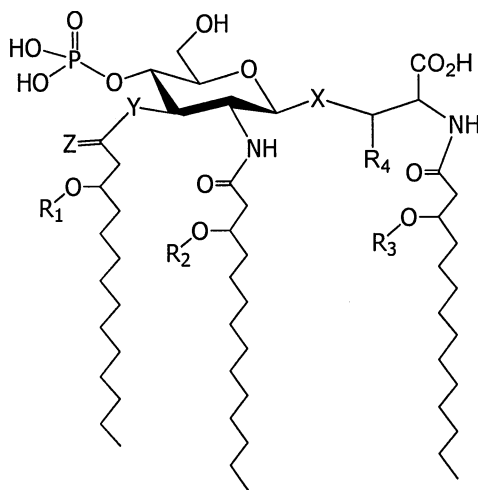
chất đồng phân không đối quang, và hỗn hợp của chúng, được xem là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Số lượng các nguyên tử cacbon giữa nguyên tử khác loại X và nguyên tử nitơ aglycon được xác định bằng biến “n”, mà có thể là số nguyên từ 0 đến 4, tốt hơn là số nguyên từ 0 đến 2.

Chiều dài chuỗi axit béo mạch thẳng R_1 , R_2 , và R_3 có thể từ khoảng 6 đến khoảng 16 cacbon, tốt hơn là từ khoảng 9 đến khoảng 14 cacbon. Chiều dài chuỗi có thể giống hoặc khác nhau. Một số phương án được ưu tiên bao gồm chiều dài chuỗi trong đó R_1 , R_2 và R_3 là 6 hoặc 10 hoặc 12 hoặc 14.

Công thức 1 bao gồm các L/D-seryl, -threonyl, -xysteiny l ete và lipit este AGP, bao gồm cả chất chủ vận và chất đối kháng và chất đồng đẳng của chúng ($n=1-4$), cũng như các chất đẳng cấu sinh học của axit carboxylic (cụ thể là, R_5 là nhóm axit có thể tạo muối; phosphat có thể ở vị trí 4 hoặc 6 của đơn vị glucosamin, nhưng tốt hơn là ở vị trí 4).

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến hợp chất AGP có công thức 1, n là 0, R_5 là CO_2H , R_6 là PO_3H_2 , và R_7 là H. Hợp chất AGP được ưu tiên này được có công thức 1a sau đây:



(Công thức 1a)

trong đó X là O hoặc S; Y là O hoặc NH; Z là O hoặc H; mỗi R_1 , R_2 , R_3 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm C_{1-20} axyl và C_{1-20} alkyl; và R_4 là H hoặc metyl.

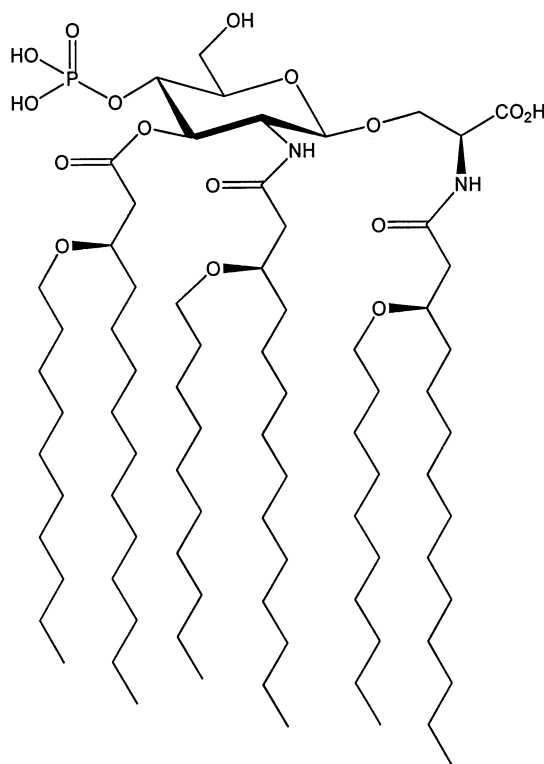
Trong công thức 1a, cấu hình của trung tâm lập thể 3' trong đó gốc axyl béo mạch thẳng (cụ thể là, gốc axyloxy hoặc alkoxy bậc hai, ví dụ, $R_1\text{O}$, $R_2\text{O}$, và $R_3\text{O}$) được gắn vào là ở dạng R hoặc S, tốt hơn là R (như được ký hiệu bởi quy tắc ưu tiên tuyệt đối Cahn-

Ingold-Prelog). Cấu hình của trung tâm lập thể aglycon trong đó R_4 và CO_2H được gắn vào có thể là ở dạng R hoặc S. Tất cả các chất đồng phân lập thể, cả chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang, và hỗn hợp của chúng, được xem là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Công thức 1a bao gồm các L/D-seryl, -threonyl, -xysteinyl ete hoặc lipit este AGP, bao gồm cả chất chủ vận và chất đối kháng.

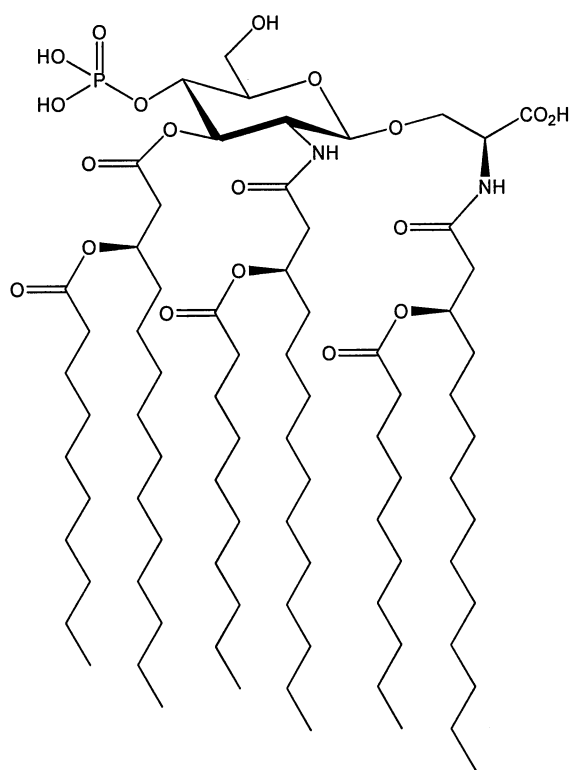
Trong cả công thức 1 và công thức 1a, Z là O được gắn bằng liên kết đôi hoặc hai nguyên tử hydro mà mỗi nguyên tử được gắn bằng liên kết đơn. Tức là, hợp chất này có liên kết este nếu $Z=Y=O$; có liên kết amit nếu $Z = O$ và $Y = NH$; và có liên kết ete nếu $Z=H/H$ và $Y=O$.

Hợp chất có công thức 1 được đặc biệt ưu tiên được gọi là CRX-601 và CRX-527. Chúng có cấu trúc được thể hiện dưới đây:



(CRX-601)

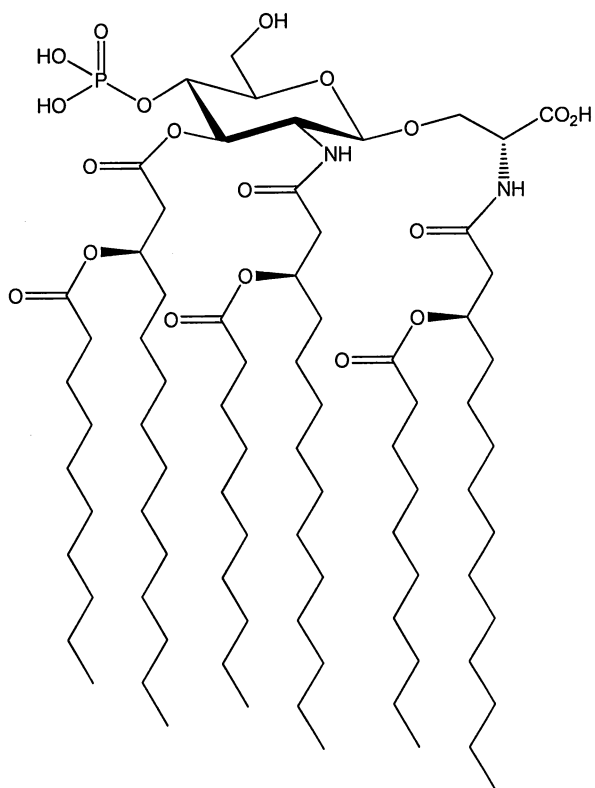
31708



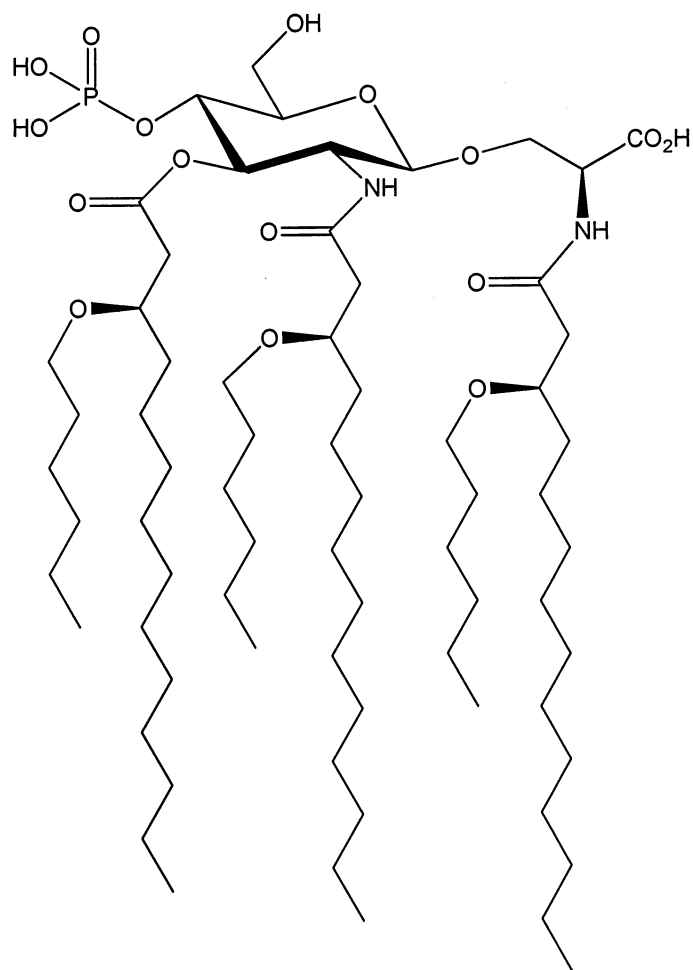
(CRX-527)

Ngoài ra, theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến hợp chất CRX 547 có cấu trúc được thể hiện dưới đây.

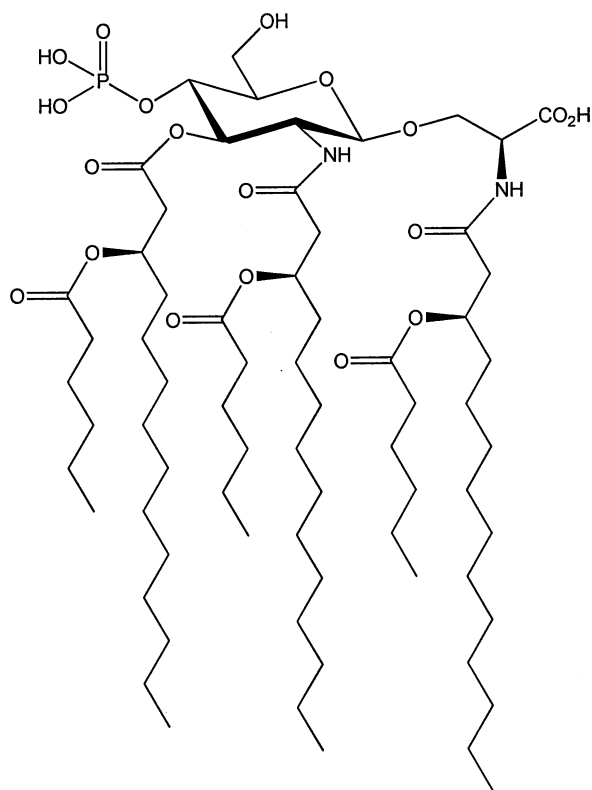
CRX 547



Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến AGP như CRX 602 hoặc CRX 526 có độ ổn định được cải thiện đối với AGP có mạch alkyl hoặc axyl bậc hai ngắn hơn.



CRX 602



CRX-526

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị ung thư ở động vật có vú cần điều trị, mà bao gồm bước: sử dụng cho động vật có vú này lượng hữu hiệu trị liệu của:

protein liên kết ICOS theo sáng chế,

và b) ít nhất một chất chống ung thư.

Theo một phương án sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị ung thư ở động vật có vú cần điều trị, mà bao gồm bước: sử dụng cho động vật có vú này lượng hữu hiệu trị liệu của:

protein liên kết ICOS theo sáng chế,

và b) ít nhất một chất điều biến miễn dịch thứ hai chất.

Theo một phương án, chất điều biến miễn dịch thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm: kháng thể kháng CTLA4, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng OX40, kháng thể kháng GITR, và kháng thể kháng 41BB, kháng thể kháng LAG3 và kháng thể kháng TIM3.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị ung thư ở động vật có vú cần điều trị, mà bao gồm bước: sử dụng cho động vật có vú này lượng hữu hiệu trị liệu của:

protein liên kết ICOS theo sáng chế,

và b) ít nhất một chất kích thích miễn dịch.

Theo một phương án, chất kích thích miễn dịch là chất chủ vận TLR4. Theo một phương án, chất kích thích miễn dịch là AGP. Theo một khía cạnh, chất kích thích miễn dịch là hợp chất có công thức I. Theo một khía cạnh, nó là hợp chất có công thức 1a. Theo một khía cạnh, chất kích thích miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm: CRX-601, CRX-547, CRX-602, CRX-527, và CRX-526,

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, các khía cạnh của sáng chế sẽ được minh họa một cách cụ thể hơn thông qua các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Sự biểu hiện ICOS ở bệnh ung thư

Nói chung, khối u rắn được cho là có mức tế bào T ICOS⁺ xâm nhập thấp, phù hợp với lý thuyết rằng đáp ứng miễn dịch chống khối u qua trung gian ICOS. Các phân tích sự biểu hiện ICOS thông qua nghiên cứu mô các khối u được thực hiện bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu biểu hiện mARN công khai từ Bản đồ hệ gen ung thư (The Cancer Genome Atlas - TCGA) và các cơ sở dữ liệu khác.

Bảng 3. Sự biểu hiện mARN của ICOS ở các loại khối u khác nhau thể hiện phần trăm tương đối của khối u từ mỗi nghiên cứu mô mà thể hiện mức biểu hiện mARN của ICOS có thể phát hiện nào đó. Phân tích này xác định rằng các nghiên cứu mô khối u được biết là nhạy đối với các phương pháp trị liệu miễn dịch ung thư khác (khối u ác tính, RCC, NSCLC) vì có phần trăm khối u mà có tế bào bạch huyết xâm nhập khối u ICOS⁺ (TIL) có thể phát hiện tương đối cao (>10%), trong khi các loại khối u được biết là tạo miễn dịch kém (tuyến tiền liệt, buồng trứng, và tuyến tụy) lại có phần trăm khối u mà có TIL ICOS⁺ tương đối thấp (<10%) (

Bảng 3. Sự biểu hiện mARN của ICOS ở các loại khối u khác nhau). Đáng chú ý là, các loại khối u đã biết là liên quan đến bệnh nhiễm virus và/hoặc viêm mạn tính (Đầu và cổ, dạ dày, thực quản, và cổ) là thuộc loại khối u thể hiện phần trăm TIL ICOS⁺ cao nhất.

Điều không rõ ràng từ các phân tích sự biểu hiện mARN này là tiểu quần thể TIL mà biểu hiện ICOS trong mỗi loại khối u tương ứng. Trong một số trường hợp, ICOS có thể được biểu hiện chủ yếu trên T_{regs} xâm nhập khối u, trong khi

đó ở các dạng khác nó có thể chỉ báo mức thâm nhiễm tế bào hiệu lực T ICOS+.

Bảng 3. Sự biểu hiện mARN của ICOS ở các loại khối u khác nhau

Loại khối u	Total N	ICOS +(N)	ICOS+(Per.)
Đầu và cổ	426	157	36,9%
Dạ dày	285	75	26,3%
Thực quản	70	17	24,3%
Khối u ác tính (M)	295	69	23,4%
Ung thư phổi không tế bào nhỏ (AD)	501	112	22,4%
Ung thư phổi không tế bào nhỏ (ung thư biểu mô tế bào vảy - SCC)	489	85	17,4%
Cổ	185	32	17,3%
Vú	1048	162	15,5%
Bàng quang	244	35	14,3%
Ung thư tế bào thận	522	64	12,3%
Khối u ác tính (P)	82	7	8,5%
Tụy	85	7	8,2%
Đại tràng	446	34	7,6%
Tuyến giáp	498	34	6,8%
Ung thư biểu mô tế bào gan	191	11	5,8%
Sarcoma	103	4	3,9%
Buồng trứng	412	13	3,2%
Tuyến tiền liệt	336	10	3,0%
Nội mạc tử cung	532	15	2,8%
Trực tràng	163	4	2,5%
U nguyên bào thần kinh đệm	156	0	0,0%

Phân tích sự biểu hiện ICOS bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch (IHC) trong ung thư biểu mô tế bào phổi không nhỏ nguyên phát từ người (NSCLC), ung thư vú bộ ba âm tính (TNBC), ung thư đại trực tràng (CRC), tuyến tiền liệt, tuyến tụy, buồng trứng, ung thư tế bào thận (RCC) và khối u ác tính được thực hiện để hiểu rõ hơn về các nhóm phụ của TIL liên quan đến sự biểu hiện ICOS trong các loại khối u khác nhau (Bảng 4). Tương tự với những gì quan sát được trong phân tích sự biểu hiện mARN, mức TIL ICOS+ dư là

tương đối thấp, ngay cả trong các khối u riêng rẽ trong đó lẽ ra có mặt lượng lớn CD4⁺, CD8⁺ và/hoặc FoxP3⁺ TIL. Ngoài ra, nghiên cứu mô khối u ác tính, ung thư biểu mô thận (RCC) và ung thư biểu mô tế bào phổi không nhỏ (NSCLC) có phần trăm khối u với mức xâm nhập ICOS⁺ phần nào có thể phát hiện cao nhất (Bảng 4, Cột 2). Ngược lại, các khối u tuyến tiền liệt, buồng trứng và tuyến tụy hầu như không có TIL ICOS⁺ (Bảng 4). Các phân tích này thể hiện một cách rõ ràng rằng khối u rắn có mức TIL ICOS⁺ cơ sở thấp và có thể có lợi từ việc mở rộng và cảm ứng chức năng của quần thể tế bào này. Các nghiên cứu khác sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng và kỹ thuật mô hóa miễn dịch màu kép để phân tích khối u nguyên phát từ người sẽ giúp xác định các nhóm phụ tế bào T đặc hiệu biểu hiện ICOS.

Bảng 4

Thể	Ví dụ số	ICOS	Số tế bào dương tính trung bình (phạm vi)				
			ICOS	CD3	CD4	CD8	FOXp3
Ung thư phổi không tế bào nhỏ (tế bào vảy)	n = 17	-	0	11 (0-74)	2 (0-9)	20 (0-147)	10 (0-28)
	n = 23	+	3 (0-25)	38 (2-143)	8 (0-26)	39 (5-188)	18 (0-75)
Ung thư phổi không tế bào nhỏ (ung thư biểu mô tuyến)	n = 15	-	0	36 (0-157)	4 (0-20)	71 (5-238)	10 (1-41)
	n = 25	+	2 (0-7)	56 (0-181)	8 (0-39)	69 (10-201)	19 (0-55)
Ung thư vú bộ ba âm tính	n = 24	-	0	14 (0-91)	9 (0-132)	17 (0-95)	6 (0-25)
	n = 11	+	5 (0-20)	85 (3-259)	13 (0-45)	113 (2-393)	30 (2-81)
Ung thư đại trực tràng	n = 22	-	0	12 (0-47)	14 (0-44)	20 (0-83)	14 (2-52)
	n = 23	+	2 (0-13)	31 (5-101)	22 (5-48)	53 (4-151)	24 (5-43)
Ung thư tiền liệt tuyến	n = 29	-	0	10 (0-78)	17 (1-96)	23 (1-176)	5 (0-25)
	n = 1	+	1	30	48	55	11
Ung thư tuyến tụy	n = 11	-	0	15 (1-32)	17 (3-71)	20 (3-81)	6 (0-21)
	n = 4	+	0 (0-1)	31 (7-85)	17 (6-31)	17 (2-51)	4 (0-9)
Ung thư buồng trứng	n = 15	-	0	13 (0-105)	14 (1-78)	13 (0-83)	2 (0-12)
	n = 5	+	1 (0-3)	19 (6-35)	13 (6-19)	32 (10-76)	7 (4-13)
Ung thư tế bào thận	n = 3	-	0	50 (14-104)	58 (38-85)	56 (24-119)	4 (0-9)
	n = 7	+	5 (1-16)	45 (10-130)	85 (26-164)	71 (12-232)	15 (3-28)
Ung thư tế bào hắc tố	n = 7	-	0	42 (1-155)	12 (1-31)	35 (0-156)	5 (0-10)
	n = 12	+	7 (0-21)	84 (13-222)	32 (13-70)	89 (28-179)	19 (6-40)

Ví dụ 2: Sàng lọc chất chủ vận kháng thể ICOS

Quá trình phân lập PBMC nguyên thủy từ người

Máu tươi thu được từ người hiến máu và được pha loãng 1:1 bằng môi trường RPMI1640 10% không chứa đỏ phenol. Máu đã được pha loãng được phân lớp trên bề mặt của môi trường đặc trong ống hình nón Uni-Sep Max dung tích 50ml và ly tâm ở 400xg trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng có đáy nắp (BREAK OFF). Lớp đơn nhân màu trắng (lớp đệm) thu được được chiết một cách cẩn thận vào ống hình nón mới dung tích 50mL thông qua màng lọc tế bào loại 100 μ M. Thể tích tương đương của môi trường RPMI1640 10% không chứa đỏ phenol được bổ sung vào lớp đệm và được ly tâm ở 300xg trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hạt tế bào được tạo huyền phù lại trong 10ml dung dịch phân giải hồng cầu (Sigma Aldrich) và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tế bào được rửa một lần bằng môi trường và được ly tâm như được mô tả ở trên. Thể tích được gia tăng đến 40ml bằng môi trường RPMI1640 10% không chứa đỏ phenol và tế bào được đếm bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào Vicell và máy phân tích tỷ lệ sống sót (Beckman Coulter).

Phân lập tế bào hiệu lực T CD4+CD25- nguyên thủy từ người

Tế bào CD4+CD25- từ người được tinh chế thêm từ PBMC thông qua quy trình phân lập hai bước trên cơ sở hạt từ tính bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T điều hòa CD4+CD25+ từ người (Miltenyi Biotec). Đầu tiên, tế bào PBMC được ủ với hỗn dịch kháng thể biotin ở 4°C trong 5 phút và sau đó được ủ vi hạt kháng Biotin trong 10 phút. Bước này là để đánh dấu tế bào T không CD4+. Sau đó, tế bào được cho qua cột LD trong từ trường của thiết bị phân tách MidiMACS. Dòng ra mà là phân đoạn tế bào CD4+ được làm giàu sơ bộ không được đánh dấu được thu gom và được ủ với vi hạt CD25 ở 4°C trong 15 phút. Tế bào đã được đánh dấu được cho qua cột MS trong từ trường của thiết bị phân tách MiniMACS. Dòng ra bao gồm tế bào hiệu lực T CD4-CD25- không được đánh dấu được thu gom cho thử nghiệm hoạt hóa tiếp theo.

Phân lập tế bào T CD4+ nguyên thủy từ người một cách trực tiếp từ máu

Tế bào T CD4+ từ người được phân lập một cách trực tiếp từ máu tươi từ người bằng cách sử dụng hỗn dịch được làm giàu tế bào T CD4+ từ người (Kỹ thuật tế bào gốc). Hỗn dịch được làm giàu tế bào T CD4+ từ người RosetteSep (50 μ L/mL) được bổ sung vào máu toàn phần và giềng hỗn hợp. Sau 20 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, thể tích tương

đương chứa PBS + 2% FBS được bổ sung vào đồng thời khuấy nhẹ. Mẫu pha loãng được phân lớp trên mặt trên của môi trường đặc và được ly tâm trong 20 phút ở 1200 x g ở nhiệt độ trong phòng có đầy nắp. Tế bào được làm giàu từ môi trường đặc: mặt phân cách huyết tương được rót một cách cẩn thận vào ống hình nón mới. Tiếp theo hồng cầu được dung giải bằng dung dịch đệm hồng cầu (Sigma Aldrich) và tế bào đã được làm giàu được rửa bằng PBS + 2% FBS hai lần. Tế bào T CD4⁺ được tạo huyền phù lại trong 40ml PBS + 2% FBS và được đếm bằng thiết bị đếm tế bào Vi-Cell.

Quy trình thử nghiệm

Thử nghiệm hoạt hóa tế bào hiệu lực T CD4⁺CD25⁻ từ người in vitro – thử nghiệm gắn kết.

Các đĩa đáy bằng 96 lỗ được xử lý bằng môi trường nuôi cấy không mô được phủ dung dịch đệm phủ (Biolegend) chứa 1µg/ml kháng thể kháng CD3 từ người (eBioscience) và các kháng thể thử nghiệm với lượng 100µl/lỗ qua đêm. Vào ngày tiếp theo, các đĩa đã được phủ trước này được rửa ba lần bằng 10% FBS chứa môi trường RPMI-1640. Tế bào hiệu lực T CD4⁺CD25⁻ từ người được phân lập và được đánh dấu bằng CFSE như đã được mô tả và được cấy lên đĩa. Sau khi ủ ở 37°C trong 2,5 ngày, tế bào được thu gom và được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng để tăng sinh và biểu hiện dấu ấn hoạt hóa. Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom tiếp để xác định xytokin đa thành phần bằng hệ thống Meso Scale Discovery (MSD).

Thử nghiệm sự tăng sinh CFSE

Tế bào cần được đánh dấu được tạo huyền phù lại trong 1ml PBS đã được làm ấm trước ở nồng độ cuối đạt 1E7 tế bào/mL trong 15ml ống hình nón. Một microlit dung dịch gốc CFSE 2 mM (Life Technologies) được bổ sung một cách trực tiếp vào tế bào ngay sau đó được xoay để đảm bảo việc đánh dấu đồng đều. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, việc nhuộm màu được làm dừng lại bằng cách bổ sung 14ml môi trường nuôi cấy tế bào được làm lạnh bằng nước đá. Tế bào đã được đánh dấu được rửa ba lần bằng môi trường được làm lạnh bằng nước đá. Tế bào được đếm và được điều chỉnh đến 1E6 tế bào/ml trong RPMI1640 + 10% FBS được bổ sung 100IU/ml IL-2 (PeproTech) và được cấy lên đĩa đã được phủ kháng thể kháng CD3 và kháng thể thử nghiệm. Sau khi hoạt hóa tế bào T, tế bào được thu gom và được rửa bằng PBS+0,5% BSA một lần trước khi được tiếp tục nhuộm đa màu để phân tích đếm tế bào theo dòng.

Phương pháp đếm tế bào theo dòng đa màu

Tế bào T đã được hoạt hóa được thu gom và được rửa bằng PBS. Đầu tiên, tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm tỷ lệ sống sót tế bào LIVE/DEAD Fixable Far Red (Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi kết thúc việc nhuộm màu, kháng thể phát hiện được tiếp hợp với các màu khác nhau được ủ với các tế bào ở 4°C trong 30 phút. Tế bào đã được nhuộm được rửa một lần bằng dung dịch đệm nhuộm màu FACS được làm lạnh bằng nước đá (PBS + 0,5% BSA) trước khi được chạy trên thiết bị đếm tế bào theo dòng FACS Canto hoặc FACS Canto II. Năng suất vận hành thiết bị đếm tế bào được kiểm tra hàng ngày bằng cách sử dụng hạt Cytometer Setup & Tracking (BD Biosciences) và điện thế PMT và thang đo diện tích được thiết lập trên cơ sở tế bào không được nhuộm. Việc hiệu chỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng hạt OneComp hoặc UltraComp (eBioscience) mà được nhuộm riêng rẽ với kháng thể phát hiện được liên kết với mỗi chất huỳnh quang.

Phân tích xytokin MSD

Mức xytokin IFN- γ , IL-10, IL-2 và TNF- α trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy mô được xác định bằng cách sử dụng kit chuẩn hóa V-Plex từ người MSD. Đầu tiên, mẫu được pha loãng với tỷ lệ 1:200 trong chất pha loãng Diluent2. Mẫu hiệu chuẩn cũng được chuẩn bị theo hướng dẫn sử dụng đối với Diluent2. Mẫu đã pha loãng và mẫu hiệu chuẩn được bổ sung vào đĩa MSD màu đen mà sau đó được bịt kín bằng chất kết dính gắn kín đĩa và được ủ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời lắc trong 2 giờ. Sau khi bổ sung 25 μ L dung dịch kháng thể phát hiện mà mới được điều chế trong Diluent2 vào mỗi lỗ, đĩa lại được bịt kín và được ủ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời lắc thêm 2 giờ nữa. Đĩa được rửa 3 lần bằng PBS cộng với 0,05% Tween-20 với lượng 150 μ L/lỗ trước khi bổ sung 150 μ L/lỗ dung dịch đệm để đọc mới được pha loãng 2 lần và được đọc ngay lập tức trên thiết bị đọc MESO QuickPlex. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm MSD Workbench.

Thử nghiệm hoạt hóa tế bào T CD4⁺ từ người in vitro – gắn kết và hòa tan

Tế bào T CD4⁺ từ người mới được phân lập được kích thích trước trên các đĩa 24 lỗ được phủ kháng thể kháng CD3 (1 μ g/mL) và kháng CD28 (3 μ g/mL) trong 48 giờ. Các tế bào được lấy, được rửa và được trộn với DynaBeads kháng CD3 (Life Technologies) với tỷ lệ 1:1 trong môi trường AIM-V được bổ sung 100IU/ml IL-2 (PeproTech). Hỗn hợp tế bào/hạt sau đó cấy với lượng 100k mỗi lỗ vào đĩa đáy bằng loại 96 lỗ không được phủ

(đối với dạng hòa tan) hoặc được phủ H2L5 hIgG4PE (đối với dạng gắn kết). Đối với dạng hòa tan, H2L5 hIgG4PE được bổ sung vào các lỗ ở thời điểm cấy tế bào. Sau khi ủ ở 37°C trong 3,5 ngày, dịch nổi bề mặt chứa môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom để xác định xytokin đa thành phần bằng MSD.

Thử nghiệm hoạt hóa in vitro PBMC hòa tan từ người

PBMC từ người mới được phân lập được kích thích trước trên đĩa loại 24 lỗ được phủ kháng CD3 (1µg/mL) và kháng CD28 (5µg/mL) trong 48 giờ. Tế bào được nhuộm CFSE được điều chế và được trộn với DynaBeads kháng CD3 (Life Technologies) với tỷ lệ 1:1 trong môi trường AIM-V được bổ sung 100IU/ml IL-2 (PeproTech). Hỗn hợp tế bào/hạt sau đó được cấy với lượng 200k mỗi lỗ vào đĩa loại 96 lỗ mà đã được phủ sơ bộ 1µg/ml kháng thể kháng CD3. H2L5 hIgG4PE và kháng thể đối chứng được bổ sung một cách trực tiếp vào các lỗ ở dạng hòa tan của chúng. Sau khi ủ ở 37°C trong 3,5 ngày, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom để xác định xytokin đa thành phần bằng MSD, và tế bào được lấy để phân tích sự tăng sinh và dấu ấn biểu hiện bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Phân tích dữ liệu

Phân tích dữ liệu phương pháp đếm tế bào theo dòng

Dữ liệu dòng được phân tích bằng phần mềm FlowJo (FlowJo LLC). Đầu tiên, tế bào chết được loại bỏ trên cơ sở nhuộm màu bằng thuốc nhuộm tỷ lệ sống sót tế bào LIVE/DEAD. Các bộ đôi được loại bỏ trên đồ thị phân tán FSC-H : FSC-W. Chỉ các tế bào riêng rẽ sống sót thu được được phân tích biểu hiện chất dấu ấn hoạt hóa trong các tiểu quần thể tế bào T khác nhau như tế bào T CD4+ hoặc CD8+ và được báo cáo là phần trăm của quần thể ban đầu hoặc cường độ huỳnh quang trung bình (MFI).

Phân tích tăng sinh CFSE

Dữ liệu CFSE cũng được phân tích bằng Flowjo. Sau khi loại bỏ các tế bào chết và các bộ đôi, cổng “tế bào được tăng sinh” được xây dựng trên cơ sở tế bào T không được hoạt hóa. Tế bào bất kỳ thuộc cổng này trong mẫu bất kỳ đã cho đều được đếm là các tế bào tăng sinh. Số liệu được báo cáo là phần trăm tăng sinh.

Phân tích sự suy giảm tế bào bằng FACS

Sự suy giảm tế bào được phân tích bằng FlowJo. Đầu tiên, công tế bào sống sót được xác định trên cơ sở nhuộm màu bằng thuốc nhuộm tỷ lệ sống sót tế bào LIVE/DEAD. Sau đó các bộ đôi được loại bỏ như đã được mô tả. Phần trăm của tiểu quần thể tế bào T CD4+ hoặc CD8+ sống sót được xác định làm dấu ấn suy giảm tế bào.

Phân tích điều chỉnh đường cong đáp ứng liều kháng thể

Số liệu đáp ứng liều được đưa vào phần mềm GraphPad Prism và được chuyển dạng thành thang logarit. Đáp ứng liều chủ vận với các mô hình độ dốc khác nhau được sử dụng để lấy khớp đường cong dữ liệu và tạo ra giá trị EC50. Công thức lấy khớp được thể hiện dưới đây:

$$Y = \text{Đáy} + (\text{Đỉnh} - \text{Đáy}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Độ dốc})})$$

Kết quả

Xác định kháng thể ICOS ở chuột kháng người

Mười bốn mAb của chuột được sàng lọc để liên kết ICOS từ khí Cynomolgus và người. Mười hai mẫu có khả năng tạo dòng lại, giải trình tự, phát triển và được tinh chế với lượng đủ cho các nghiên cứu chức năng. Tất cả đều được thử nghiệm về các đặc tính liên kết sử dụng BIAcore. Hai mẫu được xác định là không liên kết/rất yếu. Mười mAb đã được tinh chế được thử nghiệm bằng phân tích chức năng “chủ vận”. Bốn mAb chủ vận tốt nhất (được ký hiệu là 422.2, 279.1, 314.8 và 88.2 trong Bảng 5 dưới đây), căn cứ vào khả năng cảm ứng sự tăng sinh tế bào T và sự sản sinh xytokin IFN- γ trong tất cả những người cho khỏe mạnh, được chọn và được tạo ra dưới dạng thể khảm IgG1 người. Trình tự CDR của các mẫu 314.8, 88.2, 92.17, 145.1, và 53.3 được thể hiện với mAb ICOS khác trong PCT/EP2012/055735 (WO 2012/131004).

Vùng biến đổi chuỗi nặng đối với dòng 88.2 là SEQ ID NO:13 được thể hiện dưới đây :

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPS
DSYTNYNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMQLTSPTSEDSAVYYCTRWNLSSYYFDN
NYYLDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:13)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ đối với dòng 88.2 là SEQ ID NO:14 được thể hiện dưới đây:

QAVVTQEMUóITSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTN
 NRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYNNHLVFGGGTKLTV
 L (SEQ ID NO:14)

Bảng 5: Sự cạnh tranh và liên kết mAb ICOS

mAb ICOS Dòng số	Biacore từ người (nM)	Biacore cyno (nM)	CD28/ CTLA4 x-phản ứng	Ức chế liên kết ICOS-L	Cạnh tranh chống lại 314.8	Cạnh tranh chống lại 121.4
53.3	30,4	19,7	-	++	+	+
88.2	31	23	-	+	+	+
92.17	27,5	18,8	-	++	+	+
145.1	49,5	43,5	-	++	+	+
314.8	17	9,3	-	+++	+	+
121.4	15	58	-	-	- /+	- /+
202.24	46	19	-	+	+	+
279.1	39	33	-	+	+	+
293.1	7,6	10	-	++	+	+
422.2	5,7	4,46	-	++	++	+

Tám trong số các liên kết ICOS tốt nhất được thử nghiệm về sự sản xuất IFN- γ và sự tăng sinh tế bào T bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào theo thiết kế tăng liều đối với các đối chứng IgG1 và EPR7114 ở chuột. Trên cơ sở các thử nghiệm này, dòng được ký hiệu là 422.2 được chọn để nhân hóa. Xem Fig. 1 và 2.

Ví dụ 3: Nhân hóa kháng thể

(Các) quy trình thử nghiệm

Thu hồi gen biến đổi của kháng thể từ mARN và tạo kháng thể khảm Fc thể đại

Toàn bộ ARN được tinh chế từ hạt tế bào lai nhỏ 422.2, được phiên mã ngược để tạo ra cADN mà từ đó sản phẩm gen biến đổi, khoảng 400bp, được phân lập bằng PCR và được tinh chế bằng điện di trên gel agarosa.

Các mảnh vùng biến đổi đã được tinh chế được tạo dòng trong các vector pTT5 chứa vùng hằng định IgG1 từ người hoặc vùng hằng định Kappa từ người và được biến nạp vào tế bào thẩm quyền DH5 α . Các cụm khuẩn lạc được thu gom và được sử dụng để cấy chuyển ampicillin chứa L-broth. Plasmid ADN được phân lập từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng kit điều chế nhỏ QuickLyse. Các gen biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được giải trình

tự và dữ liệu trình tự được đồng chỉnh thông tin để xác định trình tự gen biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Tạo dòng kháng thể khảm 422.2 được tối ưu đơn vị mã

Trình tự protein vùng biến đổi của chuột trưởng thành được dịch mã ngược vào AND, sau đó được tối ưu đơn vị mã. Sau đó, trình tự V_H và V_L được biến đổi để bao gồm năm vùng khởi đầu không được dịch mã được ưu tiên và các vị trí tạo dòng được ưu tiên ở mỗi đầu. Trình tự V_H được làm thích ứng được tạo cấu trúc *de novo* sử dụng phương pháp trên có sở PCR và oligonucleotit có phần trùng lặp sau đó được ghép vào IgG1 Fc từ người thể đại hoặc hIgG1 bất hoạt Fc (L235A, G237A) hoặc hIgG4 được làm ổn định vùng bản lề (S228P, L235E) (IgG4PE) có mặt trong vector pTT. Trình tự V_L được làm thích ứng được tạo cấu trúc *de novo* sử dụng phương pháp trên có sở PCR và oligonucleotit có phần trùng lặp sau đó được ghép vào vùng hằng định kappa có mặt trong vector pTT5.

Plasmit pTT thu được được sử dụng trong quá trình chuyển nhiễm HEK để tạo ra kháng thể khảm.

Nhân hóa vùng biến đổi của 422.2

Mẫu gen biến đổi từ người (V) được chọn để nhân hóa 422.2 bằng cách tra cứu cơ sở dữ liệu chuỗi nặng và chuỗi nhẹ dòng mầm từ người thích hợp với vùng 422.2 V bị che CDR bằng cách sử dụng BLASTP. IGHV1-69 và IGKV3-11 được chọn từ BLASTP đỉnh làm mẫu khung gen V để nhân hóa 422.2. Gen nối (J) dòng mầm IGHJ6 và IGKJ2 từ người được chọn để nhân hóa 422.2.

Sự khác nhau về gốc giữa gen dòng mầm từ người được chọn và trình tự 422.2 được xác định để hỗ trợ việc chọn lựa đột biến ngược (đột biến được tạo ra để thay đổi gốc của khung đặc hiệu từ người đối với gốc ở chuột). Sáu biến thể V_H được nhân hóa và sáu biến thể V_L được nhân hóa được tạo ra, được tối ưu hóa đơn vị mã và sau đó được biến đổi để bao gồm sự kéo dài 5' và 3' được ưu tiên. Trình tự vùng biến đổi đã được làm thích ứng được tạo cấu trúc *de novo* bằng cách sử dụng phương pháp trên cơ sở PCR và oligonucleotit có phần trùng lặp sau đó lần lượt được tạo dòng vào vector pTT.

Plasmit pTT thu được được sử dụng trong quá trình chuyển nhiễm HEK để tạo ra kháng thể được nhân hóa. Tế bào huyền phù HEK2936E được đếm và được pha loãng đến $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL đến 2×10^6 tế bào/mL sử dụng môi trường biểu hiện Freestyle 293 được

bổ sung Gentamicin 0,05% và đối với một số thí nghiệm được bổ sung pluronic F68 1%. ADN và chất chuyển nhiễm (Gemini hoặc 293-Fectin) được bổ sung vào OptiMEM và được làm đồng nhất một cách kỹ lưỡng trước khi ủ trong 20 đến 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Phức hợp ADN-lipid sau đó được kết hợp với huyền phù tế bào và các tế bào đã được chuyển nhiễm được ủ ở 37°C, 5% CO₂, 125 vòng/phút. Đối với một số mẫu chuyển nhiễm, trypton (môi trường biểu hiện Freestyle 293 được bổ sung pluronic F68 1% và 20% casein tryptone trọng lượng/thể tích) được bổ sung vào mỗi mẫu chuyển nhiễm 24 đến 48 giờ sau khi chuyển nhiễm. Huyền phù tế bào đã được chuyển nhiễm được ủ trong 5 đến 8 ngày cho đến khi tế bào có thể sống còn dưới 60%, sau đó được ly tâm (phụ thuộc cấu trúc). Dịch nổi bề mặt được thu gom và được lọc.

Kháng thể được tinh chế bằng cách cho dịch nổi bề mặt đi qua cột 1mL HiTrap protein A HP để bắt giữ kháng thể, rửa cột bằng 10mL PBS và rửa giải bằng 5mL IgG Elute (Pierce, 21009). Protein đã được tinh chế được trao đổi đệm vào PBS bằng cách sử dụng thiết bị Millipore Centricon® Centrifugal Filter Units (cắt 30K) và được định lượng trên quang phổ kế Nandrop.

KẾT QUẢ

Plasmit biểu hiện được thiết kế

Trình tự gen biến đổi của kháng thể ở chuột của dòng tế bào lai 422.2 được thu hồi và trình tự là SEQ ID NO: 19 và 20 được thể hiện dưới đây, lần lượt được mô tả trong Fig. 8.

422 HC

QVQLQQSGPELVRPGESVKISCMGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIIY
SDHTNYNQKFQGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGW
YFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:19)

422 LC

ENVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWWYQKKSITSPKLWIYDTSKLAS
GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSGLPYTFGGGTKLEIKR
(SEQ ID NO:20)

Việc tạo dòng vùng biến đổi được thu hồi vào vector pTT5 đã chọn tạo ra plasmit mã hóa trình tự khảm chuỗi nhẹ của 422.2 và trình tự khảm chuỗi nặng trên hIgG1 Fc thể

dại, hIgG1 được làm bất hoạt Fc (L235A/G237A, phương pháp đánh số EU) hoặc hIgG4 PE (S228P/L235E, phương pháp đánh số EU). Kháng thể khảm được sử dụng để xác định chức năng của vùng V ở chuột được tạo dòng và để xác định isotyp thích hợp nhất.

Việc thiết kế plasmit biểu hiện pTT ở động vật có vú mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các biến thể được nhân hóa của 422.2 đã được thực hiện một cách thành công.

Biểu hiện, tinh chế và xác định H2L5 hIgG4PE

Trình tự protein trưởng thành của H2L5 hIgG4PE còn bao gồm việc đánh dấu bổ sung như trong Fig. 9. Trình tự ADN của vùng mã hóa của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ H2L5 hIgG4PE còn được mô tả trong Fig. 10 và 11.

Ví dụ 4: Phân tích chức năng H2L5

Liên kết thụ thể Fc

Kháng thể được nhân hóa H2L5 được biến đổi từ isotyp IgG1 từ người thành isotyp IgG4 từ người được biến đổi kết hợp với đột biến S228P, L235E (đánh số theo EU) để ngăn ngừa mảnh liên kết kháng nguyên (Fab). IgG4PE từ người được chọn trên IgG1 từ người vì nó làm giảm liên kết của mAb với thụ thể Fc γ hoạt hóa và C1q, do đó, làm giảm khả năng cảm ứng suy giảm tế bào dương với ICOS bởi độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) của mAb. Ngoài ra, IgG4PE từ người (S228P, L235E) vẫn liên kết với Fc γ RIIb (thụ thể Fc γ ức chế). Sự tương tác với Fc γ RIIb có thể là giới hạn đối với hoạt tính chủ vận của kháng thể ICOS bằng cách giúp kháng thể này tạo ra liên kết chéo. Sự tương tác với Fc γ RIIb được xác định là giới hạn đối với hoạt tính chủ vận của kháng thể điều hòa miễn dịch khác hướng đích họ thụ thể TNF- α cũng như CD28 (Bartholomaeus P et al., "Cell contact-dependent priming and Fc interaction with CD32+ immune cells contribute to the TGN1412-triggered cytokine response." J. Immunol., 192(5); 2091-8 (2014)).

IgG4PE từ người còn được xác định là làm giảm liên kết của mAb với thụ thể Fc γ hoạt hóa (Fc γ RI, Fc γ RIIa và Fc γ RIIIa) và C1q, do đó làm giảm khả năng cảm ứng suy giảm tế bào dương với ICOS bởi độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) của mAb. Ngoài ra, IgG4PE từ người (S228P, L235E) vẫn liên kết với Fc γ RIIb (chất ức chế Fc γ thụ thể) (Bảng 6).

Bảng 6 dưới đây thể hiện ái lực liên kết tiêu biểu đối với thụ thể Fcγ từ người của H2L5 khởi đầu ở dạng kháng thể hIgG1 hoặc hIgG4PE.

Bảng 6: Ái lực tiêu biểu của kháng thể ICOS khởi đầu được nhân hóa, ở dạng hIgG1 hoặc hIgG4PE, với thụ thể Fcγ từ người

Kháng thể	FcγR I	FcγR IIa H131	FcγR IIa R131	FcγR IIb	FcγR IIIa V158	FcγR IIIa F158
	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)
422 H2L5 IgG1 WT	60,8	405	662	1340	281	862
422 H2L5 hIgG4PE (H2L5 IgG4PE)	645	NB	2500	1470	NB	NB

NB = không liên kết.

Quy trình thử nghiệm

Đánh giá chức năng của biến thể được nhân hóa 422.2

Để nhân hóa bốn kháng thể chủ vận ICOS tiềm năng, thể khảm người-chuột, mà là thể dung hợp vùng V của chuột và phần Fc IgG1 từ người, được tạo ra. Bốn kháng thể khảm này được thử nghiệm trong thử nghiệm hoạt hóa PBMC toàn phần từ người ở dạng gắn kết đĩa. Thể khảm kháng ICOS 422.2 thể hiện hoạt tính chủ vận tốt nhất trong thử nghiệm hoạt hóa gắn kết PBMC. Kết hợp với dữ liệu liên kết và đặc tính sinh lý, dòng 422.2 được chọn để nhân hóa. Bốn biến thể 422.2 được nhân hóa được chọn trên cơ sở liên kết ICOS và đặc tính sinh lý (422.2 H2L0, H2L5, H5L0 và H5L5) và được kiểm tra trong thử nghiệm hoạt hóa gắn kết PBMC từ người. Biến thể H2L5 đã chứng tỏ sự hoạt hóa tế bào T tương đương hoặc tốt hơn như được xác định bởi sự sản sinh xytokin so với biến thể khác (Fig. 3).

Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nặng trưởng thành của biến thể H5 lần lượt là SEQ ID NO:15 và 16 được thể hiện dưới đây.

H5 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISI
YSDHTNYNQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCGRNNYGNYG
WYFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:15)

Chuỗi nặng H5 trưởng thành

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGGLEWIGLISI
YSDHTNYNQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYG
WYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nhẹ trưởng thành của biến thể L0 lần lượt là
 SEQ ID NO:17 và 18 được thể hiện dưới đây.

L0 VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCFQGSQGYPTFGQGKLEIK (SEQ ID
 NO:17)

Chuỗi nhẹ L0 trưởng thành

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCFQGSQGYPTFGQGKLEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO:18)

Lựa chọn IgG4[PE] làm isotyp

422 H2L5 IgG1 được thử nghiệm tiếp trong các thử nghiệm hoạt hóa PBMC toàn phần ở dạng hòa tan. Dạng hòa tan này có thể thích hợp hơn đối với các điều kiện in vivo vì thử nghiệm PBMC toàn phần chứa tế bào bạch huyết, bạch cầu đơn nhân và tế bào miễn dịch khác trong cùng một lỗ. Tuy nhiên, 422 H2L5 IgG1 mAb thể hiện một cách ổn định việc giảm tỷ lệ sống sót của quần thể tế bào T mà thường làm suy giảm tế bào T. Kết quả này được quan sát với các mức độ khác nhau ở 11 người cho khỏe mạnh mà được thử nghiệm và nổi bật ở tế bào T CD4+ hơn ở tế bào T CD8+. Ngược lại, kháng thể 422 H2L5

không có sự giảm đáng kể về tỷ lệ sống sót của tế bào T khi được biểu hiện dưới dạng IgG4[PE] hoặc isotyp bất hoạt Fc, điều này cho thấy rằng việc giảm tỷ lệ sống sót có thể là do độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể qua trung gian Fc γ R (ADCC) (Fig. 4).

Đáp ứng liều của H2L5 hIgG4PE trong thử nghiệm hoạt hóa tế bào T CD4+

Để xác định tác dụng hoạt hóa tế bào T của H2L5 hIgG4PE, đầu tiên, tế bào T CD4+ nguyên thủy từ người được kích thích sơ bộ bằng đĩa được gắn kết kháng thể kháng CD3 (1 μ g/ml) / kháng CD28 (3 μ g/ml) trong 48 giờ để cảm ứng mức thụ thể ICOS trên bề mặt của quần thể tế bào hiệu lực T, sau đó là tái kích thích bằng DynaBeads kháng CD3 và H2L5 hIgG4PE. Đường cong đáp ứng liều 10 điểm được tạo ra bằng cách xử lý tế bào T CD4+ được kích thích sơ bộ bằng chuỗi các nồng độ H2L5 hIgG4PE gắn kết hoặc tan với sự có mặt của hạt DynaBead kháng CD3. Kết quả cho thấy rằng cả H2L5 hIgG4PE gắn kết và tan đều gia tăng mức sản sinh xytokin IFN- γ và TNF- α theo cách phụ thuộc liều trong hai người cho khỏe mạnh riêng biệt (Fig. 5). Phân tích điều chỉnh đường cong đáp ứng liều được thực hiện để tạo ra giá trị EC50. Đáng chú ý là, việc điều trị bằng H2L5 hIgG4PE cảm ứng xytokin cao hơn một cách đáng kể khi kháng thể được cố định trên đĩa, ngược lại với việc được bổ sung ở dạng protein tan vào dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào T.

Thử nghiệm chức năng của H2L5 hIgG4PE trong thử nghiệm hoạt hóa PBMC tan từ người

Để kiểm tra chức năng của H2L5 hIgG4PE trong môi trường nuôi cấy *ex vivo* PBMC toàn phần từ người, PBMC từ người cho khỏe mạnh được chuẩn bị với đĩa được gắn kết kháng thể kháng CD3 và kháng CD28 trong 48 giờ, sau đó là xử lý H2L5 hIgG4PE tan với sự có mặt của hạt Dynabead kháng CD3 (tỷ lệ hạt:tế bào = 1:1) trong 3,5 ngày. Sự sản sinh xytokin và biểu hiện tế bào T Granzyme B được kiểm tra theo các chỉ báo chức năng của chức năng tế bào T. Kết quả từ 3 người cho được thể hiện vắn tắt trong Fig. 6, mà cung cấp bằng chứng để gợi ý rằng H2L5 hIgG4PE cảm ứng sự tăng sinh, sự sản sinh xytokin và gia tăng khả năng gây độc tế bào ở các PBMC được hoạt hóa từ người cho khỏe mạnh (Fig. 6).

Hoạt tính ICOS mAb đối với các PBMC được kích thích sơ bộ từ người

Hoạt tính của H2L5 hIgG4PE được đánh giá trong thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC trong đó PBMC được kích thích sơ bộ bằng đĩa được gắn kết kháng thể kháng CD3 (dòng OKT3, 1 μ g/mL) và kháng CD28 (dòng CD28.2, 3 μ g/mL) trong 48 giờ. Tiếp theo, để xác định điều kiện kích thích sơ bộ tối ưu, hạt Dynabead CD3 và hạt Dynabead

CD3/CD28 từ người (ThermoFisher) với các tỷ lệ hạt so với tế bào khác nhau được sử dụng để kích thích sơ bộ PBMC. Sau 48h kích thích sơ bộ, tế bào được lấy và hạt được loại bỏ bằng từ tính trước khi tái kích thích bằng hạt Dynabead kháng CD3 (tỷ lệ hạt so với tế bào = 1:1) với sự có mặt hoặc không có mặt của ICOS mAb tan. ICOS mAb chủ vận H2L5 hIgG4PE gây cảm ứng IFN γ so với mẫu đối chứng isotyp dưới tất cả các điều kiện kích thích sơ bộ được kiểm tra; tuy nhiên, cường độ sản sinh IFN γ tỷ lệ nghịch với độ mạnh của kích thích sơ bộ.

Ví dụ 5 – Dấu ấn hoạt hóa tế bào T

Phương pháp

Sự thay đổi điểm dừng chức năng phụ thuộc nồng độ được đánh giá bằng cách xử lý các PBMC từ người khỏe mạnh bằng H2L5 hIgG4PE đã được làm bất động ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 μ g/mL đến 100 μ g/mL đồng thời với việc điều trị bằng kháng thể kháng CD3 ở 0,6 μ g/mL. Sự thay đổi về mức biểu hiện dấu ấn hoạt hóa bề mặt tế bào T CD69, OX40 và CD25 được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng và được xem là thước đo của sự hoạt hóa tế bào T. Sự tăng sinh tế bào T được xác định bởi sự thay đổi về việc nhuộm màu hạt nhân Ki67. Sự thay đổi về mức cytokin Th1, Th2 và Th17 được đánh giá trên nền tảng MSD đáp ứng với việc điều trị bằng H2L5 hIgG4PE trong sự có mặt của thể tiếp hợp CD3. Các thời điểm sau điều trị 24 và 48 giờ được chọn để đảm bảo đạt được cả những thay đổi cytokin ở thời điểm ban đầu cũng như những thay đổi về sự tăng sinh mà chủ yếu được thông báo là ở các thời điểm sau đó.

Chuẩn bị thử nghiệm

Phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ người

Máu toàn phần được thu gom từ người cho khỏe mạnh bằng ống tiêm được phủ natri heparin lỏng (Sagent nồng độ cuối 10 IU/mL) và sau đó được pha loãng 1:1 bằng dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS). Máu đã được pha loãng (35ml) được phân lớp trên mặt trên của 15ml môi trường gradien mật độ Ficoll (GE Healthcare) và được ly tâm ở 1200 x g trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT) mà không cần hãm. Lớp tế bào được tạo đơn nhân màu trắng được chuyển một cách cẩn thận vào ống mới có dung tích 50ml. Thể tích tương đương của PBS được bổ sung vào ống và được ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở RT. PBMC được rửa một lần bằng PBS và được ly tâm như đã được mô tả. PBMC

được tạo huyền phù lại trong 50ml môi trường AIM-V. Tế bào được đếm bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào Vi-Cell và máy phân tích tỷ lệ sống sót (BeckmanCoulter).

Phủ kháng thể

Kháng thể kháng CD3 từ người được pha loãng trong dung dịch đệm phủ đến nồng độ cuối là 0,6µg/mL. 100µL kháng thể đã pha loãng được phủ trên đĩa đáy phẳng, 96 lỗ qua đêm ở 4°C. Ngày tiếp theo, dung dịch gốc chứa 10,1mg H2L5 hIgG4PE và 7,9mg kháng thể đối chứng isotyp IgG4 PE kháng RSV được pha loãng theo dãy với tỷ lệ 1:2 trong dung dịch đệm phủ để tạo ra nồng độ kháng thể cuối nằm trong khoảng từ 100 đến 0,1µg/mL. 100µL kháng thể đã pha loãng được phủ lên đĩa đã được phủ kháng thể kháng CD3 trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Quy trình thử nghiệm

Thử nghiệm hoạt hóa PBMC từ người

H2L5 hIgG4PE được kiểm tra trong thử nghiệm hoạt hóa PBMC từ người, trong đó sự gắn kết TCR thông qua sự đồng kích thích kháng thể kháng CD3 và ICOS bằng H2L5 hIgG4PE xảy ra đồng thời, và tác dụng hoạt hóa được theo dõi ở 24 và 48 giờ sau khi hoạt hóa. Thử nghiệm này được lặp lại bốn lần (n=4) với máu từ bốn người cho khác nhau. Hai trăm (200)µL PBMC (1×10^6 tế bào/mL) trong môi trường AIM-V được bổ sung vào các lỗ được phủ kháng thể kháng CD3 với các nồng độ mẫu đối chứng isotyp H2L5 hIgG4PE hoặc IgG4 khác nhau. Ba bản sao được bao gồm trong mỗi điều kiện thử nghiệm. Các PBMC được nuôi cấy ở 37°C và 5% CO2 trong các thời gian khác nhau như được chỉ định trên đây. Dịch nổi bề mặt được thu gom ở thời điểm 24 và 48h và sau đó được cất giữ ở -80°C để phân tích xytokin được tiết trên nền MSD. Tế bào được chuyển vào đĩa 96 lỗ sâu ở cả 24 và 48 giờ và được rửa hai lần bằng 1ml dung dịch đệm nhuộm FACS được nhuộm kháng thể được liên kết chất huỳnh quang hoặc các mẫu đối chứng isotyp.

Nhuộm màu bề mặt tế bào

Đầu tiên, tế bào được nhuộm bằng 100µL thuốc nhuộm cố định tỷ lệ sống sót eFluor 506 được pha loãng sơ bộ 1:1000 trong PBS trong 30 phút trong bóng tối ở 4°C. Tế bào được rửa và sau đó được ủ với kháng thể phát hiện để dấu ấn bề mặt tế bào được liên kết với các chất huỳnh quang khác nhau trên đá trong 30 phút. Việc nhuộm màu sau đó với kháng thể bề mặt tế bào, các mẫu không được nhuộm dấu ấn nội bào được rửa một lần

bằng dung dịch đệm nhuộm màu FACS trong nước đá trước khi được chạy trên thiết bị đếm tế bào theo dòng FACS Canto II.

Năng suất thiết bị đếm tế bào được đánh giá một cách thích hợp hàng ngày bằng cách sử dụng hạt Cytometer Set-up and Tracking. Sự hiệu chỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng kit sử dụng hạt AbC kháng chuột mà được nhuộm riêng rẽ bằng kháng thể phát hiện được liên kết với mỗi chất huỳnh quang. Các mẫu được chạy và số liệu thu được sau khi thiết lập hiệu chỉnh một cách thích hợp được xác định bằng hỗn hợp của hạt được mô tả trên đây.

Nhuộm màu nội bào cho Foxp3 và Ki67

Sau khi nhuộm màu bề mặt tế bào, tế bào được cố định và được thấm để nhuộm màu dấu ấn nội bào. Sử dụng bộ dung dịch đệm yếu tố phiên mã, dung dịch đệm cố định/thấm được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch này với tỷ lệ 1:3 trong dung dịch đệm pha loãng. Dung dịch đệm thấm rửa (Perm Wash Buffer) được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch gốc đệm 5X thấm/rửa trong nước khử khoáng. Một (1)ml dung dịch đệm cố định/thấm được bổ sung vào mỗi mẫu, và ngay sau đó các đĩa được lắc trên thiết bị lắc. Đĩa được ủ trong bóng tối ở 4°C trong 45 phút. Sau khi ly tâm, 1ml dung dịch đệm thấm/rửa được bổ sung vào, và đĩa được trộn và được ly tâm đối với cả hai mẫu rửa. Hỗn dịch nội bào được chuẩn bị với kháng thể chỉ dấu. 100µL kháng thể nội bào được bổ sung vào thích hợp mẫu, và đĩa được ủ trong bóng tối ở 4°C trong 30 phút. Mẫu được rửa hai lần bằng 1ml dung dịch đệm thấm/rửa, được tạo huyền phù lại trong 250µL dung dịch đệm dòng và được chạy trên thiết bị đếm tế bào theo dòng FACS Canto II.

Thử nghiệm xytokin HUMAN Special Order 9-Plex

Mức xytokin được xác định bằng cách sử dụng kit MSD HUMAN Special Order 9-Plex. Mẫu và mẫu hiệu chuẩn được pha loãng trong dung dịch pha loãng Diluent 43. Mẫu được pha loãng 1:10 cho thử nghiệm 9-plex và 1:200 cho thử nghiệm IFN γ đã được mô tả trong 0,250µL dung dịch pha loãng được bổ sung vào mỗi khoang trong số hai khoang của mẫu hiệu chuẩn. Sau khi lắc, mẫu hiệu chuẩn được ủ trên đá trong ít nhất 5 phút. Hai trăm (200)µL mỗi mẫu trong máy đo được bổ sung vào 400µL dung dịch pha loãng để tạo ra nồng độ đỉnh của mẫu hiệu chuẩn, và chuỗi các dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:4 được sử dụng để chuẩn bị 6 mẫu dung dịch pha loãng hiệu chuẩn khác. Dung dịch pha loãng 43 (Diluent 43) được sử dụng làm nền đĩa. 50µL mẫu pha loãng (ba mẫu giống nhau) và mẫu

hiệu chuẩn (hai bộ giống nhau) được bổ sung vào plat MSD. Đĩa được gắn kín và được ủ ở RT đồng thời lắc trong 2 giờ. Đĩa được rửa 3 lần bằng 150 μ L dung dịch đệm rửa MSD được pha loãng từ kit. Đối với mỗi đĩa, dung dịch kháng thể phát hiện được chuẩn bị bằng cách kết hợp 60 μ L mỗi trong số 9 kháng thể phát hiện được pha loãng đến 3mL với dung dịch pha loãng 3. Sau khi bổ sung 25 μ L dung dịch kháng thể phát hiện, đĩa được gắn kín và được ủ ở nhiệt độ trong phòng, trong bóng tối, kèm lắc trong 2 giờ. Đĩa được rửa như trên đây. 150 μ L 2x dung dịch đệm để đọc (Read Buffer) được bổ sung vào đĩa, và chúng được đọc trên QuickPlex.

Thử nghiệm xytokin IFN γ từ người

Mẫu và mẫu hiệu chuẩn được pha loãng trong dung dịch pha loãng 2. 1ml dung dịch pha loãng được bổ sung vào mẫu hiệu chuẩn. Sau khi lắc, mẫu hiệu chuẩn được ủ trên đá trong 5 phút. Đây là mẫu hiệu chuẩn 1. Chuỗi các dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:4 được sử dụng để chuẩn bị 6 mẫu dung dịch pha loãng hiệu chuẩn khác. Dung dịch pha loãng 2 được sử dụng làm nền đĩa. Năm mươi (50) μ L mẫu pha loãng (ba mẫu) và mẫu hiệu chuẩn (hai mẫu) được bổ sung vào đĩa MSD. Đĩa được gắn kín và được ủ ở RT kèm lắc trong 2 giờ. Đĩa được rửa 3 lần bằng 150 μ L dung dịch đệm rửa MSD được pha loãng từ kit. Dung dịch kháng thể phát hiện được điều chế trong dung dịch pha loãng 3. Đối với mỗi đĩa, 60 μ L mỗi kháng thể phát hiện được bổ sung vào dung dịch pha loãng cho tổng 3ml thuốc thử phát hiện. Sau khi bổ sung 25 μ L kháng thể phát hiện, đĩa được gắn kín và được ủ ở nhiệt độ trong phòng, trong bóng tối, kèm lắc trong 2 giờ. Đĩa được rửa 3 lần. Dung dịch đệm để đọc được bổ sung vào đĩa và chúng được đọc trên QuickPlex.

Phân tích số liệu

Xytokin và phân tích số liệu đếm tế bào theo dòng

Kết quả thử nghiệm xytokin MSD được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm MSD Discovery Workbench, phiên bản 4.0 (Meso-Scale), Microsoft Excel, và Graphpad Prism. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được phân tích bằng DIVA, và các giá trị được dựng đồ thị theo phần mềm GraphPad Prism.

Phân tích phù hợp đường cong đáp ứng liều kháng thể

Dữ liệu đáp ứng liều được đưa vào phần mềm GraphPad Prism và được chuyển dạng thành thang logarit. Đáp ứng liều chất chủ vận với các mô hình độ dốc khác nhau

được sử dụng để phân tích số liệu và tạo ra giá trị EC50. Công thức phù hợp được thể hiện dưới đây:

$$Y = \text{Đáy} + (\text{Đỉnh} - \text{Đáy}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Độ dốc}))}$$

Phân tích thông kê

Sự khác nhau giữa giá trị của H2L5 hIgG4PE và mẫu đối chứng kháng thể isotyp trong nghiên cứu tăng sinh được phân tích về ý nghĩa thống kê bằng thử nghiệm t bất cặp đôi của Student.

Kết quả

Đánh giá sự thay đổi xytokin bởi H2L5 hIgG4PE

Việc xử lý PBMC bằng H2L5 hIgG4PE được làm bất động với sự có mặt của kháng thể kháng CD3 gây ra sự tiết, với các mức độ khác nhau, của xytokin Th1 như IFN γ , TNF α , xytokin Th2, IL-6 và IL-10, cũng như xytokin Th17 IL-17a theo cách phụ thuộc nồng độ. Các xytokin khác được xác định như IL-4, IL-5 và IL-13 cũng thể hiện mức đáp ứng phụ thuộc nồng độ thấp hơn với sự kích thích H2L5 hIgG4PE. Kết quả từ bốn người cho riêng rẽ được thể hiện vắn tắt trong Bảng 7.

Đánh giá chức năng của hoạt tính H2L5 hIgG4PE trên dấu ấn bề mặt tế bào của sự hoạt hóa tế bào T bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng

Việc xử lý H2L5 hIgG4PE bằng sự kích thích đồng thời CD3 trong PBMC từ người không được hoạt hóa (n=4 người cho) cảm ứng sự thay đổi đáng kể về dấu ấn hoạt hóa tế bào T (Bảng 7 và 8)). Sự tăng nhanh về tế bào T CD8 và CD4 dương tính với CD25 và OX40 được quan sát trong mẫu được xử lý H2L5 hIgG4PE khi so sánh với mẫu đối chứng isotyp IgG4 từ người. Phần trăm tế bào T CD4 và CD8 dương tính với CD69 cũng được gia tăng ở thời điểm 24 và 48 h theo cách phụ thuộc nồng độ.

Xác định đặc trưng của tác dụng của H2L5 hIgG4PE đối với tăng sinh tế bào T

Việc xử lý H2L5 hIgG4PE được làm bất động bằng sự hoạt hóa CD3 đồng thời tạo ra sự gia tăng phụ thuộc nồng độ ở cả sự tăng sinh tế bào T CD4 và CD8 (n=6 người cho) như được xác định bằng cách nhuộm màu nội bào Ki67 (Bảng 8). H2L5 hIgG4PE cũng gia tăng sự tăng sinh tế bào T điều hòa CD4+CD25+Foxp3+ theo cách phụ thuộc nồng độ nhưng ở mức thấp hơn mức quan sát được với toàn bộ tế bào T CD4 và CD8. Việc gia tăng sự tăng sinh tế bào T bằng H2L5 hIgG4PE chỉ quan sát được ở thời điểm 48 h. Sự tăng

sinh gia tăng của tế bào T điều hòa là không đáng kể, trong khi sự gia tăng phụ thuộc nồng độ đối với việc tăng sinh tế bào CD4⁺ ($p < 0,05$ đối với các nồng độ lớn hơn 0,4 µg/mL H2L5 hIgG4PE) và tế bào T CD8⁺ ($p < 0,05$ đối với các nồng độ nằm trong khoảng 0,2 và 1,6 µg/mL) là đáng kể (xem Bảng 7).

Bảng 7. Giá trị EC50 (µg/mL) từ tất cả các điểm cuối chức năng đối với H2L5 hIgG4PE trong thử nghiệm hoạt hóa PBMC từ người.

	Người cho 1136F50		Người cho 185M45		Người cho 1124F36		Người cho 1149M52	
	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ	24 giờ	48 giờ
IL-10	1,7	1,3	0,7	0,8	0,7	0,6	0,5	0,6
IFN- γ	0,4	1,5	0,3	0,7	0,3	0,5	0,2	0,6
IL-17a	1,4	1,6	0,8	1,1	0,6	0,8	0,7	1,0
IL-6	0,7	1,1	0,7	0,8	NA	NA	0,2	0,3
TNF- α	NA	0,3	NA	0,5	NA	0,3	NA	0,2
CD4+CD69+	0,5	0,4	0,8	NA	1,1	1,1	0,5	0,4
CD4+CD25+	0,3	0,6	2,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,4
CD4+OX40+	0,2	0,4	1,6	NA	0,6	1,2	0,6	0,4
CD8+CD69+	0,5	0,6	1,2	0,5	0,8	1,1	0,6	0,4
CD8+CD25+	0,4	0,7	2	0,5	0,6	0,5	1,0	0,4
CD8+OX40+	0,3	0,5	1,6	NA	2,4	0,5	1,5	0,3
CD4+Ki67+	NT	NT	NA	0,6	NA	0,8	NA	0,5
CD8+Ki67+	NT	NT	NA	0,4	NA	0,7	NA	0,3

NA = không phân tích (Giá trị EC50 không chính xác do việc phù hợp đường cong kém).

NT = không được kiểm tra.

Bảng 8. Phần trăm tế bào T CD4 hoặc CD8 dương tính CD25, Foxp3 và Ki67 ở PBMC người sau khi kích thích bằng H2L5 hIgG4PE trong sự có mặt của kháng CD3 trong 48 giờ

	Nồng độ kháng thể	H2LA hIgG4PE (% tế bào T CD4 hoặc CD8)			Mẫu đối chứng isotyp (% tế bào T CD4 hoặc CD8)			Thử nghiệm T
	µg/ml	Người cho 185M45	Người cho 1124F36	Người cho 1149M52	Người cho 185M45	Người cho 1124F36	Người cho 1149M52	(giá trị p)
% tế bào T Treg CD4	0	10,2	3,8	6,1	10,2	3,8	6,1	0,415
	0,1	12,4	4,2	7,6	8,6	3,6	6,6	0,220
	0,2	11,8	4,5	9,8	8,5	3,2	7,1	0,054
	0,4	14,3	5,2	11,3	8,6	3,4	7,4	0,076
	0,8	18,6	6,9	14,3	8,4	3,4	7,3	0,069
	1,6	21,4	7,5	15,9	7,7	3,8	7,2	0,095
	3,1	20,8	7,9	15,0	10,4	3,9	7,1	0,058
	6,3	18,7	8,3	14,7	10,3	3,6	8,3	0,026
	12,5	20,2	7,6	15,1	9,6	4,0	8,1	0,072
	25	19,5	7,6	13,9	11,5	5,1	8,3	0,079
	50	20,0	7,9	13,3	9,6	5,0	9,7	0,143
	100	18,7	7,9	13,3	11,5	5,6	8,8	0,080
% tế bào T Ki67+ CD4	0	7,2	1,2	2,3	7,2	1,2	2,3	0,693
	0,1	9,6	1,5	2,9	6,1	0,9	2,1	0,219
	0,2	9,0	2,1	4,4	5,0	0,9	2,4	0,098
	0,4	11,9	3,9	7,5	6,8	1,0	2,7	0,025
	0,8	18,2	7,1	12,4	7,6	1,3	2,5	0,028
	1,6	19,5	8,9	15,9	5,4	0,8	3,2	0,024
	3,1	21,1	10,7	14,4	9,1	1,2	2,9	0,005
	6,3	18,7	12,6	17,1	8,1	1,1	3,2	0,007
	12,5	22,2	12,2	16,5	7,4	1,5	3,4	0,008
	25	20,7	11,6	16,1	9,3	1,7	5,2	0,002
	50	21,2	12,8	14,3	7,5	2,4	7,3	0,034
	100	21,8	12,0	14,0	9,4	2,8	4,7	0,010
% tế bào T Ki67+ CD8	0	11,0	4,4	2,7	11,0	4,4	2,7	0,841
	0,1	15,2	8,3	4,8	9,6	5,3	2,3	0,061
	0,2	13,5	10,9	7,8	8,2	3,8	2,9	0,014
	0,4	17,4	14,4	11,3	10,1	3,4	4,3	0,023
	0,8	20,7	19,6	13,8	14,2	4,5	2,0	0,047
	1,6	22,2	22,8	16,1	10,7	4,0	3,7	0,025
	3,1	21,8	26,7	13,6	14,5	4,4	3,0	0,099
	6,3	20,2	29,8	16,0	10,8	3,3	5,0	0,103
	12,5	21,7	29,6	15,6	10,7	4,1	3,4	0,074
	25	20,0	28,7	14,6	10,4	6,1	5,0	0,084

	50	19,0	31,4	13,5	7,6	5,1	5,5	0,114
	100	19,2	27,4	13,4	7,9	7,1	3,5	0,051
% tế bào Ki67+ Treg	0	29,7	10,2	11,3	29,7	10,2	11,3	0,920
	0,1	32,8	12,5	14,4	32,4	10,0	12,3	0,127
	0,2	33,0	14,8	19,0	30,3	8,3	13,4	0,051
	0,4	33,6	22,2	22,2	28,4	10,8	14,1	0,044
	0,8	37,0	26,3	26,3	36,7	8,5	14,4	0,191
	1,6	35,0	27,7	28,4	26,8	7,7	16,3	0,061
	3,1	38,3	30,2	27,2	33,9	9,6	17,4	0,135
	6,3	33,9	32,5	26,1	36,7	8,7	16,5	0,315
	12,5	37,3	36,8	26,2	31,2	15,1	17,2	0,125
	25	36,3	33,0	28,6	33,3	13,7	28,1	0,326
	50	37,7	33,6	24,2	32,9	21,1	29,5	0,518
	100	40,1	35,8	28,6	36,3	21,5	26,4	0,216

Thảo luận

Rõ ràng là ICOS là quan trọng đối với sự hoạt hóa tế bào T và sự cảm ứng của cả xytokin Th1 và Th2. Trong nghiên cứu này, hoạt tính in vitro của H2L5 hIgG4PE (kháng thể chủ vận kháng ICOS) đã được chứng tỏ với các thước đo sự hoạt hóa tế bào T và sự cảm ứng xytokin khác nhau. Tất cả các dấu ấn hoạt hóa tế bào T được xác định, CD25 (thụ thể mạch alpha IL-2), CD69 (dấu ấn hoạt hóa sớm) và OX-40 (dấu ấn đồng kích thích) được điều hòa tăng khi xử lý bằng H2L5 hIgG4PE kết hợp với kích thích CD3. Trong số các dấu ấn hoạt hóa được theo dõi, phần trăm tế bào T biểu hiện CD69 và OX40 được gia tăng đáng kể bằng cách xử lý bằng H2L5 hIgG4PE. CD69 là dấu ấn hoạt hóa sớm và do đó tác dụng là vượt trội trong các mẫu 24 h. CD25, dấu ấn hoạt hóa tế bào T quan trọng khác, được gia tăng khi xử lý bằng H2L5 hIgG4PE ở cả hai thời điểm, gợi ý rằng H2L5 hIgG4PE đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự hoạt hóa tế bào T. Ki67 là protein hạt nhân liên quan đến sự tăng sinh tế bào. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng với việc nhuộm màu nội bào Ki67 cho thấy rằng H2L5 hIgG4PE đã được làm bất động làm gia tăng một cách đáng kể sự tăng sinh cả tế bào T CD4 và CD8 trong điều kiện tiếp hợp TCR. Mặc dù sự tăng sinh của tế bào T điều hòa cũng được gia tăng bởi H2L5 hIgG4PE, các thay đổi là không có ý nghĩa thống kê.

Tế bào Th17 từ người đóng vai trò quan trọng trong điều hòa tính miễn dịch chống khối u [xem tài liệu: Nunez, S., et al., T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. Immunology

2013; 139: 61-71]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng ICOS có liên quan đến sự phát triển và chức năng Th17 từ người [xem các tài liệu: Kimura, A., et al., Regulator of Treg/Th17 balance. Eur. J. Immunol. 2010; 40: 1830-1835; Paulos CM et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells. Sci Transl Med. (2010) 2(55); 55ra78; Nelson, M. H., et al. The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. J Immunol, 2015; 194: 1737-1747]. Đối với việc đánh giá chức năng hiện hành của H2L5 hIgG4PE, phần lớn xytokin liên quan đến viêm và đáp ứng miễn dịch được xác định trong dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào sau khi kích thích kháng thể kháng CD3 và H2L5 hIgG4PE. H2L5 hIgG4PE gây tiết mạnh xytokin Th1, IFN- α và TNF- α và xytokin Th17, IL-17a, PBMC từ người, điều này gợi ý rằng H2L5 hIgG4PE có thể đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng chống khối u. IL-6, cùng với TGF- β , là xytokin quan trọng để cảm ứng sự phát triển của tế bào Th17 từ tế bào T nguyên vẹn. Ngược lại, IL-6 ức chế sự biệt hóa Treg được cảm ứng bởi TGF- β [Kimura, A., 2010; Korn, T., et al., IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. PNAS, 2008; 105: 18460-18465]. Trong nghiên cứu này, H2L5 hIgG4PE được mô tả là làm gia tăng sự tiết IL-6 mà có thể gia tăng hơn nữa sự phát triển của tế bào Th17. Chất chủ vận kháng thể của thụ thể tế bào T như các thành viên họ thụ thể CD28 và TNF được xác định là tạo ra đường cong đáp ứng liều hình chuông [xem các tài liệu: White, A. L., et al., Conformation of the Human Immunoglobulin G2 Hinge Imparts Superagonistic Properties to Immunostimulatory Anticancer Antibodies. Cancer Cell, 2015, 27: 138-148; Luhder, F., et al, Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists. J. Exp. Med. 2003: 955-966; Stebbings, R., et al., “Cytokine Storm” in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics J. Immunol., 2007, 179: 3325-3331; Rogers PR and Croft M, CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 Modulation of Th1/Th2 Differentiation Is Directly Dependent on the Dose of Antigen. J Immunol 2000 164:2955-2963; doi:10.4049/jimmunol.164.6.2955]. H2L5 hIgG4PE còn cho thấy đường cong đáp ứng chức năng tương tự dạng hypebon. Thông tin này là thành phần quan trọng trong việc xác định khoảng liều lượng tốt nhất của kháng thể được sử dụng để tạo ra đáp ứng được lực học tối ưu.

Nói chung, H2L5 hIgG4PE, kết hợp với sự kích thích CD3, được xác định là làm gia tăng sự hoạt hóa tế bào T, sự tăng sinh và sự cảm ứng xytokin gây viêm phù hợp với vai trò của nó như là chất hoạt hóa hiệu quả của thụ thể đồng kích thích tế bào T.

Ví dụ 6: Liên kết của kháng thể kháng ICOS

Quy trình nhân hóa (Ví dụ 3) tạo ra 36 biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà được sàng lọc để liên kết với ICOS từ khỉ Cynomolgus và người trong khi đó còn đảm bảo rằng chúng không liên kết với CD28 hoặc CTLA-4 từ người. Biến thể H2L5 được xác định vì có ái lực cao đối với ICOS từ khỉ Cynomolgus và người (lần lượt là 1,34 và 0,95nM) trong khi chứa lượng tối thiểu các đột biến ngược.

Việc thay đổi isotyp 422 H2L5 từ IgG1 thành IgG4PE không ảnh hưởng đến sự liên kết kháng nguyên của kháng thể vì H2L5 hIgG4PE có ái lực là 1,3nM đối với ICOS từ người. Mức ức chế theo nồng độ đối với liên kết ICOS/ICOS-L bởi H2L5 hIgG4PE được thể hiện trong Fig. 7.

Quy trình thử nghiệm

Liên kết giữa H2L5 hIgG4PE với ICOS từ người

Ái lực động học liên kết của kháng thể H2L5 hIgG4PE được nhân hóa được xác định bằng cách sử dụng theBIAcore T200Anti-human IgG đối với Fc2 của chip CM5 Anti-ICOS H2L5 hIgG4PE được bắt giữ trên bề mặt. Bề mặt kháng thể kháng IgG từ người được phong bế bằng mẫu đối chứng chứa hIgG1 0,1mg/mL để ngăn ngừa sự liên kết không đặc hiệu của Fc từ thỏ. ICOS từ người và khỉ Cynomolgus (Fc từ thỏ) được cho qua kháng thể bắt giữ với lượng 256 nM, 64 nM, 16 nM, 4nM và 1 nM. Chỉ dung dịch đệm được sử dụng cho các đường cong liên kết tham chiếu kép. MgCl₂ được sử dụng để tái tạo bề mặt. Quá trình vận hành được thực hiện ở 25°C. Dữ liệu được lấy khớp theo mô hình 1:1 sử dụng phần mềm đánh giá T200. Nồng độ kháng thể: 2,5µg/mL

Kết quả

Liên kết giữa H2L5 hIgG4PE với ICOS từ khỉ Cynomolgus và người

Ái lực động học liên kết của kháng thể H2L5 hIgG4PE được nhân hóa được xác định bằng cách sử dụng BIAcore T200.

Dữ liệu liên kết ICOS được điều chỉnh theo mô hình động học 1:1 sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu T200.

Ái lực liên kết của H2L5 hIgG4PE đối với ICOS từ người là 1,34nM và ICOS từ khỉ Cynomolgus là 0,95nM (xem Bảng 9). Các giá trị này là tương đương và cho thấy rằng, như được mong đợi, sự thay đổi vùng Fc của phân tử không ảnh hưởng đến việc liên kết với ICOS kháng nguyên.

Bảng 9 thể hiện Ka/Kd/KD đối với 422 (H2L5) IgG4PE được nhân hóa với ICOS từ khỉ Cynomolgus và người.

Bảng 9: Liên kết với ICOS từ người

Mẫu	Đích	Ka(1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
422 H2L5 IgG4PE	ICOS -Fc từ người	2,97E+05	3,96E-04	1,34E-09
422 H2L5 IgG4PE	ICOS-Fc từ khỉ Cynomolgus	3,91E+05	3,71E-04	9,49E-10

Thảo luận

Như được thể hiện trong ví dụ 1, dòng 422-2 ở chuột được xác định là kháng thể của chuột kháng ICOS từ người đầu tiên. Việc nhân hóa kháng thể này tạo ra 36 biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà được sàng lọc để liên kết với ICOS từ khỉ Cynomolgus và người trong khi đó vẫn đảm bảo rằng chúng không liên kết với CD28 hoặc CTLA-4 từ người. Biến thể H2L5 được xác định là có ái lực cao đối với ICOS từ khỉ Cynomolgus và người (lần lượt là 1,34 và 0,95nM) trong khi chứa lượng tối thiểu các đột biến ngược.

Việc thay đổi isotyp từ IgG1 thành IgG4PE không ảnh hưởng đến liên kết của kháng thể đối với ICOS.

Ví dụ 7: Liên kết của H2L5 hIgG4PE với tế bào T được hoạt hóa từ người

PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị thử nghiệm

Phân lập CD3 âm:

Tế bào T CD3+ được phân lập âm bằng kit làm giàu tế bào T từ người Stemcell Rosette Sep

Làm giàu tế bào T từ người Rosette Sep: 100ml máu tươi toàn phần được lấy bằng ống tiêm được phủ trong natri heparin lỏng (Sagent nồng độ cuối 10 IU/mL). Máu từ mỗi ống thu gom được kết hợp vào bình trong đó 50 μ L hỗn dịch làm giàu tế bào T từ người Rosette Sep được bổ sung vào mỗi ml máu. (5ml/100ml máu người cho). Máu toàn phần/hỗn dịch kháng thể Rosette Sep được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT). Máu/hỗn dịch kháng thể Rosette Sep sau đó được pha loãng 1:1 với 1x dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS) + 2% FBS (huyết thanh thai bò). FBS cho thể tích cuối là 200mL. Tiếp theo, 25ml máu đã được pha loãng/hỗn dịch kháng thể sau đó được phân lớp trên 15ml gradien Ficoll trong ống Sepmat (tổng cộng 8 ống cho mỗi người cho). Các ống Sepmat đã được tải sau đó được ly tâm ở 1200 x g trong 20 phút RT có hãm. Lớp đỉnh huyết tương xuống đến mặt phân cách tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được lấy ra bằng pipet và được loại bỏ. Huyết tương còn lại và mặt phân cách lớp đệm được gạn từ ống Sepmat vào ống ly tâm hình nón loại 50mL (4 ống tất cả). Các ống được nạp PBS + 2% FBS đến đỉnh 50mL. Tế bào được ly tâm ở 400 x g trong 10 phút ở RT. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Các hạt pellet từ mỗi người cho sau đó được kết hợp vào một ống hình nón dung tích 50mL, tạo huyền phù lại hạt pellet trong tổng thể tích là 50mL PBS + 2% FBS. Tế bào được ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở RT. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ và hạt tế bào được tạo huyền phù lại trong 2ml môi trường RPMI hoàn chỉnh (RPMI 1640 + 10% FCS + 1mM natri pyruvat + 2mM L-glutamin + penicillin 100U/mL + streptomycin 100 μ g/mL). Tế bào CD3 được thu hồi được đếm trên thiết bị ViCell và được pha loãng tiếp đến $1,2 \times 10^6$ tế bào/mL. 1×10^6 tế bào đã thu hồi được nhuộm CD3 PE-Cy7 để khẳng định chất lượng phân lập tế bào T.

Tế bào T CD3+ được phân lập âm bằng kit phân lập tế bào T nguyên vẹn Invitrogen

Phân lập PBMC: Nói chung, 100mL máu tươi toàn phần được gom từ mỗi người cho bằng ống tiêm được phủ trong natri heparin lỏng (Sagent nồng độ cuối 10 IU/mL). Máu được pha loãng (1:1) đến thể tích cuối là 200mL bằng PBS và 2%FBS. Hai mươi lăm (25)ml máu đã pha loãng được phân lớp trên 15ml gradien Ficoll trong ống Sepmat (tổng cộng 8 ống cho mỗi người cho). Ống Sepmat đã được nạp sau đó được ly tâm ở 1200 x g trong 20 phút ở RT có hãm. Lớp đỉnh chứa huyết tương xuống đến mặt phân cách PBMC được lấy ra bằng pipet và được loại bỏ. Huyết tương còn lại và mặt phân cách lớp đệm được gạn từ ống Sepmat vào ống ly tâm hình nón dung tích 50mL (4 ống tất cả). Các ống được nạp PBS + 2% FBS đến đỉnh 50ml. Tế bào được ly tâm ở 400 x g trong 10 phút ở RT. Dịch nổi

bề mặt được loại bỏ. Hạt pellet từ mỗi người cho sau đó được kết hợp vào một ống hình nón dung tích 50mL và được tạo huyền phù lại trong tổng thể tích 50mL PBS + 2% FBS. Tế bào được ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở RT. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ, và hạt tế bào được tạo huyền phù lại trong thể tích tùy ý chứa dung dịch đệm phân lập (phụ thuộc kích thước của hạt pellet tế bào) được tạo ra trong kit phân lập tế bào T nguyên vẹn Invitrogen. PBMC đã được phân lập sau đó được đếm trên thiết bị ViCell và được đưa đến nồng độ cuối là 1×10^8 tế bào/mL trong dung dịch đệm phân lập.

Quá trình phân lập tế bào T từ người bằng nguyên vẹn bằng hạt Invitrogen Dynabead Untouched: 2×10^8 PBMC đã được phân lập (2mL), 400 μ L FBS và sau đó 400 μ L kháng thể hỗn hợp từ kit phân lập tế bào T nguyên vẹn Invitrogen được bổ sung vào mỗi ống dung tích 15mL và được ủ trong 20 phút ở 4°C. Tế bào được rửa bằng 10ml dung dịch đệm phân lập và được ly tâm ở 350 x g trong 8 phút ở 4°C. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ, và hạt pellet được tạo huyền phù lại trong 2ml dung dịch đệm phân lập. Tiếp theo, 2ml hạt Depletion Dynabead được rửa sơ bộ được bổ sung vào mỗi ống. Tế bào được ủ với hạt trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng kèm quay và khuấy nhẹ. Sau khi ủ hạt, 10ml dung dịch đệm phân lập được bổ sung vào và huyền phù tế bào/hạt được lắc bằng pipet lên và xuống 10 lần. Ống được đặt vào từ trường trong 2 phút ở nhiệt độ trong phòng. Không làm xáo trộn các hạt đã nhiễm từ, dịch nổi bề mặt chứa tế bào T nguyên vẹn được thu gom. Các hạt được rửa 1 lần bằng 10ml dung dịch đệm phân lập và được đặt vào từ trường thêm 2 phút ở nhiệt độ trong phòng, và dung dịch đệm được làm sạch hạt được thu gom. Tế bào thu được được ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở RT. Dịch nổi bề mặt được loại bỏ, và hạt pellet tế bào được tạo huyền phù lại trong thể tích tùy ý của môi trường hoàn chỉnh RPMI tùy thuộc kích thước hạt pellet tế bào (2 đến 35mL). Tế bào CD3⁺ được thu hồi sau đó được đếm trên thiết bị ViCell và được đưa đến nồng độ $1,2 \times 10^6$ tế bào/mL trong môi trường hoàn chỉnh RPMI.

Nhuộm màu kháng định CD3: 1×10^6 tế bào đã được thu hồi được nhuộm bằng 5 μ l isotyp PE-Cy7 kháng CD3 hoặc 5 μ l IgG1 Pe-Cy7 trong 40 phút ở 4°C trong bóng tối. Sau đó, tế bào được rửa hai lần trong PBS trong nước đá với 0,1% Tween20, ly tâm ở 400xg trong 5 phút ở 4°C. Tế bào đã được nhuộm được tạo huyền phù lại trong 1% formaldehyt và được ủ ở 4°C trong 20 phút trong bóng tối. Sau đó, tế bào được rửa hai lần trong PBS trong nước đá với 0,1% Tween20, ly tâm ở 400xg trong 5 phút ở 4°C, và được tạo huyền phù lại trong

275 μ L PBS với 0,1% Tween20. Tế bào đã cố định được cất giữ ở 4°C trong bóng tối cho đến khi việc đếm tế bào theo dòng được thực hiện để xác nhận chất phân lập tế bào T.

Hoạt hóa tế bào T từ người đã được phân lập:

Các bình T75 được nạp 4ml 1 μ g/ml CD3/CD28 trong PBS trong 2 giờ ở 37°C. Bình được rửa hai lần bằng 12ml PBS. 30x10⁶ tế bào trong 25ml môi trường hoàn chỉnh RPMI được bổ sung vào mỗi bình T75. Tế bào được ủ trong 48 giờ ở 37°C, 5% CO₂ để cho phép sự hoạt hóa xảy ra.

Liên kết kháng thể kháng ICOS (H2L5 hIgG4PE):

Liên kết H2L5 hIgG4PE được đánh giá trong cả tế bào T CD3+ nguyên vẹn và được hoạt hóa. Chuẩn độ tám điểm từ 0,00128 đến 100 μ g/mL H2L5 hIgG4PE với các dung dịch pha loãng 5 lần được sử dụng.

Tế bào T CD3+ nguyên vẹn và/hoặc được hoạt hóa được tạo huyền phù lại trong PBS và 0,1% BSA (Dung dịch đệm FACS) bao gồm dung dịch phong bế FcR từ người với lượng 2x10⁶ tế bào/mL (5 μ l dung dịch phong bế FcR + 950 μ l dung dịch đệm FACS trên mỗi 1mL). Ở nồng độ 2x10⁵ tế bào/lỗ, 100 μ l tế bào được cho vào 2mL đĩa thử nghiệm phong bế loại 96 lỗ và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Trong khi ủ, việc chuẩn độ kháng thể liên kết, kháng thể kháng ICOS (H2L5 hIgG4PE) hoặc kháng thể đối chứng isotyp IgG4 được chuẩn bị với nồng độ gấp đôi (2x). Sau khi ủ dung dịch phong bế FcR, 100 μ l mỗi lỗ chứa kháng thể liên kết có nồng độ 2x được bổ sung vào 100 μ l mỗi lỗ chứa tế bào T phong bế Fc để thu được 1x nồng độ cuối của kháng ICOS (H2L5 hIgG4PE) hoặc kháng thể đối chứng isotyp IgG4 từ nồng độ cuối 0,00128 đến 100 μ g/mL. Tế bào được ủ với kháng thể trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ liên kết, tế bào được rửa hai lần trong 1ml dung dịch đệm FACS, ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Nhuộm màu tế bào T nguyên vẹn hoặc được hoạt hóa sau khi liên kết kháng thể kháng ICOS (H2L5 hIgG4PE):

Tế bào được nhuộm để đếm tế bào theo dòng bằng hỗn dịch sau đây:

Hỗn dịch nhuộm:

Kháng thể	Thể tích mỗi lỗ (μ l)	Thể tích đối với 110 (μ l)
-----------	-------------------------------	------------------------------------

PE từ chuột kháng CD4 từ người	5	550
APC từ chuột kháng CD8 từ người	5	550
FITC từ dê kháng chuỗi nhẹ Kappa IgG từ người	10	1100

Hỗn dịch isotyp:

Kháng thể	Thể tích mỗi lỗ (μl)	Thể tích đối với 110 (μl)
PE từ chuột kháng CD4 từ người	5	550
APC từ chuột kháng CD8 từ người	5	550
FITC IgG1, mẫu đối chứng isotyp Kappa	10	1100

Tế bào T phong bế Fc nguyên vẹn hoặc được hoạt hóa được tạo huyền phù lại trong 80μL dung dịch đệm FACS sau khi ủ liên kết với H2L5 hIgG4PE hoặc kháng thể đối chứng. 20μl mỗi lỗ chứa hỗn dịch nhuộm màu hoặc isotyp được bổ sung vào mỗi lỗ. Tế bào được nhuộm trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Sau khi ủ nhuộm màu, tế bào được rửa hai lần trong 1ml dung dịch đệm FACS, ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Cố định tế bào đã nhuộm:

Tế bào được tạo huyền phù lại trong 500μL formaldehyt 1% (10ml Formaldehyt có nồng độ 16x + 150ml PBS 1x) và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa hai lần bằng 1mL dung dịch đệm FACS, ly tâm ở 400 x g trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hạt pellet được tạo huyền phù lại trong 265μL dung dịch đệm FACS và được chuyển vào đĩa tròn đáy bằng loại 96 lỗ. Tế bào được cất giữ ở 4°C trong bóng tối cho đến khi phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Phương pháp đếm tế bào theo dòng:

Phương pháp đếm tế bào theo dòng được thực hiện trên FACS Fortessa X20 hoặc FACS Canto II bằng cách sử dụng phần mềm FACSDiva (Version 8.0). Sự hiệu chỉnh được thực hiện ở thời điểm tiếp nhận thông tin sử dụng hạt eBioscience Ultracomp được nhuộm và phần mềm hiệu chỉnh trong FACSDiva.

Phân tích dữ liệu

Việc tiếp nhận thông tin dữ liệu và sự hiệu chỉnh được thực hiện trên thiết bị BD FACS, LSR Fortessa X-20 hoặc FACS Canto II sử dụng phần mềm BD Diva (ver. 8.0). Phân tích dữ liệu sử dụng phần mềm Flow Jo (ver.10.0.8r1). Kết quả được báo cáo dưới dạng cả MFI (Cường độ huỳnh quang trung bình) và phần trăm tế bào dương đối với việc nhuộm màu FITC chuỗi nhẹ IgG kappa từ người trong tổng số các tế bào sống sót hoặc quần thể ban đầu thích hợp. EC50 được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Graphpad Prism 5 (ver. 5.04) với sự hồi quy không tuyến tính dữ liệu được biến đổi ($X=(\log(X))$ sử dụng độ dốc biến thiên với 4 thông số ($\log(\text{Chất chủ vận})$ so với đáp ứng -- độ dốc biến thiên).

Kết quả

Quá trình phân lập tế bào T từ máu tươi toàn phần từ người sử dụng Kit làm giàu CD 3 Rosette Sep hoặc kit phân lập tế bào T nguyên vẹn Dynabead được xác nhận bằng cách nhuộm màu với PeCy7 kháng CD3. Những người cho có trong khoảng từ 68% và 97% dương tính đối với tế bào CD3. Quần thể tế bào CD4+ và CD8+ được hoạt hóa bằng kháng thể kháng CD3/kháng CD28 tạo ra đường cong phụ thuộc nồng độ H2L5 hIgG4PE khi được đánh giá đối với việc nhuộm màu FITC chuỗi nhẹ kháng Kappa IgG 1 từ người. Đường cong liên kết H2L5 hIgG4PE được thể hiện dưới dạng cả phần trăm dương tính FITC chuỗi nhẹ Kappa kháng IgG1 từ người và cường độ huỳnh quang trung bình FITC (MFI). Tế bào T được ủ với kháng thể đối chứng isotyp IgG4 không tạo ra đường cong phụ thuộc nồng độ khi được đánh giá đối với việc nhuộm màu FITC chuỗi nhẹ kháng Kappa IgG1 từ người. Tế bào CD4+ hoặc CD8+ nguyên vẹn không tạo ra các đường cong hoàn chỉnh; tuy nhiên, có phụ thuộc nồng độ gia tăng quan sát được từ 0,1 µg/mL đến 100 µg/mL.

Giá trị trung bình (phạm vi) EC50 lần lượt là 1,04 µg/mL (0,628-1,31 µg/mL) đối với MFI CD4+ FITC và 0,652 µg/mL (0,27-0,74 µg/mL) đối với MFI CD8+FITC. Giá trị trung bình (phạm vi) EC50 là 0,834 µg/mL (0,45-0,965 µg/mL) đối với phần trăm CD4+ dương tính FITC chuỗi nhẹ IgG Kappa và 0,583 µg/mL (0,371-1,23 µg/mL) đối với phần trăm CD8+ FITC chuỗi nhẹ IgG Kappa. (Bảng 10)

Bảng 10: Tóm tắt giá trị EC50 liên kết 422 H2L5 hIgG4PE đối với tế bào T từ người được hoạt hóa

Người cho số (#)	Tế bào T CD4 được hoạt hóa		Tế bào T CD8 được hoạt hóa	
	MFI	Phần trăm dương tính	MFI	Phần trăm dương tính
1124F36	0,628	0,45	0,564	0,619
1149M52	1,31	0,882	0,74	0,547
1173F42	0,636	0,612	0,27	0,371
1123F59	1,04	0,853	Không được thực hiện	Không được thực hiện
1141F45	1,27	0,965	Không được thực hiện	Không được thực hiện
2100M39	Không hiệu chỉnh đường cong	0,814	Không hiệu chỉnh đường cong	1,23
191F39	Không hiệu chỉnh đường cong	Không hiệu chỉnh đường cong	Không hiệu chỉnh đường cong	Không hiệu chỉnh đường cong
1155F49	Không hiệu chỉnh đường cong	Không hiệu chỉnh đường cong	Không được thực hiện	Không được thực hiện
1156F64	Không hiệu chỉnh đường cong	Không hiệu chỉnh đường cong	Không được thực hiện	Không được thực hiện
Trung bình	1,04	0,834	0,652	0,583
Giá trị trung bình	0,977	0,763	0,525	0,692
Độ lệch chuẩn	0,331	0,193	0,237	0,374

Thảo luận

Nghiên cứu này chứng tỏ rằng H2L5 hIgG4PE (kháng thể chủ vận kháng ICOS) đã liên kết với thụ thể ICOS trên tế bào T hoạt hóa từ người cho khỏe mạnh. Liên kết giữa H2L5 hIgG4PE với bề mặt tế bào của tế bào T được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đối với chuỗi nhẹ IgG kappa từ người được đánh dấu bằng FITC.

Việc phân lập thành công tế bào T CD3+ được xác nhận thông qua phương pháp đếm tế bào theo dòng với việc nhuộm màu Pe-Cy7 kháng CD3. Chín trong số mười người cho tạo ra nhiều hơn 89% tế bào T CD3+ sau khi phân lập. Tuy nhiên, người cho số 2100M39 chỉ có 68,6% CD3+ sau khi phân lập. Nguyên nhân của sự giảm độ tinh khiết trong quá trình phân lập tế bào T từ người cho số 2100M39 là chưa xác định được. Giá trị

EC50 được tạo ra từ quần thể CD4⁺ và CD8⁺ được tạo công từ người cho số 2100M39 không được cho là bất thường và nằm trong giá trị trung bình được tổng hợp.

EC50 liên kết được xác định đối với H2L5 hIgG4PE trong tế bào T từ người đã được phân lập âm. Đường cong liên kết được tạo ra khi tế bào T đã được phân lập được hoạt hóa bằng cách cho tiếp xúc trong 48 h với 1 µg/mL kháng thể CD3/CD28 gắn kết đĩa. Cả phần trăm tế bào dương FITC chuỗi nhẹ IgG kappa và dữ liệu MFI FITC từ tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ được hoạt hóa đều được xem xét trong phân tích thông kê. Giá trị EC50 CD4⁺ trung bình là tương tự khi được tính theo phần trăm tế bào dương FITC hoặc MFI FITC, lần lượt là 1,04 và 0,834 µg/mL. Giá trị EC50 CD8⁺ trung bình cũng là tương tự khi được tính theo phần trăm FITC dương tính tế bào hoặc MFI FITC, lần lượt là 0,652 và 0,583 µg/mL.

Tế bào T được ủ với mẫu đối chứng isotyp IgG4 PE không tạo ra sự gia tăng phụ thuộc nồng độ trong liên kết FITC chuỗi nhẹ kháng IgG kappa từ người bất kể phương pháp phân tích được sử dụng, MFI hoặc phần trăm tế bào dương.

Đường cong hoàn chỉnh không thể thu được từ tế bào T được phân lập âm, nguyên vẹn hoặc không được hoạt hóa trong khoảng từ 0,00128 đến 100 µg/mL H2L5 hIgG4PE được kiểm tra. Tuy nhiên, mức gia tăng phụ thuộc nồng độ đối với liên kết được quan sát từ người cho từ 0,1 đến 100 µg/mL H2L5 hIgG4PE. EC50 có thể không được tính vì đường cong từ tế bào T nguyên vẹn là không hoàn chỉnh. Sự thất bại của H2L5 hIgG4PE trong việc liên kết ở thấp nồng độ với tế bào nguyên vẹn hoặc không được hoạt hóa được cho là vì ICOS chỉ được biểu hiện yếu trên tế bào TH17 nghỉ, tế bào T trợ giúp có nang (TFH) và T điều hòa (Treg). Sự gắn kết TCR và sự hoạt hóa là cần thiết để biểu hiện ICOS. Do đó, có rất ít thụ thể ICOS được biểu hiện trên tế bào nguyên vẹn hoặc không được hoạt hóa, và do đó liên kết ở mức độ tối thiểu với H2L5 hIgG4PE.

Ví dụ 8: Kết quả TK/PD từ nghiên cứu xác định khoảng liều (DRF) ở khỉ Cynomolgus

Để xác định đặc trưng in vivo của H2L5 hIgG4PE ở các loài liên quan đích, nghiên cứu xác định khoảng liều được thực hiện ở khỉ Cynomolgus. Nghiên cứu này thử nghiệm 3 mức liều (0,3, 3 và 30mg/kg) ngoài nhóm đối chứng là chất dẫn thuốc. Đó là liều lặp lại với liều thứ hai được sử dụng 14 ngày sau liều đầu tiên. Một con đực và một con cái được kiểm tra trong mỗi nhóm. H2L5 hIgG4PE thể hiện sự gia tăng phụ thuộc liều C_{max} (µg/mL) và AUC (µg.h/mL) trong 3 liều khác nhau mà được thử nghiệm. Ở cả ba mức liều, kháng

thể được phát hiện trong huyết tương trong hai tuần sau liều đầu tiên (Fig. 12A). Kháng thể kháng H2L5 hIgG4PE được phát hiện ở cả 3 con khỉ chỉ sau một liều, cả hai con được cho sử dụng liều 0,3mg/kg cũng như con cái được cho sử dụng liều 3mg/kg. Kháng thể kháng H2L5 hIgG4PE tương ứng với nồng độ trong huyết tương được làm giảm sau khi sử dụng liều thứ hai cho các con vật này (Fig. 12B). Bốn tám giờ sau liều thứ hai tất cả các con vật được làm an tử để thu gom mô để phân tích hoạt tính dược lực học và phân tích mô bệnh học.

Sự chiếm giữ (RO) thụ thể H2L5 hIgG4PE được xác định ở tế bào T CD4+ từ lá lách và hạch bạch huyết trong nách của tất cả các con vật trong nghiên cứu. Sự gia tăng phụ thuộc liều của liên kết H2L5 hIgG4PE được quan sát qua các mức liều được thử nghiệm trong cả hai mô (Fig. 13).

Sự chiếm giữ thụ thể cũng được xác định trên tế bào T CD4+ từ máu ngoại vi của khỉ trong nghiên cứu. Máu được lấy ra ở 5 thời điểm (ngày 1 (trước khi sử dụng liều), ngày 3, ngày 8, ngày 15 (trước khi sử dụng liều thứ hai) và ngày 17). Hai phép đo khác nhau được sử dụng trong thử nghiệm này để xác định sự chiếm giữ thụ thể (RO). Đầu tiên là dạng thử nghiệm “thụ thể tự do” trong đó, liên kết của kháng ICOS mAb được sử dụng để phát hiện tế bào theo dòng được xác định với sự có mặt hoặc không có mặt H2L5 hIgG4PE mà được thể hiện để cạnh tranh cho liên kết ICOS. Do đó, sự không có mặt của tín hiệu kháng ICOS bởi FACS là sự thay thế đối với thụ thể bị chiếm giữ bởi H2L5 hIgG54PE và ngược lại, sự có mặt của tín hiệu kháng ICOS thể hiện “thụ thể tự do” mà không gắn kết với H2L5 hIgG4PE. Fig. 14-A thể hiện rằng thụ thể không ICOS giảm theo cách phụ thuộc liều và phụ thuộc thời gian. Hai con khỉ (250 và 300) cho thấy tín hiệu “thụ thể tự do” mà không thể giải thích được, và có thể là do sự sản sinh kháng thể kháng H2L5 hIgG4PE trong các con khỉ này. Ngoài ra, RO còn được xác định trong tế bào CD4+ máu ngoại vi bằng thử nghiệm tương tự được sử dụng trong lá lách và hạch bạch huyết được mô tả trên đây. Liều 0mg/kg được cho là không có RO theo cách đọc này (Fig. 14-B). Đáng chú ý là, một số con khỉ ở mức liều 3,0 và 30mg/kg thể hiện sự gia tăng phụ thuộc thời gian về số tế bào CD4+ gắn kết H2L5 hIgG4PE trong thời gian điều trị. Cụ thể, con vật 350 thể hiện mức gia tăng (> 5 lần) về các tế bào CD4+ tuần hoàn gắn kết thuốc giữa ngày 3 và 17 (Fig. 14-B). Có khả năng sự gia tăng về số lượng tế bào CD4+ ICOS+ này có thể là do sự tăng sinh được cảm ứng bởi H2L5 hIgG4PE của quần thể này.

Ví dụ 9: H2L5 hIgG4PE cảm ứng sự thay đổi truyền tín hiệu nội bào đáp ứng liên kết

Chuẩn bị thử nghiệm

Dòng tế bào

Tế bào Ba/F3-ICOS thu được từ INSERM (Paris, France). Tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10ng/mL IL-3 từ chuột tái tổ hợp (R&D Systems, Minneapolis, MN), và 1mg/mL Gentamicin (ThermoFisher, Waltham, MA) ở 37°C trong thiết bị ủ được tạo độ ẩm trong môi trường 5% CO₂.

Quy trình thử nghiệm

Chuỗi kháng thể truyền tín hiệu nội bào

Dịch thủy phân protein được thử nghiệm bằng Kit thử nghiệm chuỗi kháng thể truyền tín hiệu nội bào PathScan® (Cell Signaling Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách tóm tắt, dịch thủy phân từ tế bào Ba/F3-ICOS được xử lý bằng IgG4-PE (20µg/mL) hoặc H2L5 hIgG4PE (0,2, 2, hoặc 20µg/mL) trong 1, 6, 24, và 48 giờ được pha loãng đến 1µg/µL trong chuỗi dung dịch đệm pha loãng thử nghiệm và được ủ qua đêm trên chuỗi kháng thể ở 4°C. Hình ảnh các chuỗi được bắt giữ bằng cách sử dụng phần mềm tạo ảnh Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết enzym Phospho-AKT (ELISA)

Quá trình phosphoryl hóa của AKT được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện cỡ trung bình (Meso Scale Discovery - MSD) Phospho(Ser473)/Kit dịch phân giải tế bào toàn phần Akt tổng và kit dịch phân giải tế bào toàn phần Phospho-Akt (Thr308) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào được cấy với mật độ tế bào 0,25 x 10⁶ tế bào/lỗ vào đĩa đáy chữ U loại 96 lỗ (BD Falcon) trong môi trường nuôi cấy môi trường thích hợp (100µL/lỗ). Tế bào được xử lý trong 1, 2, 4, 6, 24, hoặc 48 giờ với kháng thể đối chứng (IgG4 PE), kháng thể được làm bất hoạt Fc kháng ICOS IgG1, hoặc H2L5 hIgG4PE ở 7 nồng độ khác nhau bằng cách sử dụng các dung dịch pha loãng 3 lần (khoảng liều: 20,0 – 0,03µg/mL) trong hai lỗ giống nhau. Đối với mỗi thử nghiệm sử dụng Kit dịch phân giải tế bào toàn phần Phospho-Akt (Thr308), tế bào được xử lý bằng một nồng độ duy nhất của cả ba kháng thể (10µg/mL) trong ba lỗ giống nhau. Hàng đáy của mỗi đĩa loại 96 lỗ chứa mẫu đối chứng không tế bào (hai lỗ trống giống nhau) và tế bào mà không được xử lý bằng

kháng thể nào. Sau khi xử lý, tế bào được dung giải với 30 μ L dung dịch đệm phân giải trong nước đá chứa chất ức chế proteaza và phosphatasa, được ủ trên đá trong 30 phút, và sau đó 25 μ L dịch thủy phân được chuyển vào đĩa ELISA để ủ qua đêm ở 4°C.

Phân tích dữ liệu

Phân tích bằng phép đo tỷ trọng của chuỗi kháng thể truyền tín hiệu nội bào

Phân tích bằng phép đo tỷ trọng được thực hiện để xác định mức tỷ trọng kết hợp của vết trong chuỗi kháng thể. Tỷ trọng của mỗi vết được chuẩn hóa theo giá trị trung bình của mẫu đối chứng dương trên chuỗi (công thức = lỗ mẫu / giá trị trung bình của các mẫu đối chứng dương) và được dựng đồ thị bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA).

Phân tích dữ liệu MSD ELISA

Phần trăm phosphoprotein được tính cho mỗi lỗ bằng cách sử dụng công thức tính sau đây: % Phosphoprotein = ((2 x Tín hiệu Phospho)/(Tín hiệu Phospho + Tổng tín hiệu protein)) x 100. Giá trị này sau đó được chuẩn hóa theo giá trị của tế bào không được xử lý ở mỗi thời điểm và được dựng đồ thị là “% đối chứng” theo Microsoft Excel 2007.

Kết quả

Các nghiên cứu trên đây chứng tỏ rằng việc xử lý bằng H2L5 hIgG4PE gia tăng mức phospho-AKT (S473) trong tế bào Ba/F3-ICOS với đáp ứng tối đa quan sát được trong khoảng 30-40 phút sau khi tiếp xúc với kháng thể. Trong trường hợp này, mức phospho-AKT được xác định ở các thời điểm sau đó đến xác định xem liệu mức độ phosphoryl hóa được gia tăng có ổn định sau vài ngày hay không. Ngoài ra, việc điều hòa các quá trình truyền tín hiệu nội bào khác bởi sự hoạt hóa ICOS được đánh giá. Đối với tế bào Ba/F3-ICOS, mức phospho-AKT (S473) được gia tăng với việc xử lý bằng H2L5 hIgG4PE so với tế bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp IgG4-PE sau một và sáu giờ xử lý, nhưng tác dụng này bị mất sau 24 giờ (Fig. 15). Đáng chú ý là, tác dụng tương tự quan sát được khi tế bào được xử lý bằng kháng thể kháng ICOS trong đó vùng Fc của kháng thể được làm bất hoạt. Mức gia tăng phospho-AKT (T308) còn quan sát được ở tế bào được xử lý bằng H2L5 hIgG4PE và kháng thể được làm bất hoạt Fc kháng ICOS IgG1 so với tế bào được xử lý bằng kháng thể đối chứng isotyp IgG4-PE (Fig. 15) sau một giờ xử lý và ổn định đến 48 giờ mà là thời điểm cuối được đo. Hai phospho-protein khác,

vùng ngược hướng của AKT, Glycogen Synthaza Kinaza 3 Alpha (GSK3 α) và protein ribosom S6, cũng được gia tăng thấp nhất do sự hoạt hóa ICOS, nhưng tác dụng này không nhanh như tác dụng được quan sát với với phospho-AKT. Dịch thủy phân protein còn được phân tích bằng cách sử dụng chuỗi kháng thể mà xác định sự phosphoryl hóa hoặc sự phân cắt 18 protein tham gia truyền tín hiệu nội bào. Sử dụng phương pháp này, chỉ ba protein thể hiện mức tăng nhẹ mức phosphoryl hóa do sự hoạt hóa ICOS: phospho-AKT (S473), phospho S6 (S235/236), và phospho-SAPK/JNK (T183/Y185).

Để xác định các thay đổi đối với sự phosphoryl hóa AKT bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm mà cho phép xác định định tính một cách trực tiếp, tế bào Ba/F3-ICOS được xử lý bằng khoảng liều của kháng thể đối chứng (IgG4 PE), kháng thể được làm bất hoạt Fc kháng ICOS IgG1, hoặc H2L5 hIgG4PE theo thời gian và được theo dõi bằng ELISA. Các mức phospho-AKT (S473) gia tăng là cả phụ thuộc liều và phụ thuộc thời gian trong tế bào được xử lý bằng kháng thể được làm bất hoạt Fc kháng ICOS IgG1 hoặc tế bào được xử lý bằng H2L5 hIgG4PE. Như đã được quan sát, sự hoạt hóa phospho-AKT (S473) tối đa xảy ra sau 1 giờ xử lý. Tín hiệu Phospho giảm nhẹ sau 2 giờ và ổn định đến 6 giờ nhưng rất cuộc bị mất sau 24 giờ. ELISA mà xác định mức phospho-AKT (T308) cũng được thử nghiệm ở đây nhưng không thể được quan sát thấy sự hoạt hóa có thể lặp lại với kit ELISA này.

Thảo luận

Chuỗi dẫn truyền tín hiệu AKT có thể được hoạt hóa bởi thụ thể tyrosin kinaza, integrin, thụ thể tế bào B và T, thụ thể xytokin, thụ thể gắn kết protein G và các yếu tố kích thích khác mà cảm ứng sản sinh phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphat (PIP3) bằng PI3K [Carnero, 2008]. Các lipid này có tác dụng làm vị trí tiếp giáp màng huyết tương cho Akt và chất hoạt hóa ngược hướng PDK1 của nó. Ở màng, PDK1 phosphorylat hóa AKT ở Thr308 dẫn đến sự hoạt hóa một phần Akt [Alessi, 1996]. Sự phosphoryl hóa của Akt ở Ser473 bằng mTORC2 kích thích toàn bộ hoạt tính enzym [Sarbasov, 2005].

ICOS đóng vai trò quan trọng trong chức năng của tế bào hiệu lực được hoạt hóa và tế bào T CD4⁺ điều hòa bằng cách thúc đẩy sự sống sót, sự tăng sinh và tế bào T ghi nhớ. Do vai trò quan trọng của nó trong việc duy trì sự hoạt hóa và chức năng hiệu lực tế bào T, nên việc hướng đích ICOS với chất chủ vận kháng thể có thể là cách tiếp cận tin cậy để gia tăng tính miễn dịch chống khối u. Đối với nghiên cứu này, các tác giả sáng chế quan sát

thấy sự hoạt hóa ICOS bởi H2L5 hIgG4PE gây ra sự thay đổi quá trình phosphoryl hóa AKT trong tế bào Ba/F3-ICOS. Sau đó, dòng protein cùng hướng của AKT, như GSK3 α (cơ chất trực tiếp của AKT) và protein ribosom S6 cũng được phosphoryl hóa. Dữ liệu này phù hợp với nghiên cứu được thực hiện gần đây với hệ mô hình này, và phù hợp với các dữ liệu được công bố khác [Fos, 2008].

Ví dụ 10: Chức năng tác dụng của 2L5 hIgG4PE tan riêng rẽ và kết hợp với kháng thể kháng PD1 và kháng CTLA-4 trong thử nghiệm PBMC từ người

Chuẩn bị thử nghiệm

Phân lập PBMC nguyên thủy từ người

Máu tươi thu được từ người hiến máu của trung tâm GSK Health Center và được pha loãng 1:1 bằng môi trường 10% RPMI1640 không chứa đỏ phenol. Máu đã pha loãng được phân lớp trên mặt trên của môi trường đặc trong ống hình nón Uni-Sep Max dung tích 50ml và ly tâm ở 400xg trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng có hãm (BREAK OFF). Lớp đơn nhân màu trắng thu được (lớp đệm) được chiết một cách cẩn thận vào ống hình nón mới dung tích 50mL thông qua màng lọc tế bào cỡ 100 μ M. Thể tích tương đương của môi trường 10% RPMI1640 không chứa đỏ phenol được bổ sung vào lớp đệm và được ly tâm ở 300xg trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hạt pellet tế bào được tạo huyền phù lại trong 10ml dung dịch phân giải hồng huyết cầu (Sigma Aldrich) và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tế bào được rửa một lần bằng môi trường và được ly tâm như đã mô tả. Thể tích được gia tăng đến 40ml bằng môi trường 10% RPMI1640 không chứa đỏ phenol và tế bào được đếm bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào Vicell và máy phân tích tỷ lệ sống sót (Beckman Coulter).

Cảm ứng tế bào hình cây chưa trưởng thành (iDC) thu được từ bạch cầu đơn nhân

Bạch cầu đơn nhân từ người được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp liên kết với nhựa. Một cách vắn tắt, 20 triệu PBMC mới được phân lập được nuôi cấy trong bình nuôi cấy mô T-75 trong môi trường AIM-V (Thermo Fisher) trong 3 giờ. Tế bào mà không liên kết với nhựa được rửa. Bạch cầu đơn nhân liên kết được nuôi cấy trong thiết bị ủ ở 37°C 5% CO₂ trong môi trường AIM-V được bổ sung 1000U/ml GM-CSF từ người (Calt#300-03, PeproTech) và 500 U/ml IL-4 từ người (cat#200-04). Sau 7-10 ngày, tế bào iDC được thu gom để cùng nuôi cấy với tế bào T từ những người cho khác nhau trong thử nghiệm phản ứng tế bào bạch huyết hỗn hợp ngoại sinh.

Phân lập tế bào T nguyên thủy từ người một cách trực tiếp từ máu

Tế bào T từ người được phân lập một cách trực tiếp từ máu người tươi bằng cách sử dụng hỗn dịch giàu tế bào T từ người (Kỹ thuật tế bào gốc). Hỗn dịch giàu tế bào T từ người RosetteSep (50 μ L/mL) được bổ sung vào máu toàn phần và lắc hỗn hợp. Sau 20 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, thể tích tương đương của PBS + 2% FBS được bổ sung kèm theo khuấy nhẹ. Mẫu đã pha loãng được phân lớp trên mặt trên của môi trường đặc và được ly tâm trong 20 phút ở 1200 x g ở nhiệt độ trong phòng có hãm. Tế bào được làm giàu từ môi trường đặc: mặt phân cách huyết tương được rút một cách cẩn thận vào ống hình nón mới. Tiếp theo, hồng huyết cầu được dung giải bằng dung dịch đệm hồng huyết cầu (Sigma Aldrich) và tế bào đã được làm giàu được rửa bằng PBS + 2% FBS hai lần. Sau đó, tế bào T được tạo huyền phù lại trong 40ml PBS + 2% FBS và được đếm bằng thiết bị đếm tế bào Vi-Cell.

Quy trình thử nghiệm

Thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC từ người

PBMC từ người mới được phân lập được kích thích sơ bộ bằng hạt Dynabead gắn tế bào T CD3/CD28 với tỷ lệ hạt so với tế bào là 1:20 trong bình nuôi cấy mô T-75 trong môi trường AIM-V được bổ sung 100ng/ml MCSF và 100IU/ml IL-2 (PeproTech) ở 37°C. Sau 48 giờ, các hạt kích thích sơ bộ được loại bỏ bằng từ tính và tế bào được rửa, được đếm và được kích thích lại bằng hạt Dynabead kháng CD3 và kháng thể có tác dụng trị liệu trong môi trường AIM-V được bổ sung 100IU/ml IL-2 (PeproTech) trong đĩa đáy tròn loại 96 lỗ được xử lý bằng môi trường nuôi cấy không mô. Mật độ cấy là 100k tế bào trên 100 μ l môi trường mỗi lỗ. Sau khi ủ ở 37°C trong 3,5 ngày, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom để xác định xytokin đa thành phần bằng MSD.

Thử nghiệm hoạt hóa MLR từ người

iDC thu được từ bạch cầu đơn nhân từ người tình nguyện khỏe mạnh được trộn theo tỷ lệ 1:10 (iDC: T) với tế bào T mới được phân lập từ người từ những người cho khác nhau và được ủ sơ bộ ở 37°C trong môi trường AIM-V với sự có mặt của hỗn hợp peptit CEFT 0,02 μ g/mL trong 24 giờ. Các nhóm kháng thể xử lý khác nhau được bổ sung một cách trực tiếp vào các lỗ, được trộn và còn được ủ thêm trong 4 ngày nữa. Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được thu gom để xác định xytokin đa thành phần bằng MSD phân tích.

Phân tích xytokin MSD

Mức xytokin IFN- γ , IL-10, IL-2 và TNF- α trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy mô được xác định bằng cách sử dụng kit chuẩn hóa V-Plex từ người MSD. Mẫu đầu tiên được pha loãng 1:200 trong dung dịch pha loãng 2 (Diluent 2). Mẫu hiệu chuẩn cũng được điều chế trong dung dịch pha loãng 2 theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Mẫu pha loãng và mẫu hiệu chuẩn được bổ sung vào đĩa MSD màu đen mà sau đó được gắn kín bằng chất gắn đĩa và được ủ ở nhiệt độ trong phòng kèm lắc trong 2 giờ. Sau khi bổ sung 25 μ L dung dịch kháng thể phát hiện, mà mới được điều chế trong dung dịch pha loãng 2 vào mỗi lỗ, đĩa lại được gắn kín và được ủ ở nhiệt độ trong phòng kèm lắc thêm khoảng 2 giờ. Đĩa được rửa 3 lần bằng 150 μ L/lỗ PBS cùng với 0,05% Tween-20 trước khi bổ sung 150 μ L/lỗ dung dịch đệm để đọc mới được pha loãng 2 lần và được tiến hành đọc ngay sau đó trên thiết bị đọc MESO QuickPlex. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm MSD Workbench.

Phân tích dữ liệu

Phân tích dữ liệu MSD

Dữ liệu MSD được phân tích bằng phần mềm Discovery Workbench (MSD, phiên bản 4.0.9). Mẫu hiệu chuẩn trong kit của nhà sản xuất được bổ sung vào mỗi MSD đĩa để tạo ra đường cong chuẩn đặc hiệu đĩa với giá trị R^2 trên 0,99 trong tất cả các trường hợp. Lượng xytokin được phát hiện được tính ngược trên cơ sở đường cong chuẩn và giá trị trung bình và hiệu chuẩn từ ba mẫu sinh lý giống nhau được sử dụng để vẽ đồ thị.

Phân tích thống kê

ANOVA một chiều được thực hiện trên dữ liệu thay đổi theo bậc, chuyển dạng logarit cho mẫu đối chứng isotyp của mỗi kháng thể xử lý. Thử nghiệm so sánh đa chiều của Dunnett được thực hiện để so sánh cả liệu pháp đơn trị so với kết hợp trong các người cho khác nhau. $P < 0,05$ được cho là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Phát triển thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC và thử nghiệm đối với hoạt tính kết hợp của H2L5 hIgG4PE với ipilimumab và pembrolizumab.

Để xác định các điều kiện tối ưu để kích thích sơ bộ, hạt Dynabead kháng CD3 và hạt Dynabead kháng CD3/CD28 từ người (Thermo Fisher) được thử nghiệm ở các tỷ lệ hạt

so với tế bào khác nhau. Sau 48 giờ kích thích sơ bộ, tế bào được lấy và hạt được loại bỏ bằng từ tính trước khi kích thích bằng hạt Dynabead kháng CD3 (tỷ lệ hạt so với tế bào = 1:1) cùng với kháng thể kháng ICOS riêng rẽ hoặc kết hợp với kháng thể kháng CTLA-4 hoặc kháng PD1. Việc xử lý chỉ bằng H2L5 hIgG4PE tạo ra sự cảm ứng IFN- γ so với mẫu đối chứng isotyp trong tất cả các điều kiện kích thích sơ bộ được thử nghiệm. Độ lớn của IFN- γ được cảm ứng bằng H2L5 hIgG4PE tỷ lệ nghịch với độ mạnh của kích thích sơ bộ. Việc kết hợp H2L5 hIgG4PE cùng với ipilimumab đã chứng tỏ sự sản sinh xytokin gia tăng so với H2L5 hIgG4PE hoặc ipilimumab ở dạng riêng rẽ trong PBMC mà được kích thích sơ bộ rất yếu. Tác dụng kết hợp bị mất dưới điều kiện kích thích sơ bộ bằng kháng CD3/kháng CD28 gắn kết đĩa, mà được cho là điều kiện kích thích sơ bộ mạnh hơn. Dựa trên kết quả này, điều kiện kích thích sơ bộ sử dụng hạt kháng CD3/kháng CD28 với tỷ lệ hạt so với tế bào là 1:20 được chọn cho tất cả các thử nghiệm PBMC khác. Kết quả từ bốn người cho riêng rẽ được thể hiện vắn tắt về sự kết hợp kháng CTLA-4 trong Fig. 16 và sự kết hợp với kháng PD-1 trong Fig. 17.

H2L5 hIgG4PE tạo ra sự cảm ứng xytokin phụ thuộc liều ở thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC

Hoạt tính phụ thuộc liều của H2L5 hIgG4PE được đánh giá ở các PBMC từ người được kích thích sơ bộ bằng hạt kháng CD3/kháng CD28 với tỷ lệ hạt so với tế bào định trước là 1:20, kháng thể kháng RSV IgG4PE và kháng thể được làm bất hoạt Fc kháng ICOS 422.2 IgG1 được dùng làm mẫu đối chứng. Tám nồng độ H2L5 hIgG4PE được thử nghiệm (100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, và 0,03 $\mu\text{g/mL}$). IFN- γ , IL-10 và TNF- α được đánh giá theo MSD trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy mô của mẫu PBMC. H2L5 hIgG4PE, nhưng không phải là mẫu đối chứng isotyp IgG4 hay 422.2 được làm bất hoạt Fc, cảm ứng sự sản sinh IFN- γ , IL-10 và TNF- α theo cách phụ thuộc liều. Kết quả này được sử dụng để xác định nồng độ H2L5 hIgG4PE được sử dụng các nghiên cứu kết hợp.

Phát triển thử nghiệm MLR từ người

Trong nỗ lực nhằm tối ưu hóa thử nghiệm MLR từ người, ngoài việc cùng nuôi cấy tế bào T từ người và DC chưa trưởng thành thu được từ bạch cầu đơn nhân từ người cho khác, hạt kháng CD3 còn được bổ sung vào các lỗ để tạo ra sự kích thích TCR cơ bản để giúp miễn cảm tế bào. Kết quả chứng tỏ rằng hạt kháng CD3 gia tăng đáng kể mức cảm ứng IFN- γ . Mặc dù ipilimumab ở dạng riêng rẽ có thể cảm ứng sự sản sinh IFN- γ mà không

có hạt kháng CD3, H2L5 hIgG4PE ở dạng riêng rẽ hay kết hợp H2L5 hIgG4PE/ipilimumab chỉ thể hiện sự sản sinh IFN- γ gia tăng trên mẫu đối chứng tương ứng với sự có mặt của hạt kháng CD3.

Hoạt tính kết hợp của H2L5 hIgG4PE và ipilimumab trong thử nghiệm MLR từ người

Hoạt tính kích thích miễn dịch của H2L5 hIgG4PE riêng rẽ hoặc kết hợp với ipilimumab được thử nghiệm trong thử nghiệm MLR ngoại sinh từ người mà trong đó tế bào T mà được ủ sơ bộ với DC chưa trưởng thành thu được từ bạch cầu đơn nhân từ người cho riêng rẽ với sự có mặt của 0,02 μ g/mL peptit CEFT trong 1 ngày. Việc kết hợp H2L5 hIgG4PE/ ipilimumab gia tăng đáng kể sự sản sinh IFN- γ so với từng chất ở dạng riêng rẽ. Kết quả là phù hợp trong ba cặp người cho được thử nghiệm; tuy nhiên, tỷ lệ sống sót thấp nhất được quan sát giữa những người cho (Fig. 18).

Hoạt tính kết hợp của H2L5 hIgG4PE và pembrolizumab trong thử nghiệm MLR từ người

Việc kết hợp của H2L5 hIgG4PE và pembrolizumab còn được thử nghiệm trong thử nghiệm MLR ngoại sinh từ người như được mô tả trên đây. H2L5 hIg G4PE được thử nghiệm riêng rẽ và kết hợp với pembrolizumab với lượng 10 μ g/mL. Hỗn hợp của H2L5 hIg G4PE và pembrolizumab gia tăng IFN- γ so với từng chất ở dạng riêng rẽ. Tuy nhiên, ý nghĩa thống kê không đạt được do tỷ lệ sống sót của người cho cao và hoạt tính đáng kể của mẫu điều trị bằng chất kháng PD-1 riêng rẽ ở một số người cho (Fig. 19).

Thảo luận

ICOS là thụ thể đồng kích thích mà được biểu hiện yếu trên tế bào T nguyên vẹn và được điều hòa tăng nhanh trong tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ đã hoạt hóa. Phối tử của ICOS ICOS-L (B7h, B7RP-1, CD275), mà được biểu hiện bằng APC thích hợp và bằng tế bào nội mô và biểu mô ngoại vi sau khi kích thích TNF- α . Con đường ICOS:ICOS-L tạo ra tín hiệu đồng kích thích đáng kể đối với sự tăng sinh và chức năng của tế bào T. Do vai trò của nó trong việc duy trì sự hoạt hóa và chức năng hiệu lực của tế bào T, việc hướng đích ICOS bằng chất chủ vận kháng thể có thể là phương pháp tin cậy để gia tăng tính miễn dịch chống khối u.

Các nghiên cứu đã thể hiện sự gia tăng tần suất tế bào T hiệu lực CD4⁺ ICOS^{hi} sau khi phong bế CTLA-4 bằng ipilimumab ở một số mẫu bệnh ung thư. Ngoài ra, do sự phong bế CTLA-4, quần thể tế bào này tạo ra các mức INF- γ lớn hơn tế bào T CD4⁺ ICOS^{lo}. Trên

thực tế, sự gia tăng về tần suất tế bào T ICOS⁺ CD4 đã được xác định là dấu ấn sinh học được lực học của việc điều trị bằng ipilimumab ở bệnh nhân ung thư. Các nghiên cứu, ở chuột C57BL/6 thể đại, đã chứng tỏ mức loại bỏ khối u từ 80 đến 90% sau liệu pháp phong bế CTLA-4; tuy nhiên, ở chuột đột biến gen ICOS hoặc ICOSL, hiệu quả bị giảm xuống còn ít hơn 50%. Việc ICOS có vai trò quan trọng đối với hiệu quả của sự phong bế CTLA-4 gợi ý rằng việc kích thích con đường ICOS trong liệu pháp kháng CTLA-4 có thể gia tăng hiệu quả trị liệu. Do đó, cần thiết lập đánh giá hoạt tính kết hợp của H2L5 hIgG4PE và ipilimumab.

Sự chết tế bào theo chương trình -1 (PD-1) được báo cáo vào năm 2000 là đối với phân tử kiểm soát miễn dịch khác. Sự biểu hiện của PD-L1 (B7-H1), mà là một trong số các phối tử của PD-1, có thể được tìm thấy trên nhiều loại tế bào bao gồm tế bào T, tế bào biểu mô, tế bào nội mô và tế bào khối u. Kháng thể hướng đích trực tiếp PD-1/PD-L1 cũng thể hiện đáp ứng lâm sàng trong nhiều loại khối u. FDA gần đây đã phê duyệt pembrolizumab và nivolumab là thế hệ thứ hai của chất phong bế kiểm soát miễn dịch để điều trị ung thư. Pembrolizumab của Merck còn thể hiện tỷ lệ đáp ứng là khoảng 37 đến 38% ở bệnh nhân với khối u ác tính tiến triển, với nghiên cứu tiếp theo báo cáo rằng có tỷ lệ đáp ứng tổng quát là 26% ở các bệnh nhân có bệnh tiến triển sau khi điều trị bằng ipilimumab. Nivolumab, kháng thể kháng PD-1 từ BMS, cũng thể hiện lợi ích lâm sàng ở bệnh nhân có khối u ác tính di căn với tỷ lệ đáp ứng là 40% và tỷ lệ sống sót thường là 72,9% vào năm thứ nhất. Ngoài ra, nivolumab còn được FDA phê duyệt để điều trị ung thư phổi tế bào không nhỏ tiến triển hoặc di căn. Vì kháng thể phong bế kiểm soát PD-1 ngày càng quan trọng trong liệu pháp miễn dịch ung thư chủ yếu trong lâm sàng, nên quan trọng là đánh giá H2L5 hIgG4PE kết hợp với kháng thể kháng PD-1 về hoạt tính chống khối u kết hợp của chúng.

Như đã mô tả, thử nghiệm hoạt hóa PBMC được phát triển và được sử dụng để đánh giá hoạt tính kích thích tế bào T của các kháng thể chủ vận kháng ICOS. Dữ liệu được tạo ra từ các nghiên cứu này hỗ trợ việc lựa chọn ứng viên của dòng 422.2 với isotyp IgG4PE là H2L5 hIgG4PE. Trong các thử nghiệm trước đây, các tế bào PBMC được kích thích sơ bộ bằng đĩa được gắn kết kháng thể kháng thể kháng CD3 với lượng 1 µg/mL và kháng thể kháng CD28 với lượng 3 µg/mL trong 48 giờ trước khi chúng được lấy và được kích thích lại bằng kháng thể kháng CD3 và kháng thể ICOS tan mà đang được nghiên cứu. H2L5 hIgG4PE còn cảm ứng sự sản sinh IFN-γ theo cách phụ thuộc liều. Để xác định điều kiện

tối ưu để kích thích lại, hạt Dynabead kháng CD3 từ người và hạt Dynabead kháng CD3/CD28 (Thermo Fisher) được thử nghiệm với các tỷ lệ hạt so với tế bào khác nhau. Sự kích thích bằng hạt được cho là có tác dụng sinh lý hơn và độ mạnh của kích thích có thể được kiểm soát dễ dàng hơn bằng cách thiết kế các tỷ lệ hạt so với tế bào khác nhau. Sau 48 giờ kích thích sơ bộ, các tế bào được lấy và hạt được loại bỏ bằng từ tính trước khi kích thích bằng hạt Dynabead kháng CD3 (tỷ lệ hạt so với tế bào = 1:1) cùng với kháng thể kháng ICOS riêng rẽ hoặc kết hợp với kháng CTLA-4. Kết quả cho thấy rằng việc xử lý bằng H2L5 hIgG4PE riêng rẽ tạo ra sự cảm ứng IFN- γ so với mẫu đối chứng isotyp ở tất cả các điều kiện kích thích sơ bộ được thử nghiệm. Lượng IFN- γ được cảm ứng bằng H2L5 hIgG4PE tỷ lệ nghịch với cường độ kích thích sơ bộ. Sự kết hợp các H2L5 hIgG4PE với ipilimumab đã chứng tỏ sự sản sinh xytokin gia tăng so với H2L5 hIgG4PE hoặc ipilimumab ở dạng riêng rẽ trong PBMC mà được kích thích sơ bộ yếu. Tác dụng kết hợp bị mất dưới điều kiện kích thích sơ bộ bởi đã được gắn kết kháng CD3/kháng CD28, mà được xác định là mạnh hơn điều kiện kích thích sơ bộ. Dựa trên kết quả này, điều kiện kích thích sơ bộ sử dụng kháng CD3/kháng CD28 với tỷ lệ hạt so với tế bào là 1:20 được chọn cho tất cả các thử nghiệm PBMC tiếp theo. Việc kết hợp H2L5 hIgG4PE và ipilimumab đã chứng tỏ sự gia tăng có ý nghĩa thống kê đối với sự sản sinh IFN- γ so với việc xử lý từng kháng thể dạng riêng rẽ.

Trong nỗ lực tối ưu hóa thử nghiệm, với sự kích thích bằng kháng thể kháng CD3/kháng CD28, tỷ lệ hạt so với tế bào được ấn định ở 1:20, hạt kháng CD3 được sử dụng trong bước tái kích thích được chuẩn độ xuống từ tỷ lệ hạt so với tế bào là 1:1 đến 1:3 và 1:10. Các kết quả cho thấy rằng cường độ tái kích thích thấp hơn sẽ tạo ra sự cảm ứng IFN- γ bởi H2L5 hIgG4PE thấp hơn. Tác dụng kết hợp của H2L5 hIgG4PE và ipilimumab bị mất hoàn toàn dưới sự tái kích thích ở tỷ lệ hạt so với tế bào là 1:3 và 1:10. Do đó, tỷ lệ hạt kháng CD3 so với tế bào trong sự tái kích thích là 1:1 được duy trì cho tất cả các thử nghiệm tiếp theo.

Với điều kiện kích thích sơ bộ và tái kích thích được tối ưu, thử nghiệm này được sử dụng để đánh giá đáp ứng liều của H2L5 hIgG4PE. Tổng số 8 nồng độ kháng thể được thử nghiệm, mà là 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 và 0,03 μ g/mL. Các dạng của H2L5 hIgG4PE kháng RSV IgG4PE và dạng của H2L5 hIgG4PE được làm bất hoạt Fc kháng ICOS 422.2 IgG1, dạng của H2L5 hIgG4PE được làm bất hoạt Fc, được sử dụng làm đối chứng. Kết quả cho thấy rằng H2L5 hIgG4PE, nhưng không phải là mẫu đối chứng isotyp IgG4 hoặc

422.2 được làm bất hoạt Fc, cảm ứng sự sản sinh IFN- γ , IL-10 và TNF- α theo cách phụ thuộc liều. Đáng chú ý là các dạng của H2L5 hIg G4PE được làm bất hoạt Fc thể hiện đáp ứng cảm ứng xytokin bị hạn chế, khẳng định sự tiếp hợp thụ thể Fc là quan trọng đối với chức năng chủ vận tế bào T của H2L5 hIg G4PE. Các kết quả này còn được sử dụng để xác định liều của H2L5 hIg G4PE cho các nghiên cứu kết hợp.

Thử nghiệm phản ứng tế bào bạch huyết hỗn hợp (MLR) còn được phát triển để đánh giá tác dụng kết hợp H2L5 hIg G4PE và kháng thể phong bế kiểm soát. Thử nghiệm MLR là thử nghiệm miễn dịch tế bào *ex vivo* trong đó tế bào hình cây chưa trưởng thành (iDC) thu được từ bạch cầu đơn nhân nguyên thủy được kết hợp với tế bào T được phân lập từ những người cho khác nhau. Sự bắt cặp không phù hợp của các phân tử phức hợp tương thích mô chính (MHC) trên bề mặt của tế bào iDC có thể khởi phát sự kích thích tế bào T trong mô hình ngoại sinh. Trong lâm sàng, thử nghiệm MLR là đã biết để xác định sự tương hợp của việc cấy ghép mô giữa người cho và người nhận.

Để phát triển thử nghiệm MLR, bạch cầu đơn nhân mới từ người được nuôi cấy trong môi trường được bổ sung thể tái tổ hợp GM-CSF và IL-4 từ người trong một tuần để cảm ứng kiểu biểu hiện DC chưa trưởng thành. Sau đó tế bào T từ người mới từ những người cho khác nhau được phân lập và được kết hợp với tế bào iDC theo tỷ lệ 10:1 (T : iDC). Liệu pháp đơn trị bằng H2L5 hIg G4PE và ipilimumab hoặc việc điều trị kết hợp được bổ sung vào môi trường đồng nuôi cấy tế bào T/iDC với sự có mặt hoặc không có mặt của hạt kháng CD3. Mục đích của hạt kháng CD3 là để tạo ra sự kích thích TCR cơ bản để giúp miễn cảm tế bào T. Kết quả cho thấy rằng hạt kháng CD3 gia tăng đáng kể mức cảm ứng IFN- γ trong thử nghiệm. Mặc dù ipilimumab ở dạng riêng rẽ có thể cảm ứng sự sản sinh IFN- γ mà không có hạt kháng CD3, H2L5 hIgG4PE ở dạng riêng rẽ hoặc H2L5 hIgG4PE/ipilimumab kết hợp thể hiện sự sản sinh IFN- γ gia tăng trên mẫu đối chứng tương ứng trong sự có mặt của hạt kháng CD3. Kết quả này gợi ý rằng, trong thử nghiệm này, sự kích thích TCR bằng tế bào DC ở dạng riêng rẽ có thể là không đủ để cảm ứng sự biểu hiện ICOS trên bề mặt của tế bào T nghỉ mà mới được phân lập từ PBMC. Để cải thiện tương hợp này, bước ủ sơ bộ iDC và tế bào T trong 24 giờ được thực hiện trước khi bổ sung kháng thể trị liệu. Hỗn hợp peptit CEFT còn được bổ sung vào quy trình thử nghiệm để miễn cảm tế bào T tốt hơn và để gây đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên. Nhóm peptit CEFT bao gồm 27 peptit được chọn từ các epitop tế bào T giới hạn ở nhóm HLA I và II được xác định từ virus cự bào từ người (HHV-5; CMV), virus Epstein-Barr (HHV-4; EBV), virus

cúm A và trực khuẩn uốn ván. Xem xét tần suất tạo miễn dịch cao chống lại virus cúm A và trực khuẩn uốn ván và tỷ lệ hiện hành cao của CMV và EBV trong quần thể nói chung, đáp ứng kháng nguyên được mong đợi đối với phần lớn mẫu từ người. Kết quả cho thấy rằng sự sản sinh IFN- γ gia tăng quan sát được khi tế bào T được ủ sơ bộ với tế bào iDC trong 24 giờ, và sự sản sinh IFN- γ còn được gia tăng khi peptit CEFT được bổ sung vào hệ môi trường đồng nuôi cấy. Hoạt tính kích thích miễn dịch của H2L5 hIgG4PE riêng rẽ hoặc kết hợp với ipilimumab được thử nghiệm trong thử nghiệm MLR ngoại sinh từ người trong đó tế bào T mà được ủ sơ bộ với DC chưa trưởng thành thu được từ bạch cầu đơn nhân từ người cho lẽ đôi với sự có mặt của 0,02 μ g/mL peptit CEFT trong 1 ngày. Việc kết hợp H2L5 hIgG4PE/ipilimumab tạo ra sự gia tăng đáng kể về mức sản sinh IFN- γ so với từng chất ở dạng riêng rẽ. Kết quả phù hợp trong ba cặp người cho được thử nghiệm; tuy nhiên, tỷ lệ sống sót thấp nhất được quan sát giữa những người cho.

Tương tự, sự kết hợp H2L5 hIgG4PE và pembrolizumab còn được thử nghiệm trong thử nghiệm MLR ngoại sinh từ người như được mô tả trên đây. H2L5 hIgG4PE được thử nghiệm riêng rẽ và kết hợp với pembrolizumab với lượng 10 μ g/mL. Sự kết hợp H2L5 hIgG4PE và pembrolizumab làm gia tăng IFN- γ so với từng chất ở dạng riêng rẽ. Tuy nhiên, ý nghĩa thống kê không đạt được do tỷ lệ sống sót của những người cho cao và hoạt tính đáng kể của việc điều trị bằng một chất kháng PD-1 duy nhất ở một số người cho.

Tóm lại, các nghiên cứu này đã chứng tỏ hoạt tính kết hợp vượt trội của H2L5 hIgG4PE với hai chất ức chế kiểm soát được FDA phê duyệt, ipilimumab và pembrolizumab, khi so sánh với liệu pháp đơn trị trong hai thử nghiệm trên cơ sở tế bào miễn dịch từ người. Đối với các nghiên cứu được mô tả trong bản mô tả này, H2L5 hIgG4PE thể hiện việc đẩy mạnh sự hoạt hóa tế bào T và độ lệch của T_H1 (chẳng hạn, sự sản sinh IFN- γ) mà là đặc trưng của đáp ứng miễn dịch chống khối u hữu ích.

Ví dụ 11: Hoạt tính chức năng của H2L5 hIgG4PE riêng rẽ và kết hợp với kháng thể kháng PD1 và kháng CTLA-4 in vivo

Mẫu khối u của chuột với PBMC từ người

PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị thử nghiệm

Tất cả các quá trình thử nghiệm trên động vật được xem xét và được phê duyệt bởi ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật từ thiện GSK (GSK Institutional Animal Care and Use Committee) trước khi thực hiện các thủ tục nghiên cứu.

Chuẩn bị dòng tế bào:

A2058 được nhân giống theo phương pháp ATCC.

Vật liệu:

- Dòng tế bào khối u ác tính từ người A2058: ATCC, Cat CRL-11147, lot#59349362
- DPBS: ATCC, Cat #30-2200, Lot#63357436
- Môi trường Eagle được biến đổi bởi Dulbecco: ATCC, Cat# 30-2002, Lot# 62596471, hạn sử dụng: tháng 11/2015
- Huyết thanh thai bò: Sigma-Aldrich, Cat#12176c-1000ml, lot số 13G180R0H1, hết hạn : tháng 7/2018
- 0,25% (trọng lượng/thể tích) Trypsin- 0,53 mM EDTA: ATCC, Cat #30-2102, Lot#62420300
- Kháng sinh Antimycotic (100X): Life Technologies, Cat# 15240-062
- Bình nuôi cấy tế bào T175 : Greiner bio-one, Cat# 661175
- Bình nuôi cấy tế bào T75 : Greiner bio-one, Cat# 658175

Môi trường:

- Môi trường phát triển hoàn chỉnh A2058: Môi trường Eagle được biến đổi bởi Dulbecco + 10% FBS. Điều kiện nuôi cấy: Khí quyển: không khí, 95%; 5% cacbon dioxit (CO₂); Nhiệt độ: 37°C
- Khi nhận tế bào:
- Môi trường hoàn chỉnh được làm ấm sơ bộ ở 37°C.
- Rã đông tế bào nhanh trong bồn nước ở 37°C. Làm sạch ống bằng 70% etanol và chuyển tế bào vào ống dung tích 15mL đã được nạp môi trường hoàn chỉnh đã làm ấm sơ bộ.
- Ly tâm ở 1200vòng/phút trong 5 phút để thu gom hạt pellet tế bào.
- Bổ sung tế bào ngược trở lại bình T75 đã được nạp bằng môi trường hoàn chỉnh được làm ấm sơ bộ và ủ ở 37°C.

Nuôi cấy bổ sung tế bào:

- Thể tích được xác định cho bình 75 cm² (đối với bình T175 cm², điều chỉnh lượng phân ly và môi trường nuôi cấy theo tỷ lệ cần thiết).
- Loại bỏ môi trường nuôi cấy.
- Rửa nhanh lớp tế bào bằng DPBS để loại bỏ tất cả các vết huyết thanh mà chứa chất ức chế trypsin.
- Bổ sung 2,0 đến 3,0ml dung dịch Trypsin-EDTA vào bình và quan sát tế bào dưới kính hiển vi soi ngược cho đến khi lớp tế bào được phân tán (2-3 phút).
- Lưu ý: để tránh sự kết nhóm, không khuấy tế bào bằng cách lắc bình mà đợi đến khi tế bào tách riêng. Tế bào mà khó tách riêng có thể được đặt ở 37°C để tạo thuận lợi cho việc phân tán.
- Bổ sung 10ml môi trường phát triển hoàn chỉnh và hút tế bào bằng cách sử dụng pipet một cách cẩn thận.
- Ly tâm với tốc độ 1200 vòng/phút trong 5 phút để thu gom hạt pellet tế bào, bổ sung 10ml môi trường phát triển hoàn chỉnh.
- Bổ sung các phân ước thích hợp của huyền phù tế bào vào bình nuôi cấy mới. Ủ môi trường nuôi cấy ở 37°C.
- Làm mới môi trường: Mỗi 2 đến 3 ngày

Chuẩn bị tế bào khối u để cấy chuyển vào chuột:

- Rửa tế bào bằng 1X DPBS, bổ sung 3ml 1X Trypsin trong 2-3 phút.
- Bổ sung môi trường phát triển hoàn chỉnh và thu gom huyền phù tế bào trong ống ly tâm hình nón vô trùng trong môi trường nuôi cấy mô có nắp đậy.
- Ly tâm tế bào với tốc độ 1200vòng/phút trong 5 phút để thu được hạt pellet tế bào.
- Rửa tế bào bằng 1X dung dịch DPBS, ly tâm với tốc độ 1200vòng/phút trong 5 phút để thu được hạt pellet tế bào. Lặp lại việc rửa 2 lần.
- Đếm tế bào bằng huyết cầu kế đối với số lượng tế bào và tỷ lệ sống sót.
- Tạo huyền phù lại tế bào trong PBS trong nước đá với các nồng độ để cấy chuyển in vivo (A2058, 2,5e7/ml, 2,5e6/100μL/chuột).

Cấy chuyển dòng tế bào khối u vào chuột nhắt NSG

Vật liệu:

- Chuột nhắt: NOD.Cg-PrkDCid Il2rgtm1Wjl/SzJ. Jackson Laboratory Stock: 005557, con cái, độ tuổi: 6 tuần
- Ống tiêm Tuberculin 1ml kèm kim tiêm 25 G 5/8: Becton Dickinson, Cat# 305554
- PDI™ Alcohol Prep Pads: Professional Disposables, Cat# B339
- Đệm bông PDI™ Povidone-Iodin Prep Pad: Professional Disposables, Cat# B40600
- Chuẩn bị chuột
- Chuột tốt hơn là 6 tuần tuổi.
- Cho thích nghi với môi trường trong 3-5 ngày sau khi nhận chuột.
- Cắt phần hông sau bên phải của chuột

Chuẩn bị tiêm

- Làm sạch và vô trùng phần diện tích cấy chuyển của chuột bằng iot, sau đó bằng đệm bông gòn ethanol
- Sử dụng ống tiêm 1-cc và đầu kim tiêm 25 gauge
- Kéo pit tông, kết hợp các tế bào và bổ sung 100µL tế bào trở lại ống tiêm, lồng một cách cẩn thận vào pit tông.
- Tiêm tế bào dưới da (s.c.) vào phần hông sau bên phải của chuột.
- Đánh giá sự phát triển khối u
- Xác định khối u, làm ẩm bằng 70% ethanol để dễ dàng tìm ra các rìa khối u. Xác định kích thước khối u và thể trọng mỗi 2-3 ngày.
- Kích thước khối u được đo bằng thước kẹp điện tử, và thể tích được xác định như sau: Thể tích khối u (mm³) = (chiều dài) × (chiều rộng)²/2
- Sử dụng trong tĩnh mạch PBMC từ người
- Việc sử dụng PBMC từ người có thể bắt đầu 1 tuần sau khi khối u có giá trị trung bình thể tích vào khoảng 100 mm³.

Vật liệu:

- PBMC mới từ người : Allcells, cat#C-PB102-3B2
- Ống tiêm Tuberculin 1ml kèm kim tiêm 25 G 5/8: Becton Dickinson, Cat# 305554

- Đệm bông PDI™ Alcohol Prep Pad: Professional Disposables, Cat# B339
- Đệm bông PDI™ Povidone-Iot Prep Pad: Professional Disposables, Cat# B40600
- Gạc bột biển: Covidien, cat# 441211
- Thiết bị giữ đèn chiếu sáng chuột: Braintree scientific, cat#MTI STD
- Chuẩn bị PBMC
- PBMC tươi từ người được mua từ AllCells bằng cách vận chuyển qua đêm.
- Ly tâm tế bào với tốc độ 1400vòng/phút trong 5 phút để thu được hạt pellet tế bào.
- Rửa tế bào bằng 1X dung dịch DPBS, ly tâm với tốc độ 1400vòng/phút trong 5 phút để thu được hạt pellet tế bào.
- Tạo huyền phù lại tế bào trong PBS trong nước đá ở nồng độ để tiêm in vivo (20e7/ml).
- Sử dụng ống tiêm 1-cc và đầu kim tiêm 25 gauge.
- Kéo pit tông, trộn tế bào và bổ sung 100μL tế bào trở lại ống tiêm, lồng một cách cẩn thận pit tông.
- Giữ tế bào trên nước đá.
- Tiêm vào ven đuôi
- Ủ ấm chuột bằng đèn huỳnh quang trong 5 phút
- Giữ chuột bằng thiết bị giữ đèn chiếu sáng đuôi.
- Quay đuôi chậm để quan sát ven.
- Làm sạch và vô trùng vị trí tiêm bằng iot sau đó bằng bông gòn etanol
- Chèn đầu kim vào ven với góc nhỏ và tiêm tế bào.
- Rút kim tiêm và ấn nhẹ gạc bột biển cho đến khi ngừng chảy máu.
- Đưa các con vật trở lại chuồng và quan sát trong 5-10 phút để đảm bảo rằng việc chảy máu không xảy ra.

Sử dụng kháng thể trị liệu

- 1-3 ngày sau khi tiêm PBMC từ người, chuột được cho sử dụng kháng thể bằng cách tiêm trong màng bụng.

Vật liệu:

- Mẫu đối chứng isotyp IgG1 hoàn toàn từ người: Eureka trị liệu, cat#ET-901(loại tiền lâm sàng) Lot#15-726, hạn sử dụng: Tháng 02/2017

- Ipilimumab (Yervoy): Bristol-Myers Squibb NDC 0003-2327-11, lot#921873 Hạn sử dụng: Tháng 04/2015; lot#4H69490, hạn sử dụng: Tháng 05/2016
- Mẫu đối chứng isotyp IgG4 hoàn toàn từ người: Eureka trị liệu, cat#ET-904(loại tiền lâm sàng) Lot#15-726, hạn sử dụng: Tháng 02/2017
- H2L5 hIgG4PE kháng ICOS từ người
- Pembrolizumab (Keytruda): Merck, NDC 0006-3026-02, lot# L010592, hạn sử dụng: 26/04/2016
- Tiêm trong màng bụng:
- Kéo lên, đưa vào ống tiêm và đầu kim tiêm 100 μ L.
- Vạch mức đầu kim tiêm với các giá trị trên ống tiêm.
- Giữ con vật một cách chắc chắn bằng tay không thuận.
- Vị trí tiêm của đầu kim tiêm: hình dung đường ranh giới trong bụng ngay trên đầu gối, đầu kim tiêm sẽ được chèn theo đường này ở phía bên phải của con vật gần với đường phân giác. Nếu là con cái, có thể thấy rằng vị trí tiêm là ở phía trước và gần như ở trung tâm của núm vú cuối.
- Nghiêng chuột với đầu của nó hướng xuống đất sao cho đầu của nó thấp hơn phía sau của nó.
- Chèn đầu kim vào bụng ở góc khoảng 30 độ.
- Thân đầu kim tiêm phải đi sâu vào khoảng nửa cm.
- Sau khi tiêm, rút kim tiêm ra và đưa chuột trở lại chuồng.
- Lấy mẫu máu và khối u
- Vật liệu:
- Microvette CB300 (Huyết thanh): Braintree Scientific, Cat# MV-CB300 16440
- Microvette CB300 (Hematology/Potassium EDTA): Braintree Scientific, Cat# MV-CB300 16444
- Máu:
- Chuột được lấy máu ở ven đuôi mỗi một tuần.
- 30 μ L máu được lấy vào Microvette CB300 (Hematology/Potassium EDTA) để phân tích đếm tế bào theo dòng.

- 30 μ L máu khác được lấy trong huyết thanh Microvette CB300 và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng để vón cục, sau đó ly tâm ở 2000 x g để thu gom huyết thanh. Huyết thanh được cất giữ ở -20 cho đến khi được phân tích tiếp.

Khối u:

- Chuột được làm an tử khi kích thước khối u đạt 2000mm³. Khối u được lấy và được xử lý theo quy trình sau đây.

Thiết kế thử nghiệm

Tất cả các nghiên cứu được chuẩn bị theo quy trình được liệt kê trên đây.

Đáp ứng liều H2L5 hIgG4PE

Nghiên cứu này được thiết kế để xác định hoạt tính phụ thuộc liều của H2L5 hIgG4PE ở chuột NSG được ghép PBMC từ người được cấy ghép khối u ác tính A2058. Chín nhóm với 10 con chuột mỗi nhóm và 1 nhóm đối chứng (Chỉ khối u, không PBMC) với 7 con chuột được thiết kế vào mỗi nghiên cứu. Tóm tắt về chế độ điều trị đối với đáp ứng liều bằng cách sử dụng PBMC từ người từ người cho #7129 được thể hiện trong Bảng 11. H2L5 hIgG4PE được định liều ở 0,04, 0,4, 1,2 và 4mg/kg. Ipilimumab được định liều ở 3mg/kg và biến thể được làm bất hoạt Fc của chất chủ vận kháng ICOS được thử nghiệm với lượng 1mg/kg. Nhóm thử nghiệm được đánh giá so với nhóm chất dẫn thuốc và được so sánh với nhóm đối chứng isotyp tương ứng. Phân tích tỷ lệ sống sót được thực hiện vào ngày 49 ở giai đoạn kết thúc của nghiên cứu.

Bảng 11: Tóm tắt về chế độ điều trị đối với đáp ứng liều H2L5 hIgG4PE ở chuột

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột /nhóm	Định liều
1	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	Chất dẫn thuốc	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
2	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	Isotyp IgG1 từ người (3mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
3	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	Ipilimumab (3mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
4	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	IgG4 từ người (4mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
5	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	H2L5 hIgG4PE (0,04mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
6	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	H2L5 hIgG4PE (0,4mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
7	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	H2L5 hIgG4PE (1,2mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
8	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	H2L5 hIgG4PE (4mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
9	Khối u + huPBMC (người cho #7129)	ICOS được làm bất hoạt Fc (1mg/kg)	10	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần
10	Khối u (no PBMC) (người cho #7129)	Không được xử lý	7	Hai lần mỗi tuần trong 3 tuần

Nghiên cứu hoạt tính hiệu quả và dược lực học (PD) bằng H2L5 hIgG4PE kết hợp với ipilimumab và pembrolizumab

Đối tượng nghiên cứu:

Để đánh giá hoạt tính chống khối u của liệu pháp đơn trị bằng H2L5 hIgG4PE được định liều ở 0,04mg/kg và 0,4mg/kg.

Để đánh giá hoạt tính chống khối u của H2L5 hIgG4PE được định liều kết hợp với ipilimumab hoặc pembrolizumab với được so sánh với đối chứng isotyp tương ứng.

Thu gom mô cho các nghiên cứu khác về hoạt tính dược lực học của H2L5 hIgG4PE. Tổng số 22 nhóm điều trị với 10 con chuột mỗi nhóm được thiết kế cho nghiên cứu này. Nhóm 1-16 là nhóm nghiên cứu về hiệu quả và nhóm 17-22 là nhóm nghiên cứu về hoạt tính dược lực học.

Đối với các chế độ điều trị kết hợp, H2L5 hIgG4PE (0,04 hoặc 0,4mg/kg) và ipilimumab hoặc IgG1 (3mg/kg) hoặc H2L5 hIgG4PE (0,04 hoặc 0,4mg/kg) và pembrolizumab hoặc IgG4 (5mg/kg) được định liều. H2L5 hIgG4PE và ipilimumab cũng như đối chứng isotyp tương ứng được định liều hai lần mỗi tuần cho 6 liều, pembrolizumab và mẫu đối chứng isotyp tương ứng được định liều mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều H2L5 hIgG4PE. Đối với nhóm thu gom mô để nghiên cứu dược lực học, H2L5 hIgG4PE được định liều với lượng 0,004, 0,04, 0,4 và 1,2mg/kg. Nhóm điều trị được đánh giá so với nhóm chất dẫn thuốc và nhóm đối chứng isotyp. Nhóm điều trị đối với chất dẫn thuốc, isotyp và H2L5 hIgG4PE riêng rẽ và kết hợp với ipilimumab và pembrolizumab sử dụng PBMC từ người từ người cho số 6711 được thể hiện trong Bảng 12. Phân tích được thực hiện vào ngày 59 ở giai đoạn kết thúc của nghiên cứu.

Bảng 12: Nhóm chuột điều trị với mẫu khối u ác tính A2058

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột/ nhóm	Định liều
1	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Chất dẫn thuốc	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều
2	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Mẫu đối chứng isotyp (IgG1 3mg/kg + IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 hai lần mỗi tuần cho 6 liều IgG4 mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS

Bảng 12: Nhóm chuột điều trị với mẫu khối u ác tính A2058

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột/ nhóm	Định liều
3	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Ipilimumab 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều IgG4 mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
4	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Pembrolizumab 5mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 hai lần mỗi tuần cho 6 liều Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
5	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
6	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
7	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Ipilimumab 3mg/kg +Pembrolizuma b 5mg/kg	10	Ipilimumab hai lần mỗi tuần cho 6 liều, Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
8	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg + Ipilimumab 3mg/kg	10	Ipilimumab và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
9	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4mg/kg +	10	Ipilimumab và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều

Bảng 12: Nhóm chuột điều trị với mẫu khối u ác tính A2058

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột/ nhóm	Định liều
		Ipilimumab 3mg/kg		
10	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg +Pembrolizuma b 5mg/kg	10	ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
11	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4mg/kg +Pembrolizuma b 5mg/kg	10	ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
12	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	IgG4 5mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều
13	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Pembrolizumab 2,5mg/kg	10	Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
14	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Pembrolizumab 5mg/kg	10	Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
15	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4mg/kg	10	ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều

Bảng 12: Nhóm chuột điều trị với mẫu khối u ác tính A2058

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột/ nhóm	Định liều
16	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4mg/kg +Pembrolizuma b 5mg/kg+Ipi	10	ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
17	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Chất dẫn thuốc	10	Hai lần mỗi tuần đối với thử nghiệm hoạt tính dược lực học, 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ hai và 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ tư
18	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	Mẫu đối chứng isotyp (IgG4) 1,2mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần đối với thử nghiệm hoạt tính dược lực học, 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ hai và 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ tư
19	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,004mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần đối với thử nghiệm hoạt tính dược lực học, 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ hai và 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ tư
20	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần đối với thử nghiệm hoạt tính dược lực học, 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ hai và 5 con

Bảng 12: Nhóm chuột điều trị với mẫu khối u ác tính A2058

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột/ nhóm	Định liều
				chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ tư
21	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 0,4mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần đối với thử nghiệm hoạt tính được lực học, 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ hai và 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ tư
22	Khối u + huPBMC (người cho #6711)	H2L5 hIgG4PE 1,2mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần đối với thử nghiệm hoạt tính được lực học, 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ hai và 5 con chuột được lấy sau 24h sử dụng liều thứ tư

Nghiên cứu đánh giá hiệu quả của H2L5 hIgG4PE được định liều kết hợp với ipilimumab hoặc pembrolizumab

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hiệu quả chống khối u của H2L5 hIgG4PE (được định liều với lượng 0,01 và 0,04mg/kg) kết hợp với ipilimumab hoặc pembrolizumab với đối chứng isotyp tương ứng ở chuột NSG được cấy ghép PBMC từ người sử dụng mẫu khối u ác tính A2058. Tổng 13 nhóm với 10 con chuột mỗi nhóm được thiết kế cho nghiên cứu. Nhóm 2 là đối chứng isotyp được kết hợp IgG1 và IgG4 được nhân hóa. H2L5 hIgG4PE được định liều với lượng 0,01mg/kg (Nhóm 12) và 0,04mg/kg (Nhóm 13) ở dạng chất duy nhất. Đối với chế độ điều trị kết hợp, H2L5 hIgG4PE (0,01 và 0,04mg/kg) và ipilimumab hoặc IgG1 (3mg/kg) hoặc H2L5 hIgG4PE (0,01 và 0,04mg/kg) và pembrolizumab hoặc IgG4 (5mg/kg) được định liều. H2L5 hIgG4PE và ipilimumab cũng như đối chứng isotyp tương ứng được định liều hai lần mỗi tuần cho 6 liều, pembrolizumab

và mẫu đối chứng isotyp được định liều mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều H2L5 hIgG4PE. Tổng hợp các nhóm điều trị, bằng cách sử dụng PBMC từ người từ người cho số 4568, được thể hiện ở

Bảng 13. Nhóm điều trị được đánh giá so với nhóm chất dẫn thuốc và nhóm đối chứng isotyp. Phân tích tỷ lệ sống sót được thực hiện vào ngày 33 ở giai đoạn kết thúc của nghiên cứu.

Bảng 13: Nhóm chuột điều trị với mẫu khối u ác tính A2058

Nhóm	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	Số chuột/ nhóm	Định liều
1	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	Chất dẫn thuốc	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều
2	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	Mẫu đối chứng isotyp (IgG1 3mg/kg+ IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 hai lần mỗi tuần cho 6 liều IgG4 mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
3	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	Ipilimumab 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều IgG4 mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
4	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	Pembrolizumab 5mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 hai lần mỗi tuần cho 6 liều, Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
5	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
6	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
7	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	Ipilimumab 3mg/kg +Pembrolizumab 5mg/kg	10	Ipilimumab hai lần mỗi tuần cho 6 liều, Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS

8	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01mg/kg + Ipilimumab 3mg/kg	10	Ipilimumab và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
9	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg + Ipilimumab 3mg/kg	10	Ipilimumab và ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều
10	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01mg/kg +Pembrolizumab 5mg/kg	10	ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
11	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg +Pembrolizumab 5mg/kg	10	ICOS hai lần mỗi tuần cho 6 liều Pembrolizumab mỗi 5 ngày cho đến khi kết thúc liều ICOS
12	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,01mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều
13	Khối u + huP BMC (người cho #4568)	H2L5 hIgG4PE 0,04mg/kg	10	Hai lần mỗi tuần cho 6 liều

Phân tích thống kê

Sự kiện xảy ra đối với phân tích tỷ lệ sống sót là thể tích khối u $>2000 \text{ mm}^3$, tình trạng loét khối u, thể trọng chuột giảm sút $>20\%$, hấp hối hoặc đã chết, tùy theo điều gì xảy ra trước. Thời điểm chính xác cho ngưỡng thể tích được ước lượng bằng cách lấy khớp đường thẳng tuyến tính giữa logarit thể tích khối u và ngày của hai lần quan sát, quan sát đầu tiên mà vượt quá ngưỡng thể tích và quan sát còn lại là ngay trước ngày đạt ngưỡng thể tích. Phương pháp Kaplan-Meier (KM) được thực hiện để ước lượng tỷ lệ sống sót của các nhóm điều trị khác nhau ở thời điểm xác định. Thời gian trung bình đến thời điểm cuối và khoảng tin cậy 95% tương ứng của nó được báo cáo. Sau đó, đường cong tỷ lệ sống sót

KM giữa hai nhóm bất kỳ có khác nhau về mặt thống kê hay không được thử nghiệm bằng thử nghiệm log-rank.

Dữ liệu về thể tích khối u từ ngày cuối cùng trong đó có 10 con vật mỗi nhóm (tức là trước khi con vật bất kỳ được làm an tử) được sử dụng để so sánh thể tích khối u giữa các nhóm điều trị khác nhau. Trước khi phân tích, thể tích khối u được chuyển dạng logarit (log) tự nhiên do sự khác biệt về phương sai trong các nhóm điều trị khác nhau. ANOVA sau đó là so sánh từng cặp được thực hiện trên dữ liệu được chuyển dạng logarit.

Phần mềm GraphPad Prism được sử dụng để vẽ đồ thị dữ liệu phát triển khối u và thể trọng.

Kết quả

Đáp ứng liệu H2L5 hIgG4PE (Fig. 20A)

Ức chế phát triển khối u

Nhóm đối chứng: PBMC từ người (người cho 7129) không thể hiện tác dụng đối với sự phát triển khối u A2058 ở chuột NSG. Chuột mang khối u A2058 có hoặc không có PBMC từ người, chuột mang khối u A2058 có PBMC từ người được xử lý bằng chất dẫn thuốc và kháng thể mẫu đối chứng isotyp đã phát triển khối u mà tiến triển như được mong đợi (Nhóm #1 so với Nhóm #10, Nhóm #1 so với Nhóm #2, Nhóm #1 so với Nhóm #4, $p=1$).

Chế độ điều trị bằng ipilimumab với lượng 3mg/kg (Nhóm #3) đã chứng tỏ mức ức chế đáng kể sự phát triển khối u ($p<0,03$) so với mẫu đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1, tuy nhiên ý nghĩa thống kê bị mất ($p<0,22$) khi so sánh với mẫu đối chứng isotyp nhóm #2. Điều này cho thấy rằng kháng thể isotyp có thể ảnh hưởng đến sự phát triển khối u.

Chế độ điều trị bằng H2L5 hIgG4PE với lượng 0,4mg/kg đã chứng tỏ xu hướng ức chế phát triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống sót của chuột so với các liệu khác, mặc dù tác động là không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với chất dẫn thuốc hoặc mẫu đối chứng isotyp.

Quan sát lâm sàng:

Sự suy giảm thể trọng ở chuột được quan sát trong nghiên cứu mà là khoảng 20% ở thời điểm cuối của nghiên cứu. Được báo cáo là tải trọng cả GvHD và khối u có thể gây giảm mạnh về thể trọng chuột, mặc dù trong nghiên cứu này thể trọng giảm sút dường như

có liên quan nhiều hơn đến khối u A2058 vì chuột mang khối u mà không được ghép mô PBMC (nhóm #10) thể hiện cùng một xu hướng. Tình trạng loét khối u quan sát được ở các khối u trong nghiên cứu, kể cả nhóm đối chứng isotyp.

Cái chết của chuột:

Hầu hết chuột được loại bỏ khi khối u đạt đến thể tích $>2000\text{mm}^3$. Ba con chuột được làm an tử do tình trạng loét khối u, và ba con chuột được làm an tử do thể trọng giảm $>20\%$. Chín con chuột đã chết một cách tự nhiên trong các nhóm, bao gồm hai con trong nhóm chất dẫn thuốc, và tổng cộng ba con trong nhóm đối chứng isotyp. Cái chết của những con chuột này được cho là do độ nhạy của mẫu đối với trạng thái bệnh ở vật chủ chống lại sự cấy ghép, và không liên quan đến việc điều trị vì không có mẫu nào quan sát được với nhóm điều trị so với nhóm chất dẫn thuốc hoặc nhóm đối chứng isotyp.

Nghiên cứu hiệu quả với H2L5 hIgG4PE kết hợp với ipilimumab và Pembrolizumab (Fig. 20B)

Ước chế phát triển khối u:

Nhóm đối chứng: Chuột mang khối u A2058 với PBMC từ người được xử lý bằng chất dẫn thuốc hoặc kháng thể mẫu đối chứng isotyp đã phát triển khối u mà sự phát triển là như được mong đợi.

Liệu pháp đơn trị:

Việc điều trị bằng ipilimumab với lượng 3mg/kg được kết hợp với IgG4 (Nhóm #3) tạo ra mức ước chế đáng kể sự phát triển khối u ($p<0,04$) so với mẫu đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1. Tuy nhiên, khi so sánh với mẫu đối chứng isotyp nhóm #2, ý nghĩa thống kê bị mất ($p<0,23$).

Việc điều trị bằng Pembrolizumab ở dạng riêng rẽ ở $2,5$ hoặc 5mg/kg (Nhóm #13, 14) có mức ước chế phát triển khối u có thể quan sát được nhưng không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng isotyp nhóm #12. Pembrolizumab được kết hợp với IgG1 (Nhóm #4), thể hiện mức ước chế phát triển khối u có thể quan sát được nhưng không có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót được quan sát ($p<0,04$) khi so sánh với đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1. Ý nghĩa thống kê bị mất ($p<0,4$) khi so sánh với đối chứng isotyp nhóm #2.

Chế độ điều trị bằng H2L5 hIgG4PE riêng rẽ với lượng 0,4mg/kg (Nhóm #15) thể hiện mức ức chế phát triển khối u quan sát được mà không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng isotyp nhóm #12. H2L5 hIgG4PE với lượng 0,04 hoặc 0,4mg/kg được kết hợp với IgG1 (Nhóm #5 và 6) thể hiện sự trì hoãn quan sát được trong quá trình tiến triển khối u và tỷ lệ sống sót của chuột nhưng không có ý nghĩa thống kê.

Điều trị kết hợp:

Tổ hợp của H2L5 hIgG4PE (0,04 hoặc 0,4mg/kg) với ipilimumab (3mg/kg). Nhóm #8 và #9 không thể hiện mức ức chế thêm đối với sự phát triển khối u so với Ipilimumab ở dạng riêng rẽ (Nhóm #3). Tổ hợp của H2L5 hIgG4PE (0,04 hoặc 0,4mg/kg) với pembrolizumab (5mg/kg). Nhóm #10 và #11 đã chứng tỏ mức ức chế phát triển khối u và tỷ lệ sống sót của chuột nhẹ nhưng không đáng kể so với liệu pháp đơn trị bằng pembrolizumab, Nhóm #4, hoặc liệu pháp đơn trị bằng H2L5 hIgG4PE, Nhóm #5 và #6,

Quan sát lâm sàng:

Thể trọng chuột giảm sút quan sát được trong nghiên cứu là khoảng 20%. Tình trạng loét khối u là rõ ràng ở các khối u trong nghiên cứu ở phần lớn các nhóm.

Cái chết của chuột:

Tổng cộng 100 con trong số 160 con chuột được làm an tử khi thể tích khối u đạt đến >2000mm³. 29 con chuột được làm an tử do loét khối u, 18 con chuột đã chết, 12 con chuột được làm an tử do thể trọng giảm sút >20%, và một con chuột được làm an tử vì hấp hối. Chuột đã chết nằm trong nhóm bao gồm mẫu đối chứng isotyp nhóm #2. Cái chết của những con chuột này được cho là do độ nhạy của mẫu đối với trạng thái bệnh ở vật chủ chống lại sự cấy ghép, và không liên quan đến chế độ điều trị vì không có mẫu nào quan sát được với nhóm điều trị so với nhóm đối chứng isotyp.

Nghiên cứu hiệu quả để đánh giá H2L5 hIgG4PE được định liều kết hợp với ipilimumab hoặc pembrolizumab (Fig. 20C)

Trì hoãn phát triển khối u:

Nhóm đối chứng: Chuột mang khối u A2058 với PBMC từ người được xử lý bằng chất dẫn thuốc hoặc kháng thể mẫu đối chứng isotyp đã phát triển khối u mà sự phát triển là như được mong đợi.

Liệu pháp đơn trị:

Chế độ điều trị bằng ipilimumab với lượng 3mg/kg kết hợp với IgG4 (Nhóm #3) đã chứng tỏ mức ức chế đáng kể đến sự phát triển khối u ($p<0,02$) và sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót ($p<0,01$) khi so sánh với đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1. Tuy nhiên, so với mẫu đối chứng isotyp nhóm #2, sự ức chế phát triển khối u không đạt ý nghĩa thống kê ($p<0,13$) trong khi đó vẫn giữ được sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót của chuột ($p<0,04$).

Chế độ điều trị bằng Pembrolizumab với lượng 5mg/kg kết hợp với IgG1 (Nhóm #4) thể hiện sự ức chế phát triển khối u mà không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng isotyp nhóm #2.

Chế độ điều trị bằng H2L5 hIgG4PE riêng rẽ với lượng 0,01mg/kg hoặc 0,04mg/kg (Nhóm #12 và #13) đã chứng tỏ mức ức chế đáng kể sự phát triển khối u ($p<0,03$) khi so sánh với mẫu đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1. H2L5 hIgG4PE được định liều với lượng 0,04mg/kg còn làm gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót của chuột ($p<0,048$) khi so sánh với nhóm đối chứng chất dẫn thuốc #1. Tuy nhiên, so với mẫu đối chứng isotyp nhóm #2, mức ức chế phát triển khối u và tỷ lệ sống sót không có ý nghĩa thống kê đối với nhóm #12 và #13. H2L5 hIgG4PE với lượng 0,01mg/kg được kết hợp với IgG1 (Nhóm #5) thể hiện mức ức chế đáng kể đến sự phát triển khối u ($p<0,03$) và tỷ lệ sống sót của chuột ($p<0,03$) khi so sánh với mẫu đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1. Tuy nhiên, so với mẫu đối chứng isotyp nhóm #2, việc trì hoãn sự phát triển khối u và tỷ lệ sống sót không có ý nghĩa thống kê. H2L5 hIgG4PE với lượng 0,04mg/kg được kết hợp với IgG1 (Nhóm #6) thể hiện mức ức chế phát triển khối u và tỷ lệ sống sót của chuột quan sát được, nhưng không có ý nghĩa thống kê.

Điều trị kết hợp:

Tổ hợp của H2L5 hIgG4PE với ipilimumab (0,01mg/kg cùng với ipilimumab 3mg/kg; Nhóm #8) thể hiện mức ức chế phát triển khối u và tỷ lệ sống sót của chuột có thể quan sát được nhưng cũng không có ý nghĩa thống kê. H2L5 hIgG4PE kết hợp với ipilimumab (0,04mg/kg cùng với ipilimumab 3mg/kg; Nhóm #9) đã chứng tỏ mức ức chế đáng kể sự phát triển khối u ($p<0,00$) và gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót của chuột ($p<0,04$) khi so sánh với mẫu đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1 hoặc đối chứng chất isotyp nhóm #2 ($p<0,02$). Tuy nhiên, so với mẫu đối chứng isotyp, tỷ lệ sống sót cũng không có ý nghĩa thống kê. Hoạt tính kết hợp không đạt đến ý nghĩa thống kê so với nhóm liệu pháp đơn trị bằng ipilimumab#3 hoặc nhóm liệu pháp đơn trị bằng H2L5 hIgG4PE.

H2L5 hIgG4PE (0,01mg/kg hoặc 0,04mg/kg) kết hợp với pembrolizumab (5mg/kg), Nhóm #10 và #11, có mức ức chế đáng kể sự phát triển khối u ($p \leq 0,03$) và sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót của chuột được quan sát ($p < 0,03$) khi so sánh với mẫu đối chứng chất dẫn thuốc nhóm #1. Khi so sánh với mẫu đối chứng isotyp nhóm #2, mức ức chế phát triển khối u vẫn có ý nghĩa thống kê với lượng 0,04mg/kg H2L5 hIgG4PE kết hợp với pembrolizumab ($p < 0,03$). Tuy nhiên, lợi ích về tỷ lệ sống sót không có ý nghĩa thống kê. Liệu pháp kết hợp không có ý nghĩa thống kê so với từng nhóm liệu pháp đơn trị bằng pembrolizumab, nhóm #3, hoặc bằng H2L5 hIgG4PE nhóm #5 hoặc #6. Do đó, H2L5 hIgG4PE được kết hợp với pembrolizumab (0,01 hoặc 0,04mg/kg cùng với pembrolizumab 5mg/kg) chứng tỏ sự gia tăng về mức ức chế phát triển khối u và tỷ lệ sống sót của chuột nhưng cũng không có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng isotyp hoặc các liệu pháp đơn trị.

Quan sát lâm sàng:

Thể trọng chuột giảm sút được quan sát trong nghiên cứu là khoảng 20%. Tình trạng loét khối u được quan sát ở phần lớn các nhóm nghiên cứu.

Cái chết của chuột:

Tổng cộng 91 con chuột được làm an tử do kích thước khối u $> 2000\text{mm}^3$, 34 con chuột được làm an tử do tình trạng loét khối u, và 5 con chuột đã chết. Cái chết của những con chuột này được cho là do độ nhạy của mẫu đối với trạng thái bệnh ở vật chủ chống lại sự cấy ghép.

Thảo luận

Hiệu quả của H2L5 hIgG4PE dưới dạng liệu pháp đơn trị và kết hợp với pembrolizumab cũng như ipilimumab được đánh giá trong mẫu chuột NSG được ghép PBMC từ người với khối u ác tính A2058. Mẫu mà trong đó PBMC từ người được tiêm trong tĩnh mạch vào chuột trưởng thành thiếu hụt NSG (NOD/SCID/IL-2R γ null) được gọi là mẫu Hu-PBMC NSG. Nó gây ra bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép (GvHD) và được sử dụng để nghiên cứu hoạt tính hiệu lực và tế bào T ghi nhớ. Mẫu Hu-PBMC NSG được cấy ghép với dòng tế bào ung thư A2058 từ người dưới da để nghiên cứu tác dụng trị liệu miễn dịch kháng thể từ người đối với sự phát triển của khối u. Các giới hạn của mô hình này bao gồm sự khởi phát các triệu chứng GvHD, suy giảm thể trọng, và tình trạng loét khối u

thường xuyên mà ngăn cản sự theo dõi tỷ lệ sống sót trong khoảng thời gian dài là có thể xảy ra đối với mẫu khối u của chuột đồng ghép.

Các nghiên cứu ban đầu để đánh giá H2L5 hIgG4PE ở liều nằm trong khoảng từ 0,04mg/kg đến 4mg/kg cho thấy rằng các liều nằm trong khoảng thấp hơn có mức ức chế thấp nhất đối với sự phát triển khối u. Sự trì hoãn tiến triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống sót của chuột quan sát được ở nhóm sử dụng liều nằm trong khoảng từ 0,04 đến 0,4mg/kg mặc dù không có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm đối chứng isotyp. Trên cơ sở các nghiên cứu này, liều H2L5 hIgG4PE là 0,04 đến là 0,4mg/kg được chọn cho các đánh giá khác riêng rẽ và kết hợp với pembrolizumab và ipilimumab trong hai nghiên cứu với mảnh ghép PBMC từ hai người cho khác nhau (người cho số 4568 và 6711). Đáp ứng thấp nhất đối với liệu pháp đơn trị bằng H2L5 hIgG4PE và kết hợp với pembrolizumab được quan sát ở một trong số hai nghiên cứu kết hợp được thực hiện. Nghiên cứu kết hợp sử dụng PBMC từ người cho 4568 (Bảng 13, Fig. 20C) đã chứng tỏ hoạt tính chống khối u của liệu pháp đơn trị và kết hợp trong khi nghiên cứu sử dụng PBMC từ người cho 6711 (Bảng 12, Fig. 20B) không thể hiện tác dụng chống khối u đáng kể, điều này có thể là do sự khác nhau về PBMC từ người cho giữa các nghiên cứu, mà phản ánh sự thay đổi đáp ứng của bệnh nhân mà có thể được quan sát trong lâm sàng. Đối với nghiên cứu kết hợp thứ hai này với PBMC từ người cho 4568, mức ức chế phát triển khối u gia tăng và tỷ lệ sống sót của chuột gia tăng được quan sát trong nhóm kết hợp khi so sánh với riêng từng chất, mặc dù sự khác nhau này không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, tác dụng hiệp đồng do kết hợp quan sát được, vì H2L5 hIgG4PE ở liều 0,04mg/kg kết hợp với pembrolizumab 5mg/kg tạo ra sự giảm đáng kể về thể tích khối u về mặt thống kê. Mười ngày sau liều đầu tiên và tỷ lệ sống sót được gia tăng so với nhóm đối chứng isotyp ($p \leq 0,05$), trong khi đó liệu pháp đơn trị không có tác dụng này. Trên thực tế, 50% số chuột trong nhóm kết hợp H2L5 hIgG4PE và pembrolizumab được duy trì trong nghiên cứu đến ngày 33, nhưng bị loại bỏ do tình trạng loét khối u. Chỉ bốn con chuột bị loại bỏ ra khỏi nghiên cứu khỏi nhóm kết hợp này do thể tích khối u, trong khi đó 8 đến 9 con chuột bị loại bỏ khỏi nghiên cứu trong các nhóm pembrolizumab và isotyp.

Liệu pháp kháng PD1 không cho thấy hoạt tính có ý nghĩa thống kê trong mẫu này ví chỉ quan sát thấy sự thay đổi rất hạn chế đối với sự phát triển khối u và tỷ lệ sống sót với nhóm được xử lý bằng pembrolizumab so với nhóm được xử lý bằng isotyp. Liệu pháp đơn trị với Ipilimumab thể hiện xu hướng ức chế phát triển khối u tốt hơn ở mức thấp nhất so

với pembrolizumab trong cả hai nghiên cứu, và thể hiện sự gia tăng có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ sống sót so với isotyp trong nghiên cứu kết hợp thứ hai với người cho đáp ứng PBMC 4568 ($p \leq 0,04$). H2L5 hIgG4PE ở liều 0,01mg/kg kết hợp với ipilimumab 3mg/kg có sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót so với ipilimumab ($p \leq 0,02$), nhưng không tăng đáng kể so với liệu pháp đơn trị bằng H2L5 hIgG4PE. Không có tác dụng bổ sung đáng kể nào đối với thể tích khối u quan sát được với tổ hợp H2L5 hIgG4PE và ipilimumab trong mô hình này so với riêng từng chất. Chuột từ tất cả nhóm điều trị bao gồm nhóm chất dẫn thuốc và nhóm đối chứng isotyp đã chết như được báo cáo ở các bảng về cái chết của chuột. Cái chết của những con chuột này được cho là do độ nhạy của mẫu đối với trạng thái bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, và không liên quan đến chế độ điều trị.

Ví dụ 12: Hoạt tính chức năng của kháng thể chủ vận kháng ICOS từ chuột riêng rẽ và kết hợp với kháng thể kháng PD1 và kháng CTLA-4 in vivo

Mẫu khối u ở chuột đồng ghép CT26 và EMT6

Mẫu ung thư biểu mô ruột kết ở chuột CT26

PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu này được thực hiện theo phương pháp mà được phê duyệt bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật từ thiện GSK trước khi thực hiện nghiên cứu.

Động vật

Trong nghiên cứu này 164 con chuột BALB/c cái từ Harlan Sprague Dawley. Những con chuột 6-8 tuần tuổi vào thời điểm bắt đầu nghiên cứu nếu chúng được cấy chuyển.

Nuôi cấy tế bào và cấy chuyển

Một lọ nhỏ chứa tế bào CT-26 (ATCC: CRL-2638) (3×10^6 tế bào; P-11) được rã đông từ -140°C và được cho vào đĩa RPMI với 10% FBS. Tế bào được nuôi cấy sơ bộ 3 lần trong 10 ngày. Trypsin/EDTA được sử dụng để tạo thuận lợi cho việc tách tế bào khỏi bình nuôi cấy trong quá trình nuôi cấy sơ bộ. Tế bào được thu gom, được rửa hai lần, và được tạo huyền phù lại trong RPMI mà không có FBS với lượng 5×10^5 tế bào/ml. Chuột được cấy chuyển dưới da với lượng 0,1ml tế bào (5×10^4 tế bào/con chuột) trên phần hông sau bên phải.

Vào ngày thu gom tế bào và cấy chuyển, việc đếm tế bào được thực hiện trên thiết bị Beckman Coulter Vi-cell XR và được thử nghiệm bằng huyết cầu kế. Tế bào được tách

khởi bình bằng trypsin/EDTA và được rửa hai lần, đầu tiên bằng RPMI +10%FBS và sau đó chỉ bằng RPMI và được tạo huyền phù lại trong 10ml RPMI. 178×10^6 tế bào được thu gom trong 20ml RPMI với tỷ lệ sống sót là 98,8%. 1,685ml huyền phù tế bào (tổng 15×10^6 tế bào) được bổ sung vào 28,315ml RPMI.

15×10^6 tế bào/30ml môi trường = 5×10^5 tế bào/ml. Lượng này tương đương với 5×10^4 tế bào/100 μ L.

Chế phẩm kháng thể và điều chế

Kháng thể được pha loãng từ lọ gốc đến nồng độ mong muốn trong nước muối 0,9% vô trùng vào ngày định liều. Dòng C398.4 chủ vận kháng ICOS được thử nghiệm với lượng 0,05mg/kg và 0,5mg/kg. Mỗi liều còn được thử nghiệm với cả kháng thể kháng PD1 10mg/kg và kháng CTLA-4 1mg/kg.

Quy trình thử nghiệm

Quan sát khối u và định liều

Chuột được cấy chuyển vào ngày 0. Vào ngày 11, thể trọng và thể tích khối u được đo. Chuột được chọn ngẫu nhiên vào 12 nhóm nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 14 với 10 con chuột/nhóm theo kích thước khối u. Việc chọn ngẫu nhiên được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Studylof Study Director. Chuột được định liều trên cơ sở biểu đồ thiết kế nghiên cứu hai lần mỗi tuần bắt đầu vào ngày ngẫu nhiên và liên tục với tổng 6 liều. Việc định liều trong màng bụng (IP) trong 100 μ L thể tích chất dẫn thuốc là nước muối 0,9%. Thể tích khối u và thể trọng được xác định 3 lần mỗi tuần trong suốt nghiên cứu.

Thời điểm kết thúc

Chuột bị loại khỏi nghiên cứu do trọng lượng khối u nếu thể tích khối u lớn hơn 2000mm³. Thể tích khối u được xác định bằng cách sử dụng phép đo bằng thước cặp chiều dài và chiều rộng theo công thức sau: $TV = 0,52 * L * W^2$.

Ngoài ra chuột bị loại khỏi nghiên cứu nếu khối u phát triển tình trạng loét hở. Tình trạng loét được quan sát trong suốt thử nghiệm, tuy nhiên riêng trường hợp các vết loét đóng thì không kết thúc trừ khi chúng tạo ra các lỗ hở.

Mặc dù không áp dụng cho con chuột bất kỳ trong nghiên cứu này, điểm kết thúc thứ ba được thiết lập ở thời điểm bắt đầu của nghiên cứu là việc giảm 20% thể trọng.

Thuốc và vật liệu

Kháng thể	Nhà cung cấp	Danh mục #	Nhóm	Dòng
ICOS	Biolegend	93108	B205973	C398.4
PD1	BioXcell	BE0146	5792-10/0815B	RMP1-14
CTLA-4	BioXcell	BE0164	5632-4/0715	9D9
Chuột nhắt IgG2b	BioXcell	BE0086	4700/1014	MCP-11
Chuột IgG2a	BioXcell	BE0089	5679-6/0815	2A3
Chuột đồng IgG	Biolegend	92257	B205974	HTK888

Tất cả các kháng thể được pha loãng đến nồng độ mong muốn trong nước muối 0,9% và nước muối được sử dụng làm đối chứng chất dẫn thuốc.

Phân tích dữ liệu

Sự kiện xảy ra đối với phân tích tỷ lệ sống sót là thể tích khối u là 2000mm³ hoặc tình trạng loét khối u, tùy thuộc vào điều gì xảy ra trước. Thời điểm chính xác cho thể tích ngưỡng được ước lượng bằng cách lấy khớp đường thẳng tuyến tính giữa logarit (log) thể tích khối u và ngày của hai lần quan sát, ngày quan sát thứ nhất là ngày mà vượt quá thể tích ngưỡng và ngày quan sát còn lại là ngay trước thể tích ngưỡng. Phương pháp Kaplan-Meier (KM) được thực hiện để ước lượng tỷ lệ sống sót của các nhóm điều trị khác nhau ở thời điểm xác định. Thời gian trung bình và khoảng tin cậy 95% tương ứng của nó được báo cáo. Sau đó, đường cong tỷ lệ sống sót KM giữa hai nhóm bất kỳ có khác nhau về mặt thống kê hay không được thử nghiệm bằng thử nghiệm log-rank.

Thể tích khối u vào 17 ngày sau khi bắt đầu định liều giữa các nhóm điều trị khác nhau được so sánh. Trước khi phân tích, thể tích khối u được chuyển dạng logarit tự nhiên do sự khác biệt về phương sai giữa các nhóm điều trị khác nhau. ANOVA sau đó là so sánh từng nhóm được thực hiện đối với dữ liệu được chuyển dạng logarit.

Bảng 14: Nhóm nghiên cứu

Nhóm Số	Chế độ điều trị
1	Nước muối
2	IgG2b từ chuột 20 μ g + IgG từ chuột đồng 10 μ g
3	IgG2a từ chuột 200 μ g + IgG từ chuột đồng 10 μ g
4	IgG từ chuột đồng 10 μ g
5	ICOS 1 μ g
6	ICOS 10 μ g
7	CTLA-4 20 μ g
8	PD1 200 μ g
9	ICOS 1 μ g + CTLA-4 20 μ g
10	ICOS 10 μ g + CTLA-4 20 μ g
11	ICOS 1 μ g + PD1 200 μ g
12	ICOS 10 μ g + PD1 200 μ g

Giá trị p thô, cũng như giá trị p được điều chỉnh từ tỷ lệ phát hiện sai (FDR), từ phép so sánh theo ngày đến các sự kiện bằng cách phân tích tỷ lệ sống sót và so sánh thể tích khối u được chuyển dạng logarit ở ngày 10 giữa các nhóm điều trị được thể hiện trong bảng trên đây. Phép so sánh, sử dụng giá trị p được điều chỉnh theo $FDR \leq 0,05$, thể hiện ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Việc theo dõi cái chết của chuột cho thấy rằng các con chuột bị loại khỏi nghiên cứu với trọng lượng khối u và tình trạng loét khối u. Tất cả chuột còn lại là không còn khối u vào ngày nghiên cứu 61 ngoại trừ 1 con chuột trong G7 mà có thể tích khối u là 579,16mm³.

Đối với tỷ lệ sống sót (thời gian đến điểm kết thúc) nhóm 9 và 12 thể hiện sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót so với nhóm đối chứng chất dẫn thuốc (lần lượt có $p=0,008$ và $p=0,001$). Nhóm 12 thể hiện tỷ lệ sống sót kéo dài có ý nghĩa thống kê so với nhóm 2, 4, và 5 ($p=0,006$, 0,001, 0,02). Tuy nhiên, không nhóm kết hợp nào thể hiện tỷ lệ sống sót gia tăng có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với liệu pháp đơn trị (Fig. 21).

Thảo luận

Các nhóm trị liệu kết hợp, cụ thể là kết hợp kháng ICOS và kháng PD1 liều cao (Nhóm 12), đã chứng tỏ mức ức chế phát triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống sót so với liệu pháp đơn trị và nhóm đối chứng isotyp, mặc dù ý nghĩa thống kê không đạt được ở ngày 61. Mẫu đối chứng isotyp đối với nhóm 12 là nhóm IgG2a từ chuột + IgG từ chuột đồng. 3. Nhóm với liệu pháp đơn trị để so sánh là ICOS 10 μ g (nhóm 6) và PD1 200 μ g (nhóm 8). Tổng 5 con chuột vẫn không có khối u trong nhóm 12 so với 1 con trong nhóm 3, 1 con trong nhóm 6 và 1 con trong nhóm 8. Lợi ích về tỷ lệ sống sót được định lượng bằng cách chọn ngày mà mỗi con chuột đạt được bất kỳ một trong số các điểm kết thúc nghiên cứu được xác định trước. Các con chuột bị loại khỏi nghiên cứu vì tình trạng loét khối u hở và không phải do trọng lượng khối u.

Trong nhóm kết hợp ICOS + CTLA-4 liều cao (nhóm 10), các con chuột bị loại bỏ gia tăng do tình trạng loét khối u vào ngày 31 mà gây cản trở đối với tỷ lệ sống sót và lợi ích chống khối u mà sự kết hợp này tạo ra. Đối với nhóm này, 5 con chuột bị loại bỏ do tình trạng loét khối u và chỉ 2 con do trọng lượng khối u đạt đến 2000mm³. Tất cả khối u bị loại bỏ do tình trạng loét khối u trong đó vẫn ở kích thước nhỏ nhất khi được loại khỏi nghiên cứu, và tình trạng loét khối u có thể được cho là do kết quả của đáp ứng miễn dịch chống khối u do việc trị liệu tạo ra ở các con chuột này. Ba con chuột được duy trì không còn khối u trong nhóm này đến ngày 61. 2 con chuột bị loại bỏ do trọng lượng khối u là số lượng chuột thấp nhất bị loại bỏ do trọng lượng khối u của tất cả nhóm.

Mẫu khối u ung thư biểu mô vú ở chuột EMT6

Quy trình thử nghiệm

Tất cả các quá trình và tiêu chuẩn an tử được mô tả trong bản mô tả này là theo phương pháp IACUC AUP0606. Con vật được cân và được cấy chuyển trên nửa sau bên phải với 100 μ L 1x10⁵ tế bào khối u EMT6 trên mỗi con chuột. Các con chuột được cấy chuyển bằng với ít nhất 130% mức cần thiết cho nghiên cứu. Giả sử tỷ lệ lỗi (quá to hoặc quá nhỏ ở thời điểm bắt đầu của nghiên cứu) là 0%, mục tiêu là có n=10 đối với mỗi nhóm. Sau khi cấy chuyển tế bào khối u, sự phát triển khối u và tổng thể trọng được xác định 3 lần một tuần bằng thước kẹp điện tử Fowler “ProMax” trong 4 tuần hoặc lâu hơn. Kháng thể mua được từ nhà cung cấp và được pha loãng đến nồng độ mong muốn trong nước muối 0,9%. Định liều (trong màng bụng) được thực hiện mỗi hai tuần, cho tổng 6 liều và được bắt đầu vào ngày ngẫu nhiên, được ký hiệu là ngày 0, nếu giá trị trung bình của thể

tích khối u là khoảng 100 mm³, khoảng 7 đến 8 ngày sau cấy chuyển. Việc chọn ngẫu nhiên được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Studylog Study Director Suite. Chiều dài và chiều rộng của khối u được đo để xác định thể tích khối u bằng cách sử dụng công thức (thể tích khối u = $L * W^2 * 0,52$). Việc đo khối u lớn hơn 2.000 mm³ đối với mỗi con vật để thực hiện việc loại khỏi nghiên cứu. Chuột còn có thể bị loại khỏi nghiên cứu do thể trọng giảm sút (>20%), tình trạng loét khối u, hoặc sự kìm hãm rõ ràng bất kỳ đối với hoạt tính bình thường ở chuột do tỷ lệ mắc bệnh.

Trong nghiên cứu này, tổng 191 con vật được cấy chuyển tế bào EMT6 để tạo ra đủ lượng chuột với khối u có khoảng kích thước mong muốn trong 13 nhóm gồm 10 con chuột như được mô tả trong Bảng 15. Nước muối dẫn thuốc được tiêm vào chuột và nhóm đối chứng isotyp có chức năng làm đối chứng cho chuột được xử lý ICOS, PD1 và CTLA-4 mAb. Mẫu đối chứng isotyp cho ICOS (IgG từ chuột đồng) được định liều với lượng 10µg riêng rẽ và kết hợp với isotyp cho CTLA-4 (con chuột IgG2b) hoặc PD-1 (IgG2a từ chuột). Nhóm với điều trị liệu pháp đơn trị đối với kháng thể kháng CTLA-4 (9D9) và kháng PD-1 (RMP1-14) được định liều, lần lượt, với lượng 20 và 200µg mỗi con chuột và được đánh giá kết hợp với mẫu đối chứng isotyp ICOS. Dòng C398.4 của chất chủ vận ICOS được định liều với lượng 10 và 1µg mỗi con chuột. Hiệu quả của chất chủ vận ICOS còn được đánh giá với lượng 10 và 1µg mỗi con chuột được định liều kết hợp với kháng thể kháng CTLA-4 hoặc kháng PD-1. Nhóm bổ sung của PD-1 và CTLA-4 ở nồng độ như được mô tả được bao gồm làm nhóm so sánh đối chứng dương. Phân tích thống kê thể tích khối u được thực hiện vào ngày 13 sau khi chọn ngẫu nhiên. Phân tích tỷ lệ sống sót được thực hiện cho chuột trong nghiên cứu vào ngày 60.

Bảng 15: Nhóm nghiên cứu

Định liều	Chế độ điều trị 1	Chế độ điều trị 2	n=
Nhóm 1: 1×10^5 tế bào mỗi lần	nước muối		10
Nhóm 2: 1×10^5 tế bào mỗi lần	IgG ở chuột đồng 10 μ g	mIgG2b 20 μ g	10
Nhóm 3: 1×10^5 tế bào mỗi lần	IgG ở chuột đồng 10 μ g	rIgG2a 200 μ g	10
Nhóm 4: 1×10^5 tế bào mỗi lần lần	IgG ở chuột đồng 10 μ g		10
Nhóm 5: 1×10^5 tế bào mỗi lần	ICOS 10 μ g		10
Nhóm 6: 1×10^5 tế bào mỗi lần	ICOS 1 μ g		10
Nhóm 7: 1×10^5 tế bào mỗi lần	CTLA4 20 μ g	IgG ở chuột đồng 10 μ g	10
Nhóm 8: 1×10^5 tế bào mỗi lần	PD-1 200 μ g	IgG ở chuột đồng 10 μ g	10
Nhóm 9: 1×10^5 tế bào mỗi lần	ICOS 10 μ g	CTLA4 20 μ g	10
Nhóm 10: 1×10^5 tế bào mỗi lần	ICOS 1 μ g	CTLA4 20 μ g	10
Nhóm 11: 1×10^5 tế bào mỗi lần	ICOS 10 μ g	PD-1 200 μ g	10
Nhóm 12: 1×10^5 tế bào mỗi lần	ICOS 1 μ g	PD-1 200 μ g	10
Nhóm 13: 1×10^5 tế bào mỗi lần	CTLA4 20 μ g	PD-1 200 μ g	10

Thuốc và vật liệu

Con vật

Chuột BALB/c cái từ 6 đến 8 tuần tuổi mua được từ Harlan Sprague Dawley và được nuôi giữ theo tiêu chuẩn IACUC.

Tế bào EMT6

Tế bào EMT6 được rửa đông và được nuôi cấy trong bình nuôi cấy tế bào trong tám ngày trước khi cấy chuyển. Các tế bào được chuyển qua 3 lần trong giai đoạn này. Vào ngày cấy chuyển, tế bào được lấy khỏi bình trong môi trường hoàn chỉnh. Tế bào được ly tâm và được tạo huyền phù lại trong môi trường Weymouth (với 15% FBS). Bước này được lặp lại 3 lần trong môi trường Weymouth mà không có FBS. Mật độ tế bào và tỷ lệ sống sót được thử nghiệm bằng phương pháp đếm tế bào bằng cách nhuộm xanh trypan. Sau đó, tế bào được pha loãng đến mật độ mong muốn (1×10^6 tế bào mỗi ml).

Trị liệu miễn dịch

Tất cả các chất trị liệu được pha loãng đến nồng độ mong muốn trong natri clorua 0,9% vào ngày định liều và được tiêm trong màng bụng sử dụng đầu kim tiêm 30G. Dung dịch trị liệu và dung dịch pha loãng đối chứng được thể hiện trong Bảng 16 dưới đây.

Bảng 16: Dung dịch pha loãng trị liệu

Rx	Nồng độ ban đầu mg/mL	Nồng độ mong muốn Mg/mL	Dung dịch pha loãng 1:	Liều/con chuột mg	Số con chuột	Thể tích cần thiết ml	Nguyên liệu gốc bổ sung mL	Tổng dung dịch pha loãng ml	Tổng thể tích mL
IgG2b ở chuột	4,46	0,1	44,6	0,02	10	2	0,10	4,36	4,46
IgG2a ở chuột nhất	6,92	1	6,92	0,2	10	2	0,40	2,37	2,77
IgG ở chuột đồng	1,47	0,05	29,4	0,01	50	10	0,40	11,36	11,76
CTLA 4	6,1	0,1	61	0,02	40	8	0,15	9	9,15
PD-1	7,44	1	7,44	0,2	40	8	1,30	8,372	9,672
ICOS	5	0,05	100	0,01	30	6	0,10	9,9	10
ICOS	0,05	0,005	10	0,001	30	6	1,00	9	10

Phân tích dữ liệu

Phân tích thông kê

Sự kiện xảy ra đối với phân tích tỷ lệ sống sót là thể tích khối u là 2000 mm³ hoặc tình trạng loét khối u, tùy thuộc vào điều gì xảy ra trước. Thời điểm chính xác cho thể tích ngưỡng được ước lượng bằng cách lấy khớp đường thẳng tuyến tính giữa logarit thể tích khối u và ngày của hai lần quan sát, ngày quan sát thứ nhất là ngày vượt quá thể tích ngưỡng và ngày quan sát còn lại là ngay trước thể tích ngưỡng. Phương pháp Kaplan-Meier (KM) được thực hiện để ước lượng tỷ lệ sống sót của các nhóm điều trị khác nhau ở thời điểm xác định. Thời gian trung bình và khoảng tin cậy 95% tương ứng của nó được báo cáo. Sau đó, đường cong tỷ lệ sống sót KM giữa hai nhóm bất kỳ có khác nhau về mặt thống kê hay không được thử nghiệm bằng thử nghiệm log-rank.

Thể tích khối u vào 13 ngày sau khi bắt đầu định liều giữa các nhóm điều trị khác nhau được so sánh. Trước khi phân tích, thể tích khối u được chuyển dạng logarit tự nhiên do sự khác biệt về phương sai ở các nhóm điều trị khác nhau. ANOVA sau đó là so sánh giữa từng nhóm sau đó được thực hiện trên dữ liệu được chuyển dạng logarit. Phần mềm phân tích SAS 9.3 và R 3.0.2. được sử dụng.

Kết quả

Chuột Balb/c được cấy chuyển và được chọn ngẫu nhiên vào nhóm mười con chuột theo chế độ điều trị 8 ngày sau đó. Việc sử dụng chất trị liệu hoặc mẫu đối chứng vào ngày ngẫu nhiên (ngày 0) và được tiếp tục hai lần mỗi tuần trong 3 tuần.

Nhóm được xử lý bằng nước muối đã phát triển khối u với tốc độ như mong đợi so với các nghiên cứu EMT-6 trên đây. Tất cả con chuột trong nhóm với nước muối dẫn thuốc được làm an tử do kích thước khối u hoặc tình trạng loét vào ngày 30. Việc điều trị bằng IgG từ chuột đồng riêng rẽ hoặc kết hợp với IgG2a từ chuột hoặc IgG2b từ chuột, không tạo ra sự thay đổi có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình của mức phát triển khối u hoặc tỷ lệ sống sót khi so sánh với nhóm nước muối dẫn thuốc.

Vào 13 ngày sau khi chọn ngẫu nhiên, nhóm với liệu pháp đơn trị ICOS thể hiện sự thay đổi rất nhỏ có thể quan sát được về giá trị trung bình của mức phát triển khối u so với mẫu đối chứng isotyp. Tuy nhiên, nhóm điều trị bằng ICOS liều cao (10µg) cho thấy xu hướng rõ ràng là ức chế sự phát triển khối u nhiều hơn ở nhóm liều thấp. Tác dụng có thể so sánh với hoạt tính đơn trị CTLA-4 được quan sát. Việc điều trị đơn trị bằng PD-1 mAb còn mang lại một số tác dụng có thể quan sát được, nhưng mức giảm không có ý nghĩa thống kê đối với giá trị trung bình của thể tích khối u ở ngày 13. Tuy nhiên, đối với liệu

pháp đơn trị bằng ICOS và CTLA-4, liệu pháp này không gia tăng tỷ lệ sống sót khi so sánh với mức gia tăng tỷ lệ sống sót của nhóm với isotyp thích hợp. Việc điều trị bằng được phẩm kết hợp của kháng thể kháng PD-1 và kháng thể kháng ICOS dòng C398.4 ở liều 10 μ g tạo ra mức ức chế đáng kể đối với sự phát triển khối u so với nhóm đối chứng và nhóm điều trị với liệu pháp đơn trị (Fig. 22). Ba con chuột trong nhóm kết hợp này thể hiện sự loại bỏ khối u hoàn toàn, cải thiện đáng kể so với nhóm đối chứng hoặc nhóm điều trị đơn trị. Tuy nhiên, do tiêu chuẩn thống kê được sử dụng, nên không đạt được sự gia tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ sống sót. Tổ hợp của kháng thể kháng PD-1 với 1 μ g kháng thể chủ vận ICOS dòng C398.4 tạo ra sự giảm có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình của mức phát triển khối u ở ngày 13 so với mẫu đối chứng nước muối dẫn thuốc ($p < 0,05$) và nhóm với liệu pháp đơn trị ICOS ($p < 0,05$) là 1 và 10 μ g. Bốn con chuột từ chế độ điều trị này thể hiện sự loại bỏ khối u hoàn toàn mà thể hiện xu hướng rõ ràng là gia tăng tỷ lệ sống sót mà cũng không có ý nghĩa thống kê.

Kháng thể ICOS ở cả hai liều kết hợp với kháng thể kháng CTLA-4 thể hiện lợi ích rất nhỏ có thể quan sát được trong việc ức chế phát triển khối u hoặc tỷ lệ sống sót so với liệu pháp đơn trị bằng kháng thể.

Thảo luận

Trong khi đối chứng isotyp không tạo ra sự thay đổi đáng kể về giá trị trung bình thể tích khối u hoặc tỷ lệ sống sót nói chung khi so sánh với nhóm nước muối dẫn thuốc, có các con vật trong nhóm IgG từ chuột đồng (nhóm 4) và IgG từ chuột đồng và IgG2a từ chuột (nhóm 3) thể hiện sự phát triển khối u bị trì hoãn. Đối với nhóm isotyp IgG từ chuột đồng và IgG2a từ chuột, một con chuột sống sót ngoài các con chuột với chất dẫn thuốc nước muối, được làm an tử vào ngày 36 do tình trạng loét với khối u được đo có thể tích là 1156,56 mm³. Hai con chuột trong nhóm IgG ở chuột đồng sống lâu hơn so với nhóm nước muối. Một con chuột được làm an tử do kích thước khối u vào ngày 36, và sau đó một con vào ngày 41 do tình trạng loét với thể tích đo được là 1899,28 mm³.

Chế độ định liều của kháng PD-1 với 10 μ g chất chủ vận kháng ICOS giúp ức chế phát triển khối u quan sát được dẫn đến làm giảm thể tích khối u vào ngày 13 khi so sánh với mẫu đối chứng isotyp, mặc dù sự chênh lệch này ít hơn khi so sánh với liệu pháp đơn trị bằng kháng thể kháng PD-1. Tuy nhiên, việc kết hợp dẫn đến tổng năm con vật sống sót ngoài con chuột bất kỳ trong nhóm với liệu pháp đơn trị kháng PD-1, với ba con chuột thể

hiện sự loại bỏ hoàn toàn khối u so với không có bất kỳ con chuột nào trong nhóm với liệu pháp đơn trị kháng PD-1.

Việc kết hợp kháng thể kháng PD-1 với liều 1 μ g kháng thể chủ vận ICOS dẫn đến sự giảm có thể quan sát được về giá trị trung bình của kích thước khối u ở ngày 13 khi so sánh với mẫu đối chứng isotyp và nhóm với liệu pháp đơn trị tương ứng. Mức giảm này là có ý nghĩa thống kê khi so sánh với mẫu đối chứng nước muối dẫn thuốc ($p<0,05$) và nhóm với liệu pháp đơn trị 1 μ g ICOS ($p<0,05$). Bốn con chuột thể hiện sự loại bỏ hoàn toàn khối u và sống sót trừ con chuột bất kỳ trong nhóm với liệu pháp đơn trị PD-1.

Lợi ích về tỷ lệ sống sót được quan sát với nhóm kết hợp ICOS + PD1 không đạt được ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng vào ngày 60. Tuy nhiên, việc ức chế phát triển khối u và lợi ích về tỷ lệ sống sót của nhóm điều trị kết hợp ICOS + PD1 là tương đương với hoạt tính được quan sát với nhóm kết hợp PD1 + CTLA-4, mà được xem là đối chứng dương đối với hoạt tính chống khối u trong nghiên cứu này. Điều này gợi ý rằng tổ hợp kháng thể ICOS và PD1 có thể có tạo ra lợi ích tương tự với tổ hợp CTLA-4 và PD1, mà đã chứng tỏ hoạt tính đáng kể trong lâm sàng ở một số loại khối u.

Trong số 130 con chuột được cho tham gia nghiên cứu này, 12 con chuột vẫn sống sót vào ngày 60 với 11 con chuột thể hiện sự loại bỏ khối u hoàn toàn. Trong số 118 con chuột mà đáp ứng điểm kết thúc cho nghiên cứu loại bỏ, 111 con bị loại bỏ do đạt đến kích thước khối u là 2000 mm³, còn lại bảy con chuột được làm an tử do tình trạng loét trên khối u. Hiện tượng loét lan rộng dần trong nhóm. Tất cả các nhóm 1 (Nước muối), 3 (IgG từ chuột đồng và IgG2a từ chuột), 4 (IgG từ chuột đồng), 6 (1 μ g ICOS), và 10 (CTLA-4 với 1 μ g ICOS) đều có một con chuột bị loại bỏ do tình trạng loét. Nhóm 13 (CTLA-4 + PD-1) có hai con được làm an tử do tình trạng loét. Nhóm còn lại không có con nào bị loại bỏ do tình trạng loét.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein liên kết yếu tố đồng kích thích tế bào T cảm ứng (ICOS) hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa: CDRH1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:1; CDRH2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:2; CDRH3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:3; CDRL1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:4; CDRL2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:5 và CDRL3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:6.
2. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7 và/hoặc vùng V_L chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8, trong đó protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với ICOS từ người.
3. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó là chất chủ vận ICOS.
4. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó protein liên kết ICOS này liên kết với ICOS từ người với:
 - (i) hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}) ít nhất là $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; và hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) là nhỏ hơn $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; hoặc
 - (ii) hằng số phân ly (K_D) là nhỏ hơn khoảng 100 nM,
 trong đó ái lực được xác định bằng BIAcore.
5. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chứa vùng V_H chứa trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO:7 và vùng V_L chứa trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:8.
6. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa khung được chọn từ isotyp IgG1 từ người hoặc biến thể của nó và isotyp IgG4 từ người hoặc biến thể của nó.

7. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó protein liên kết ICOS này hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa khung hIgG4PE.
8. Protein liên kết ICOS theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó protein liên kết ICOS này là kháng thể đơn dòng.
9. Protein liên kết ICOS theo điểm 8, trong đó kháng thể đơn dòng là được nhân hóa.
10. Protein liên kết ICOS theo điểm 8, trong đó kháng thể đơn dòng là hoàn toàn từ người.
11. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chứa trình tự axit amin chuỗi nặng chứa ít nhất 90% trình tự tương đồng với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 23 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ chứa ít nhất 90% trình tự tương đồng với trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO:24.
12. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó chứa trình tự axit amin chuỗi nặng như được thể hiện ở SEQ ID NO:23 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ như được thể hiện ở SEQ ID NO:24.
13. Trình tự axit nucleic mã hóa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.
14. Vector biểu hiện bao gồm trình tự axit nucleic như được xác định ở điểm 13.
15. Tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic theo điểm 13 hoặc vector biểu hiện theo điểm 14.
16. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó được biểu hiện bởi tế bào chủ theo điểm 15.
17. Phương pháp sản xuất protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó như được xác định ở điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc điểm 16, bao gồm các bước:
 - a) nuôi cấy tế bào chủ như được xác định ở điểm 15 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó; và

b) tách protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, nhờ đó tạo ra polypeptit chứa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó.

18. Dược phẩm chứa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc điểm 16 và chất mang dược dụng.

19. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa CDRH1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:1; CDRH2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:2; CDRH3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:3; CDRL1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:4; CDRL2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:5 và CDRL3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:6 để dùng trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết ở người cần điều trị.

20. Dược phẩm chứa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc điểm 16 và chất mang dược dụng để dùng trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết ở người cần điều trị.

21. Protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa CDRH1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:1; CDRH2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:2; CDRH3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:3; CDRL1 như được thể hiện ở SEQ ID NO:4; CDRL2 như được thể hiện ở SEQ ID NO:5 và CDRL3 như được thể hiện ở SEQ ID NO:6 để dùng kết hợp hoặc đồng sử dụng với ít nhất một chất chống ung thư, ít nhất một chất điều biến miễn dịch thứ hai, và/hoặc ít nhất một chất bổ trợ kích thích miễn dịch trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết ở người cần điều trị.

22. Dược phẩm chứa protein liên kết ICOS hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc điểm 16 và chất mang dược dụng để dùng kết hợp hoặc đồng sử dụng với ít nhất một chất chống ung thư, ít nhất một chất điều biến miễn dịch thứ hai, và/hoặc ít nhất một chất bổ trợ kích thích miễn dịch trong việc điều trị bệnh ung thư, bệnh nhiễm trùng và/hoặc nhiễm khuẩn huyết ở người cần điều trị.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Glaxosmithkline Intellectual Property
 Development Limited
 Inserm
 Institut Jean Paoli & Irene Calmettes
 Universite dAix-Marseille
 Centre National De La Recherche Scientifique

<120> PROTEIN LIÊN KẾT YẾU TỔ ĐỒNG KÍCH THÍCH TẾ BÀO T CẢM ỨNG (ICOS) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

<130> PU65846

<150> 62/247,355

<151> 2015-10-28

<150> 62/192,331

<151> 2015-07-14

<150> 62/108,605

<151> 2015-01-28

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Chuột

<400> 1

Asp Tyr Ala Met His

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Chuột

<400> 2

Leu Ile Ser Ile Tyr Ser Asp His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Chuột

<400> 3
 Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột

<400> 4
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột

<400> 5
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột

<400> 6
 Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 7

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

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 8

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

<210> 9

<211> 467

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 9

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

```

      370      375      380
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385      390      395      400
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
      405      410      415
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
      420      425      430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      435      440      445
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      450      455      460
Leu Gly Lys
465

```

<210> 10
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

```

<400> 10
Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1      5      10      15
Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
      20      25      30
Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
      35      40      45
Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
      50      55      60
Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65      70      75      80
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
      85      90      95
Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
      100      105      110
Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
      115      120      125
His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
      130      135      140
Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145      150      155      160
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Met
      165

```

<210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 11

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

<210> 12

<211> 232

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 12

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

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> Chuột

<400> 13

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

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Chuột

<400> 14

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

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 15

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

<210> 16

<211> 451

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 16

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Leu	Ile	Ser	Ile	Tyr	Ser	Asp	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Arg	Ala	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Gly	Arg	Asn	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Gly	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		115					120					125			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	130					135				140					
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 17

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

```

<210> 18

<211> 213

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 18

```

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

```

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 121
<212> PRT
<213> Chuột

<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Met Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Ser Ile Tyr Ser Asp His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Arg Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột

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

<210> 21
 <211> 1401
 <212> DNA
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 21
 atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60
 gtgcagctgg tgccagagcgg agccgaggtg aaaaagcccg gctcaagcgt gaaggtgagc 120
 tgcaaggcca ggggctacac cttcaccgac tacgctatgc actgggtgag gcaggccccc 180
 ggccagggcc tggagtggat gggcctgac agcatctaca gcgaccacac caactacaac 240
 cagaagtcc agggcagggt gaccatcacc gccgataaga gcaccagcac agcctacatg 300
 gagctgagca gcctgaggag cgaagacacc gccgtgtact attgcggcag gaacaactac 360
 ggcaactacg gctggtactt cgacgtgtgg ggccagggaa ccactgtcac cgtgagcagc 420
 gccagcacca agggccccag cgtgttcccc ctggccccct gcagcagaag caccagcgag 480
 agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 540
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgct gcagagcagc 600
 ggccctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 660
 tacacctgca acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagagc 720
 aagtacggcc ctccctgccc cccctgccc ctgagggcgg accctccgtg 780
 ttctgtttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaggtgacc 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagat cccgaggtcc agttcaattg gtacgtggac 900
 ggctgtggagg tgcaaacgc caagaccaag ccccgaggag aacagttcaa cagcacctac 960
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 1020
 tgcaagggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1080
 ggccagcctc gggagcccca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggaaga gatgaccaag 1140
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 1260
 gacggcagct tcttctgtga cagcaggctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 1320
 aacgtcttta gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380
 ctgagccctgt ccctgggcaa g 1401

<210> 22
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> Chuỗi nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 22
 atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgag 60
 attgtgctga cccagagccc cgccaccctg agcctgagcc ccggcgaaag ggcaaccctc 120
 agctgcagcg ccagcagcag cgtgagctac atgcactggt accagcagaa gcccggccag 180
 gcccctaggc tgctgatcta cgacacctcc aagctggcca gcggcatccc agccaggttc 240
 tcaggcagcg gcagcggcac cgactatact ctgaccatca gcagcctgga gcccaggagc 300
 ttgccgtgt actactgctt ccagggaagc ggctaccctt acaccttcgg ccagggcacc 360
 aagctggaga tcaagcgtac ggtggccgcc cccagcgtgt tcattctccc cccagcgat 420

```

gagcagctga agagcggcac cgccagcgtg gtgtgtctgc tgaacaactt ctacccccgg 480
gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaat gccctgcaga gcggcaacag ccaggagagc 540
gtgaccgagc aggacagcaa ggactccacc tacagcctga gcagcaccct gaccctgagc 600
aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgtgagg tgaccaccca gggcctgtcc 660
agccccgtga ccaagagctt caaccggggc gaggtagc 696

```

<210> 23

<211> 448

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 23

```

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

```


	275		280		285										
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
370						375				380					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410				415		
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425				430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
		435					440				445				

<210> 24

<211> 213

<212> PRT

<213> Chuỗi nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi được tổng hợp nhân tạo

<400> 24

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	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
65					70				75					80	
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro
			100					105					110		
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
		115					120					125			
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
						135					140				

Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
145					150					155					160
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				165					170					175	
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
			180					185					190		
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
	195						200					205			
Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
210															

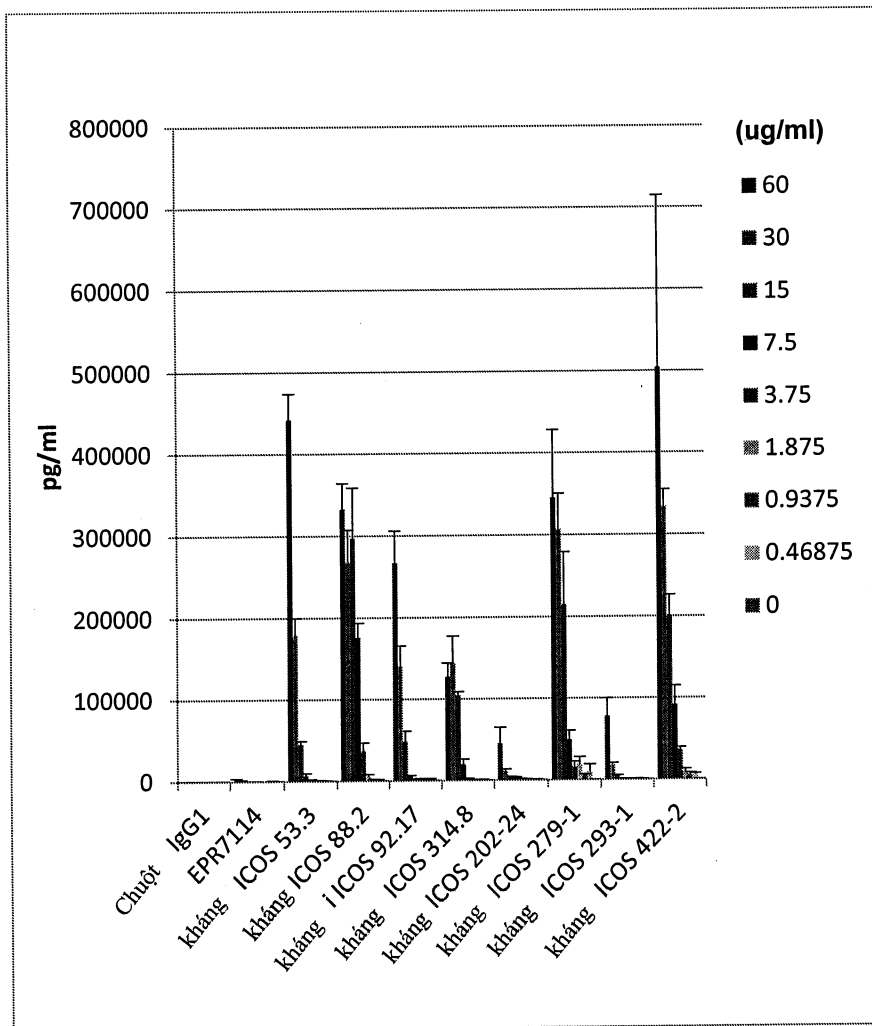
Fig. 1: Sự sản sinh IFN- γ từ tế bào T CD4+CD25

Fig. 2: Sự tăng sinh tế bào T CD4+CD25

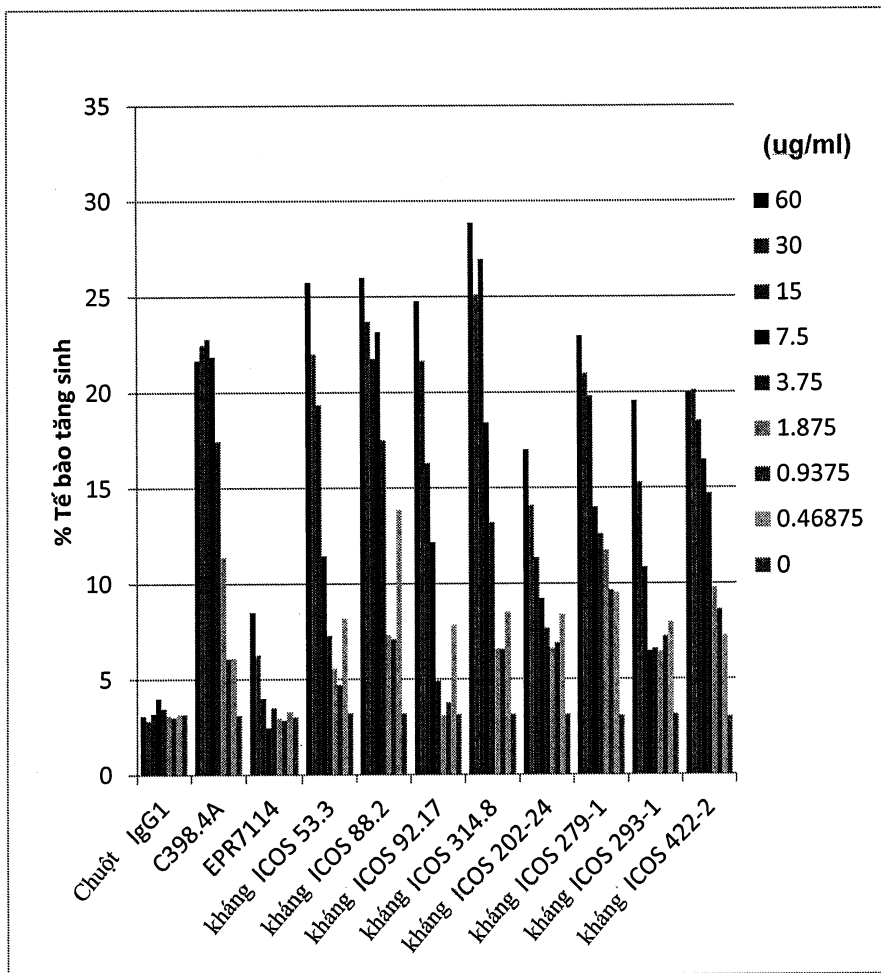
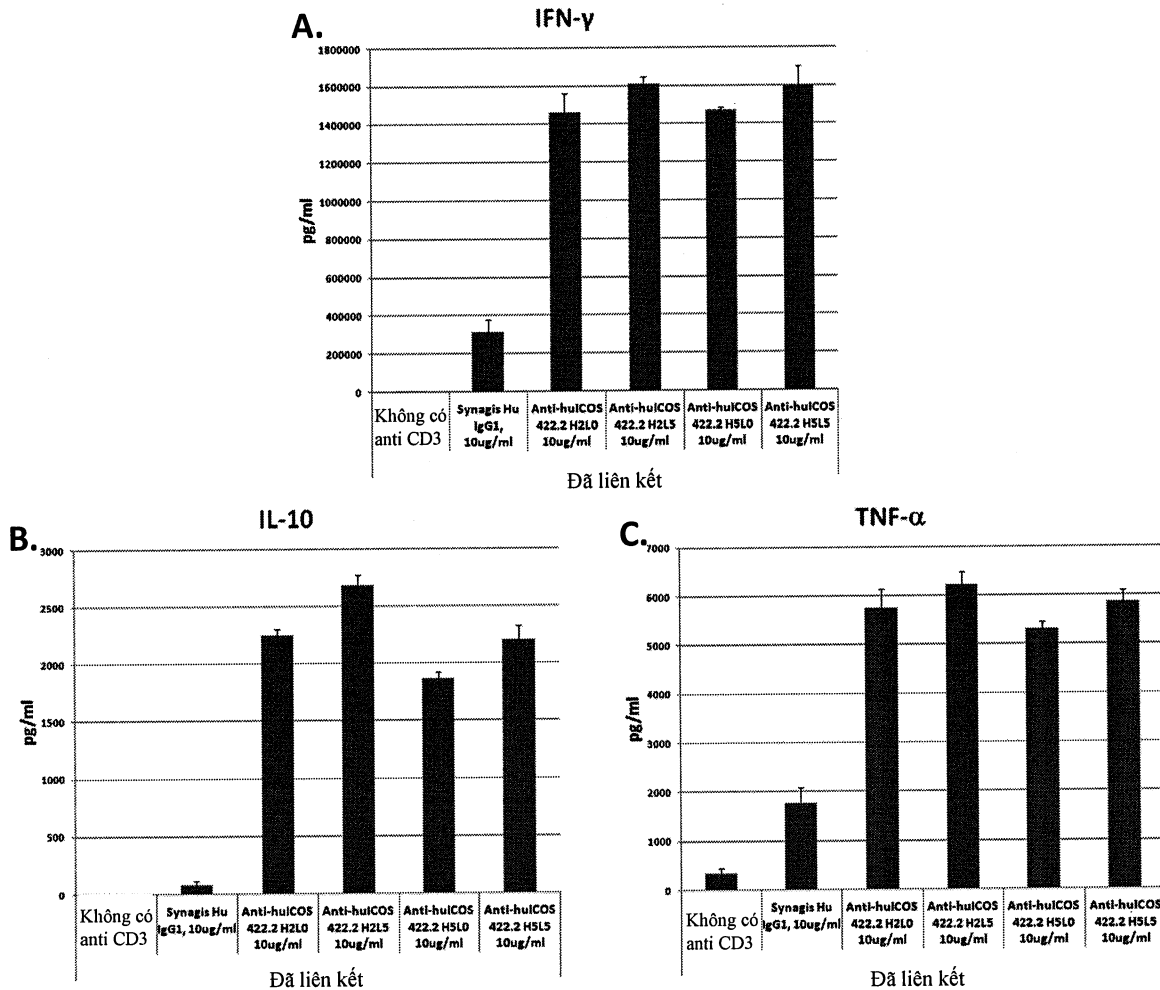
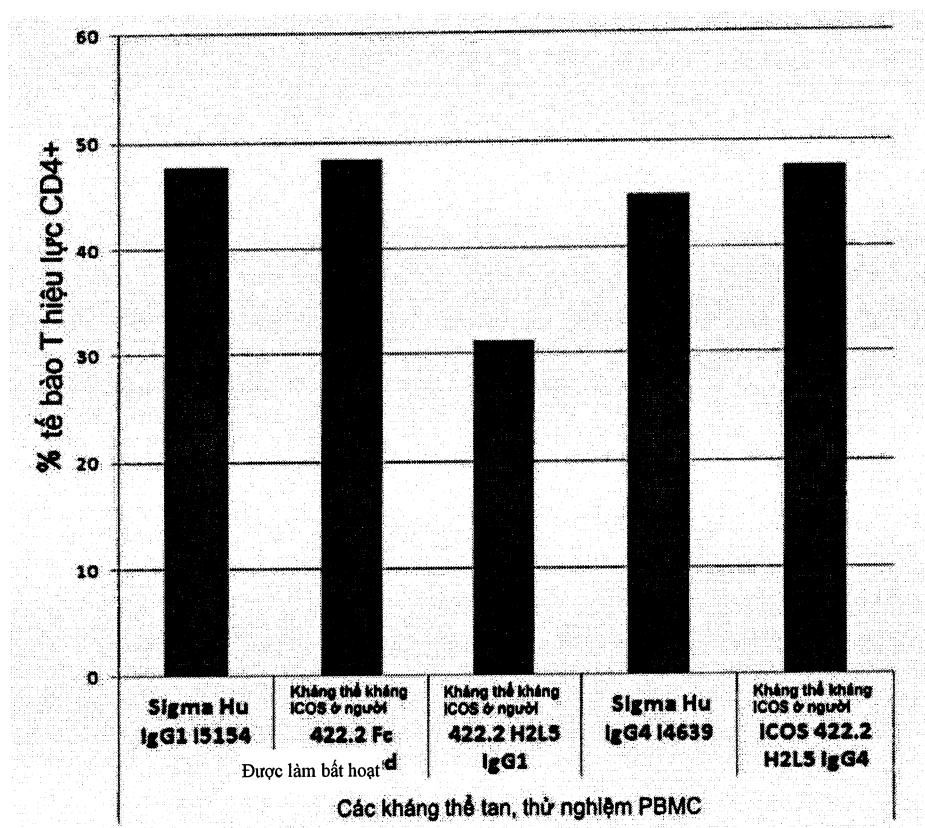


Fig. 3: Biểu thể nhân hóa H2L5 của kháng ICOS 422.2 thể hiện sự sản sinh xytokin tốt hơn ở tế bào PBMC



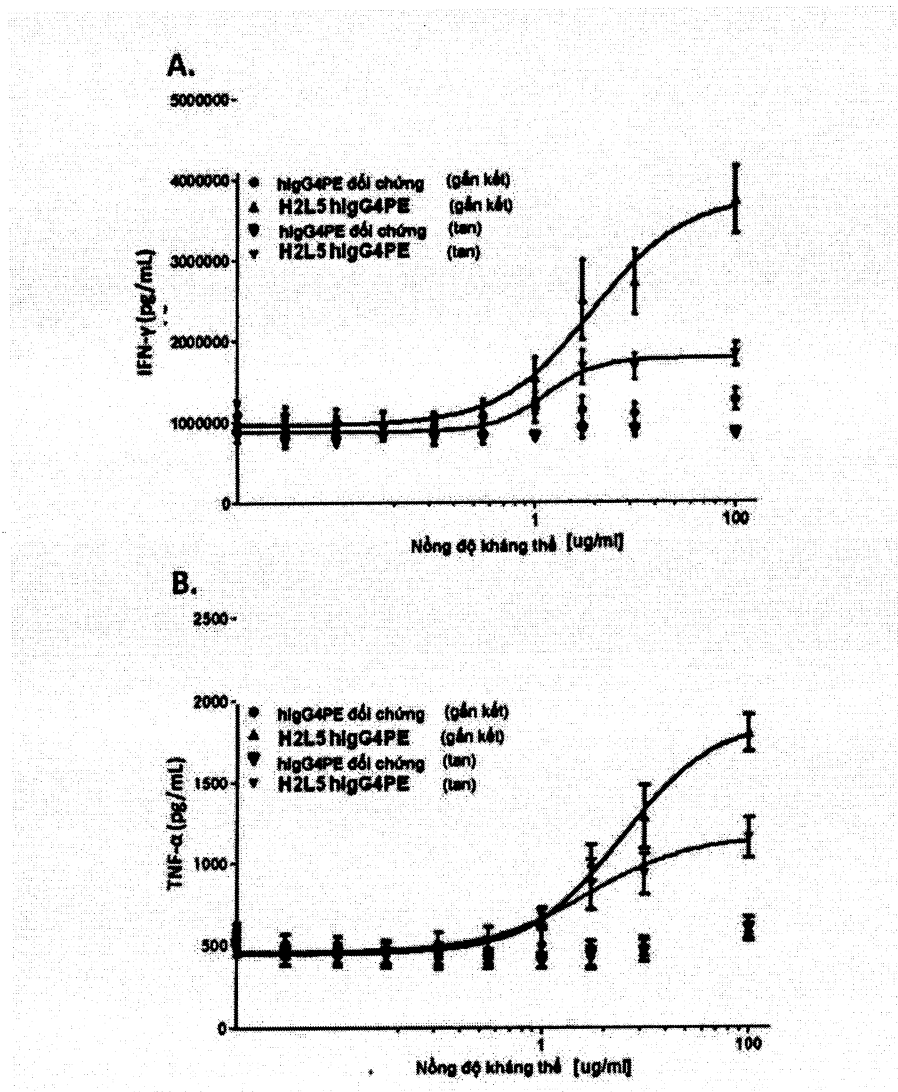
Các PBMC từ người mới được tách từ người cho khỏe mạnh và được hoạt hóa trên các đĩa được phủ trước kháng CD3 (OKT3) và mỗi trong số bốn biến thể nhân hóa kháng ICOS 422.2 tan. Sau khi xử lý 2,5 ngày, lượng IFN- γ (A), IL-10 (B) và TNF- α (C) trong dịch nổi được xác định bằng MSD.

Fig. 4: Tỷ lệ sống sót của tế bào T giảm được cảm ứng bởi 422 H2L5 IgG1 mà không xảy ra đối với các lớp kháng thể hIgG4PE được bất hoạt Fc.



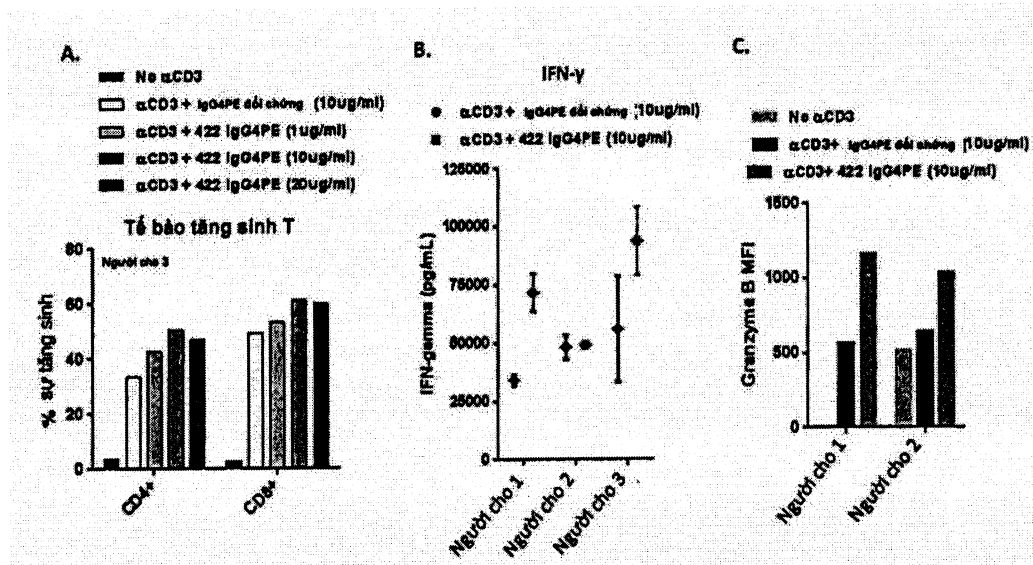
Các PBMC từ người mới được bất hoạt trên các đĩa được phủ trước kháng CD3 (OKT3) và kháng ICOS 422.2 nhân hóa tan có lớp kháng thể Fc khác nhau. Sau khi xử lý 2,5 ngày, phần trăm tế bào T CD4+ sống được xác định bằng cách đếm tế bào theo dòng.

Fig. 5: Đáp ứng liều của H2L5 hIgG4PE cảm ứng sự kích ứng xytokin tiềm viêm ở tế bào T CD4+ từ người.



Tế bào T CD4+ từ người cho khỏe mạnh đã được kích thích sơ bộ bằng kháng CD3/CD28 trong 2 ngày được tái kích thích bằng kháng CD3 (OKT3) cộng với dãy nồng độ của mẫu đối chứng lớp kháng nguyên (Synagis IgG4PE) hoặc H2L5 hIgG4PE mAb ở dạng tan hoặc gắn kết đĩa. Nồng độ (A) IFN- γ và (B) TNF- α trong dịch nổi được xác định bằng MSD sau 3,5 ngày xử lý.

Fig. 6: H2L5 hIgG4PE cảm ứng sự tăng sinh, sản sinh xytokin và khả năng gây độc tế bào tăng ở các PBMC hoạt hóa từ người cho khỏe mạnh



Các tế bào PBMC từ người được kích thích sơ bộ bằng kháng CD3/CD28 trong 2 ngày được tái kích thích bằng CD3 (OKT3) cộng với H2L5 hIgG4PE mAb tan hoặc mẫu đối chứng lớp kháng thể. Sau 2,5 ngày xử lý, mức tăng sinh tế bào T được xác định bằng thử nghiệm CFSE FACS (A). Nồng độ IFN-γ trong dịch nổi được xác định bằng MSD (B). Mức biểu hiện Granzyme B nội bào của tế bào T CD4+ T được xác định bằng cách đếm tế bào theo dòng.

Fig. 7: Thử nghiệm phát hiện cỡ trung bình (MSD) thể hiện sự ức chế liên kết ICOS-L với ICOS bởi H2L5 hIgG4PE, cho thấy nó liên kết với cùng ICOS như ICOS-L và cạnh tranh liên kết

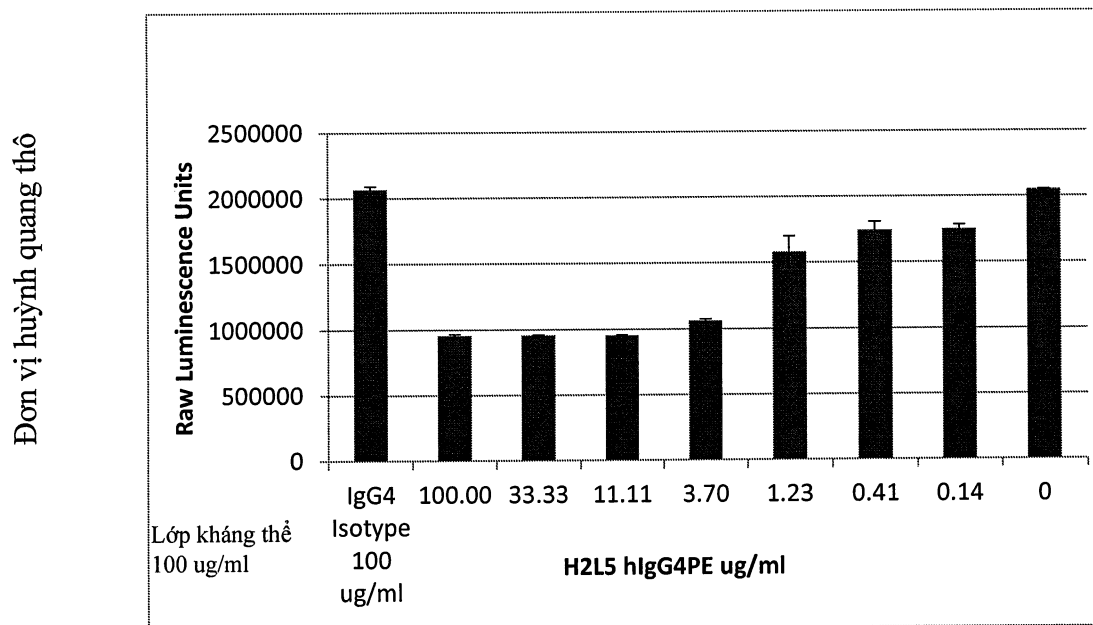


Fig. 8: Gen V_H và V_L kháng thể thu hồi từ RNA của dòng tế bào lai 422.2

422 HC

QVQLQQSGPELVKPGESVKISCMGSGYTFDDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGGKATMTVDKSSSTAY
MELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVWGAGTTVTSS (SEQ ID NO:19)

422 LC

ENVLTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSITSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSEAE
DVATYYCFQGSGLPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:20)

Fig. 9: Trình tự protein có chuỗi nặng và nhẹ của H2L5 hIgG4PE với trình tự tín hiệu

Chuỗi nặng

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISISYSDHTNYN
QKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
 KYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:9)

Chuỗi nhẹ

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARE
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPTYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO:12)

Trình tự tín hiệu được gạch chân kép

Trình tự CDR được gạch chân

S228P, L235E (EU numbering) Substitutions in IgG4

Murine residues incorporated in variable heavy chain framework (Kabat numbering G27Y, S30T, A93G)

Gốc ở chuột được đưa vào khung chuỗi nhẹ biến đổi (đánh số theo Kabat F71Y)

Fig. 10: Trình tự ADN của vùng mã hóa của chuỗi nặng H2L5 hlgG4PE có trình tự tín hiệu

Chuỗi nặng

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGG
 AGCCGAGGTGAAAAAGCCCGGCTCAAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGCTATGC
 ACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCCTGATCAGCATCTACAGCGACCACACCAACTACAAC
 CAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCGCCGATAAGAGCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAG
 CGAAGACACCGCCGTGTACTATTGCGGCAGGAACAACACTACGGCAACTACGGCTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGAA
 CCACTGTACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAG
 AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGAC
 CAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCA
 GCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGAGC
 AAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCC
 CAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCAGAGTCC
 AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTAC
 CGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGG
 CCTGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTA
 CAGCAGGCTGACCGTGGAACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
 ACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:21)

Trình tự dẫn đầu được biểu thị bởi nét gạch chân kép

Fig. 11: Trình tự ADN của vùng mã hóa chuỗi nhẹ H2L5 hIgG4PE có trình tự tín hiệu

Chuỗi nhẹ

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCGAGATTGTGCTGACCCAGAGCCC
 CGCCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAAAGGGCAACCCTCAGCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGCACTGGT
 ACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCTAGGCTGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCAGCGGCATCCCAGCCAGGTTC
 TCAGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTATACTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCTT
 CCAGGGAAGCGGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGT
 TCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGCTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGG
 GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA
 GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGG
 TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO:22)

Trình tự khởi đầu được biểu thị bởi dấu gạch chân kép

Fig. 12: Nồng độ huyết tương của H2L5 hIgG4PE ở khỉ cynomolgus. Các nồng độ được xác định sau khi định liều H2L5 hIgG4PE thứ nhất (A) hoặc thứ hai (B) (ngày 15) of H2L5 hIgG4PE. Con vật được cho ăn từ 48 giờ sau khi định liều thứ hai để thu lấy mẫu và phân tích mô tế bào

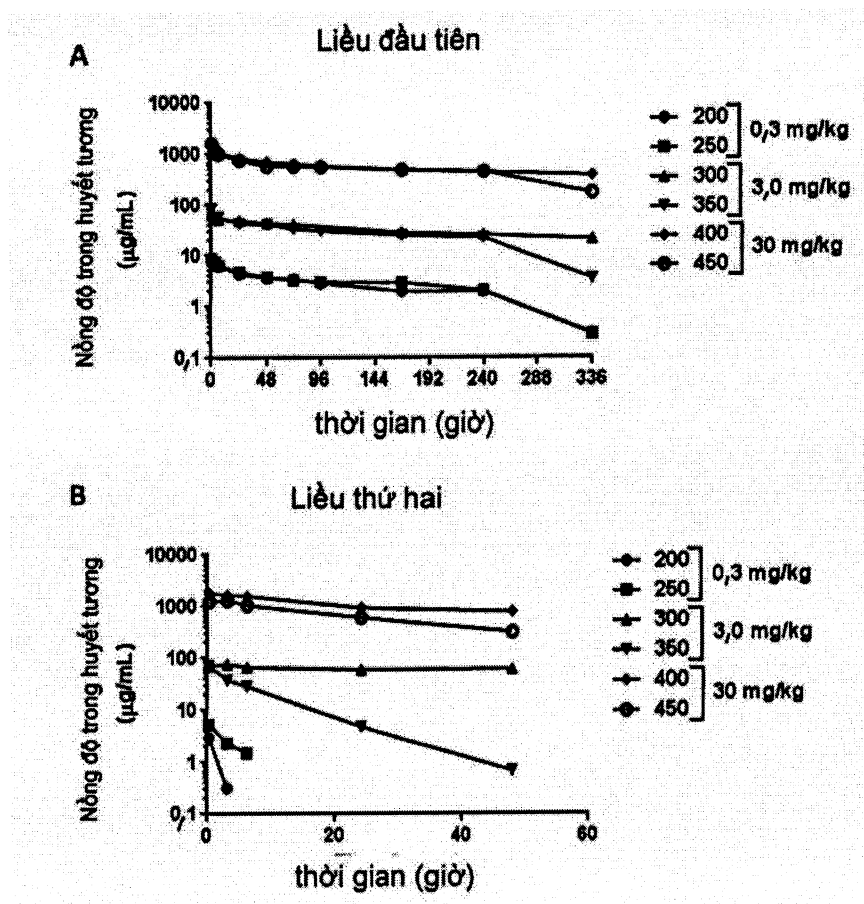


Fig. 13: Dò liên kết H2L5 hIgG4PE với tế bào T CD4⁺ từ lá lách và hạch bạch huyết ở nách của khỉ. Mô được thu gom 48 giờ sau khi định liều thứ hai (Ngày 17).

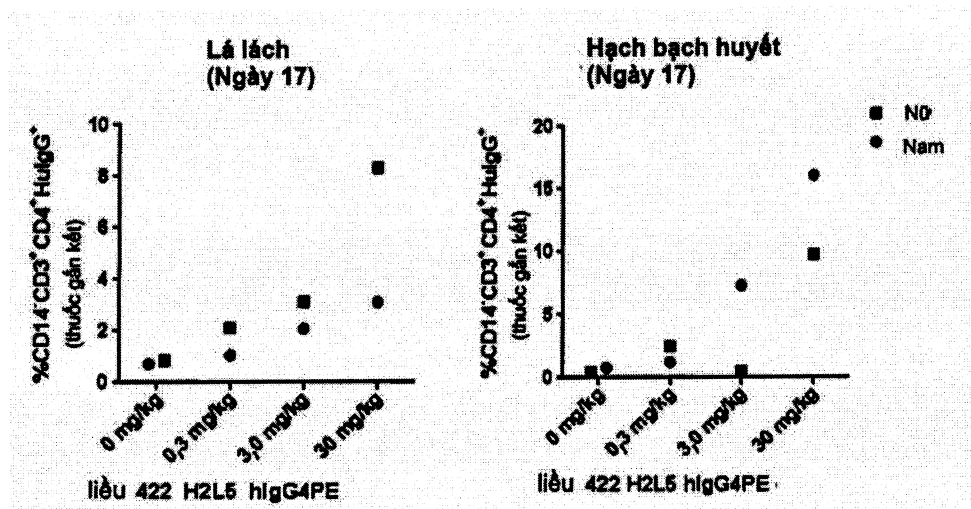


Fig. 14: Sự chiếm giữ thụ thể của H2L5 hIgG4PE trong tế bào T CD4⁺ ở máu từ khi đầu chó.
 (A) “Thụ thể không có” ICOS như được xác định bởi liên kết dương giữa kháng thể được đánh dấu huỳnh quang kháng ICOS được sử dụng để đếm tế bào theo dòng, mà chỉ liên kết nếu H2L5 hIgG4PE không có mặt.
 (B) H2L5 hIgG4PE được liên kết thụ thể trên tế bào CD4⁺ máu ngoại vi như được xác định bởi kháng thể kháng IgG ở người được đánh dấu huỳnh quang.

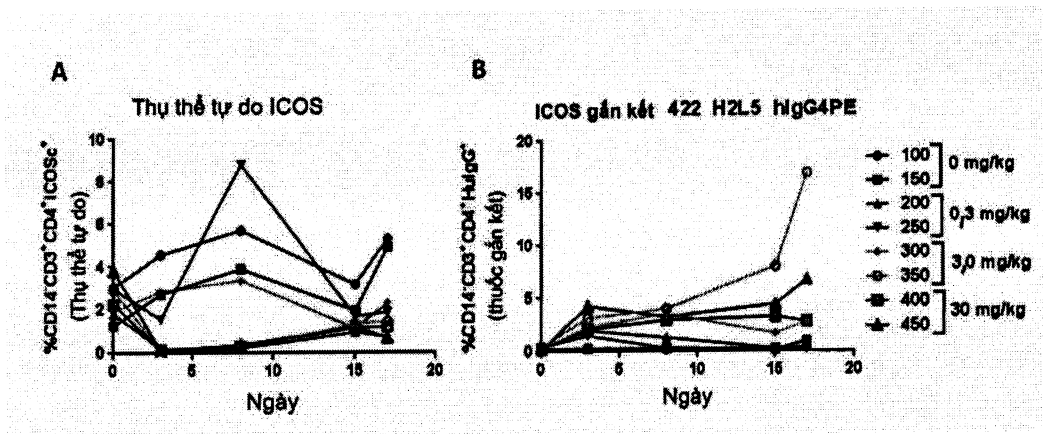


Fig. 15(a) Mức biểu hiện Phospho-AKT (T308) ở tế bào Ba/F3-ICOS được xử lý bằng H2L5 hIgG4PE - Thử nghiệm kháng thể truyền tín hiệu nội bào

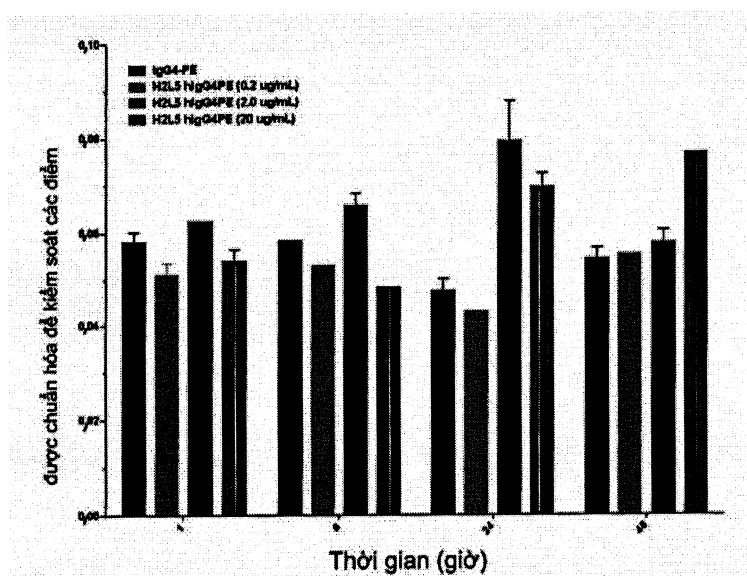


Fig. 15 (b) Mức biểu hiện Phospho-AKT (S473) ở tế bào Ba/F3-ICOS được xử lý bằng H2L5 hIgG4PE - Dây kháng thể truyền tín hiệu nội bào

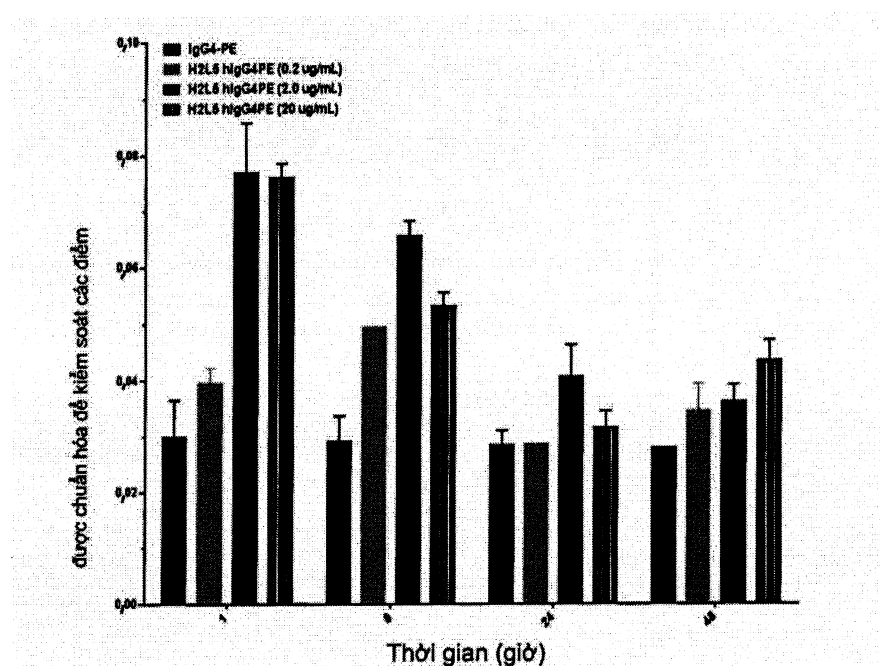


Fig. 16: H2L5 hIgG4PE kết hợp với ipilimumab làm gia tăng mức sản sinh xytokin gây viêm khi so sánh với chế độ điều trị chỉ bằng kháng thể trong thử nghiệm kích thích sơ bộ treatment in PBMC

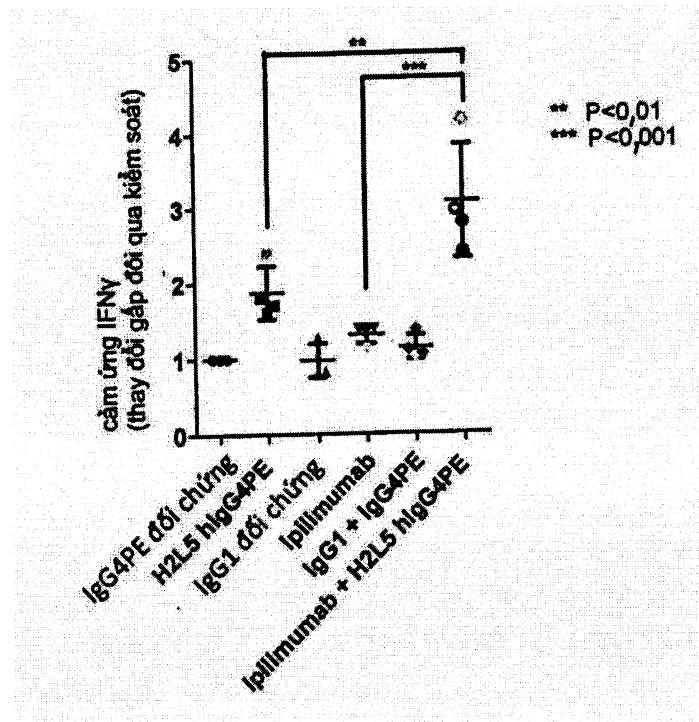


Fig. 17: H2L5 hIgG4PE kết hợp với pembrolizumab làm gia tăng mức sản sinh xytokin gây viêm so với chế độ xử lý chỉ bằng kháng thể ở thử nghiệm kích thích sơ bộ PBMC

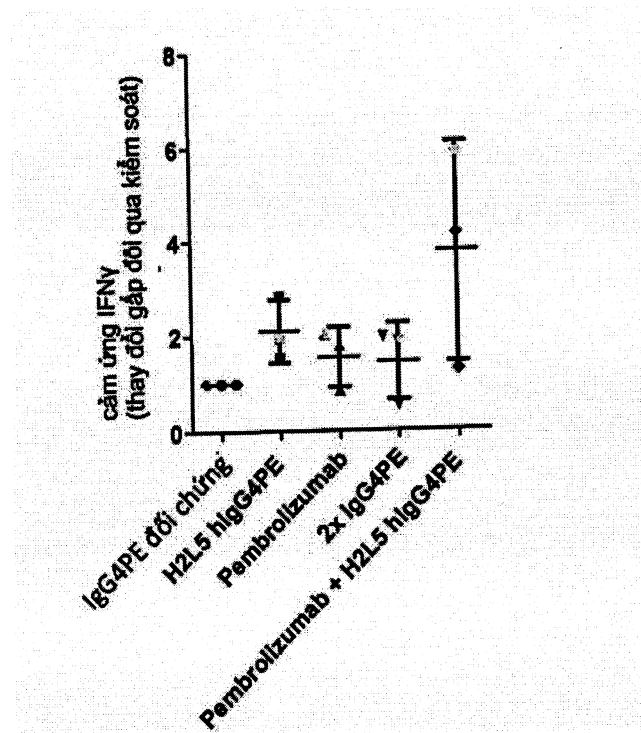


Fig. 18 Hỗn hợp H2L5 hIgG4PE với ipilimumab cảm ứng sự sản sinh xytokin gây viêm gia tăng ở thử nghiệm MLR được biến đổi bằng peptit CEFT và ủ sơ bộ

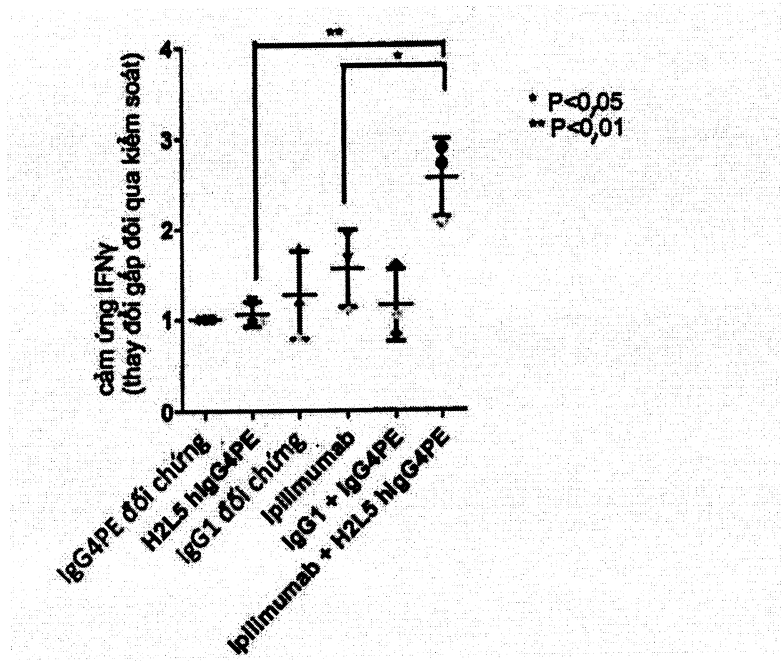


Fig. 19 Hỗn hợp H2L5 hIgG4PE với pembrolizumab cảm ứng sự sản sinh xytokin gây viêm gia tăng ở thử nghiệm MLR được biến đổi bằng peptit CEFT và ủ sơ bộ

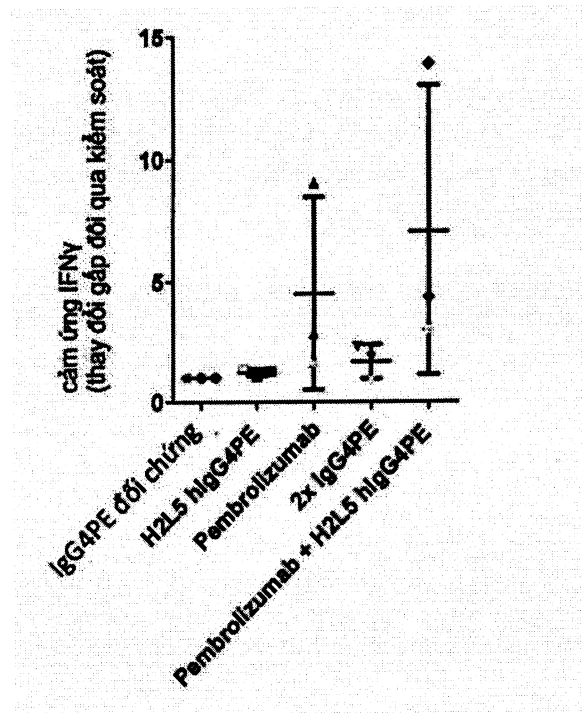


Fig. 20: mAb chủ vận kháng ICOS H2L5 hIgG4PE riêng rẽ và kết hợp với pembrolizumab làm ức chế sự phát triển khối u ở chuột có khối u ác tính PBMC A2058 ở người

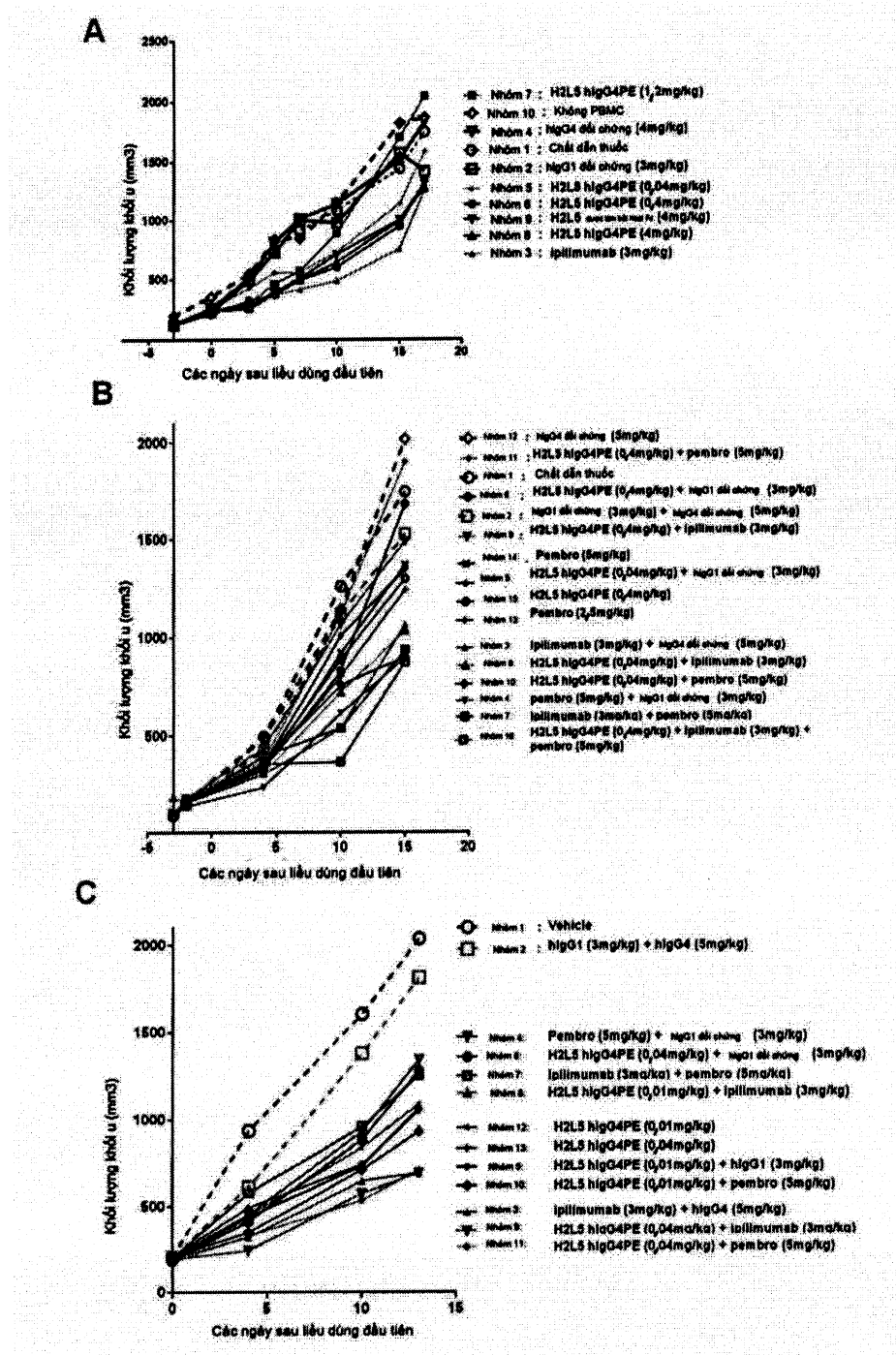


Fig. 21: mAb đại diện ở chuột kháng ICOS gây ức chế sự phát triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống sót đáng kể khi kết hợp với mAb đại diện ở chuột kháng PD1 trong mẫu khối u của chuột CT26

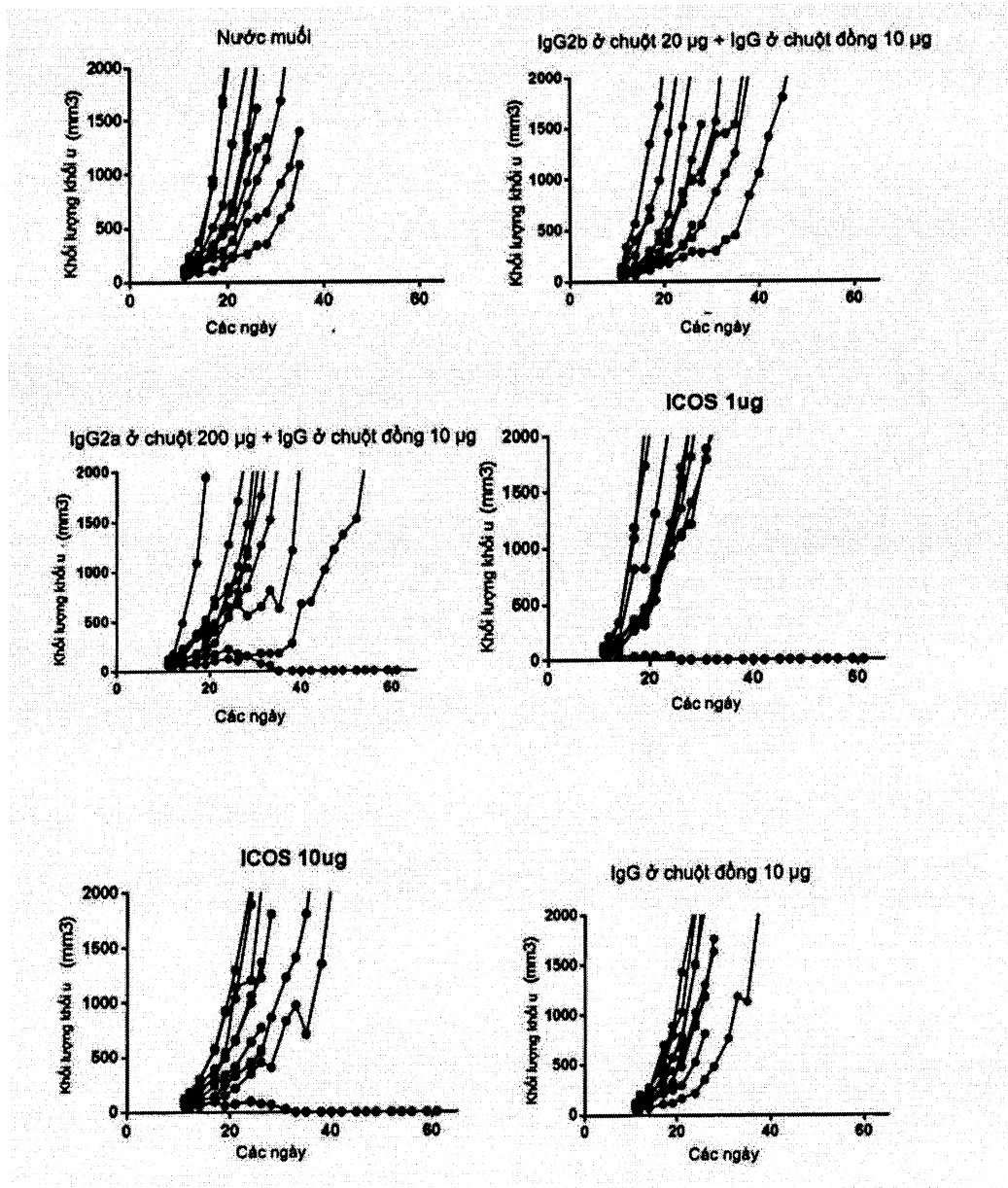


Fig. 21 (Tiếp)

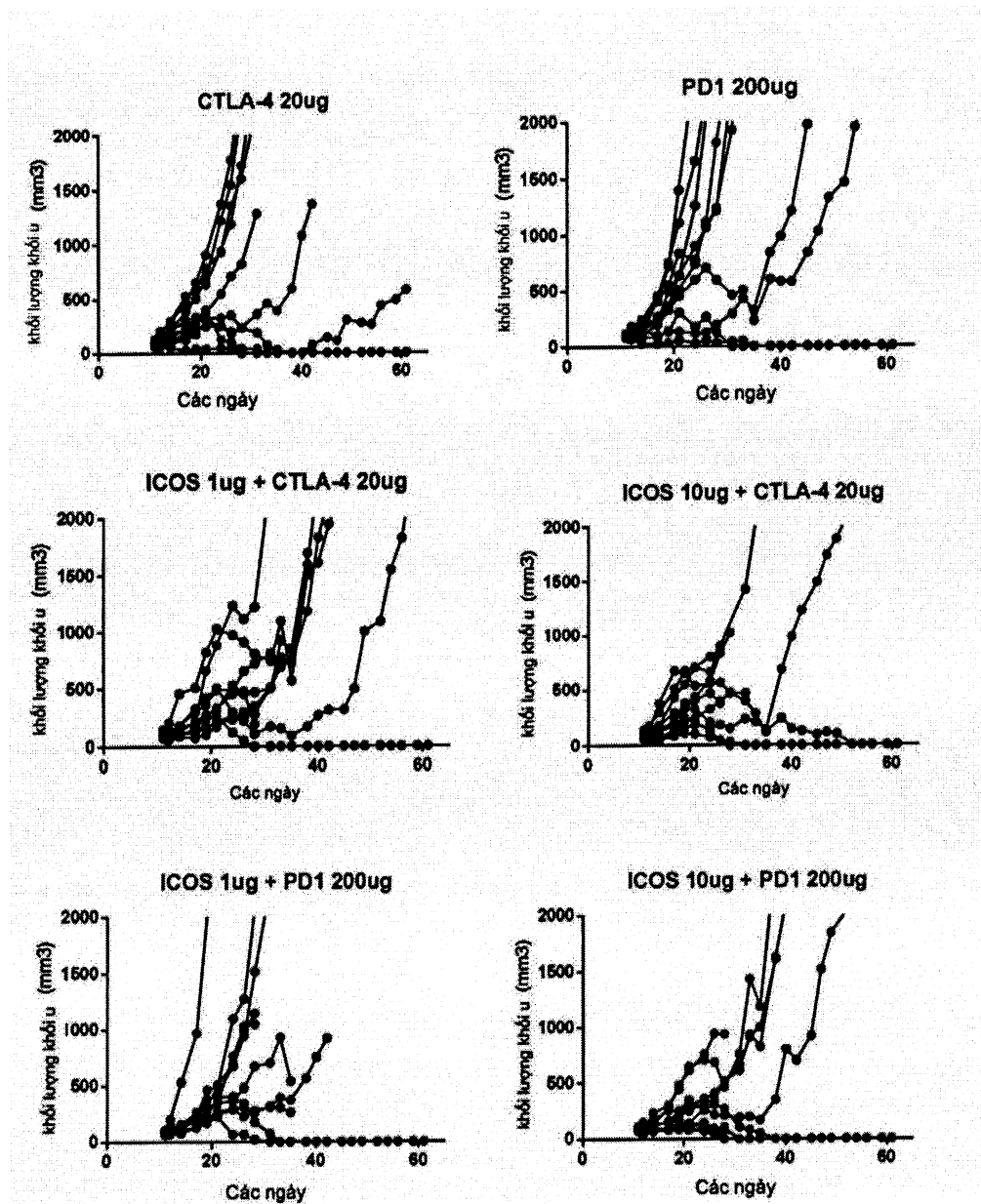


Fig. 22: mAb đại diện ở chuột kháng ICOS gây ức chế sự phát triển khối u và gia tăng tỷ lệ sống đáng kể khi kết hợp với mAb đại diện ở chuột kháng PD1 trong mẫu khối u của chuột EMT6

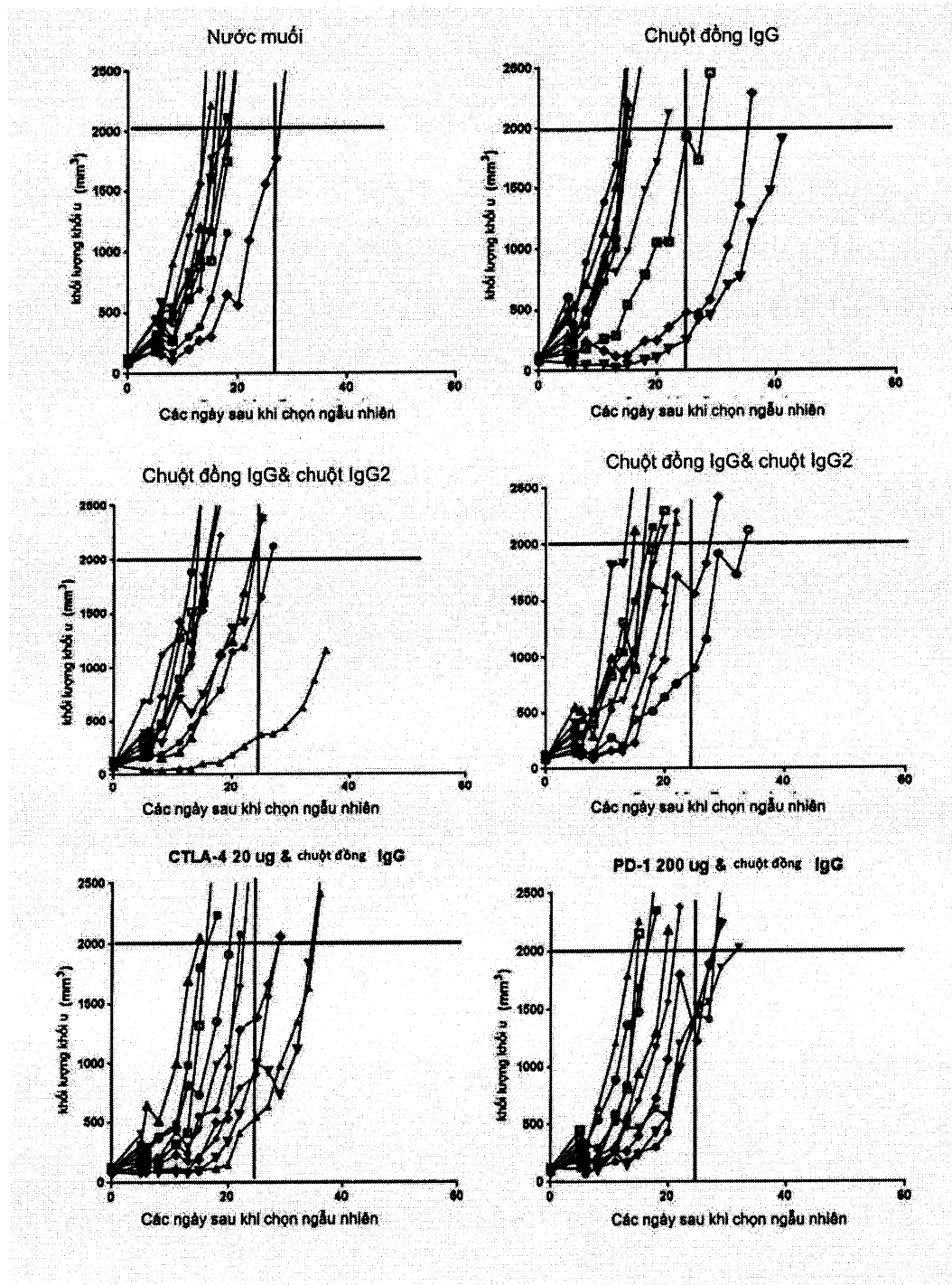


Fig. 22 (tiếp)

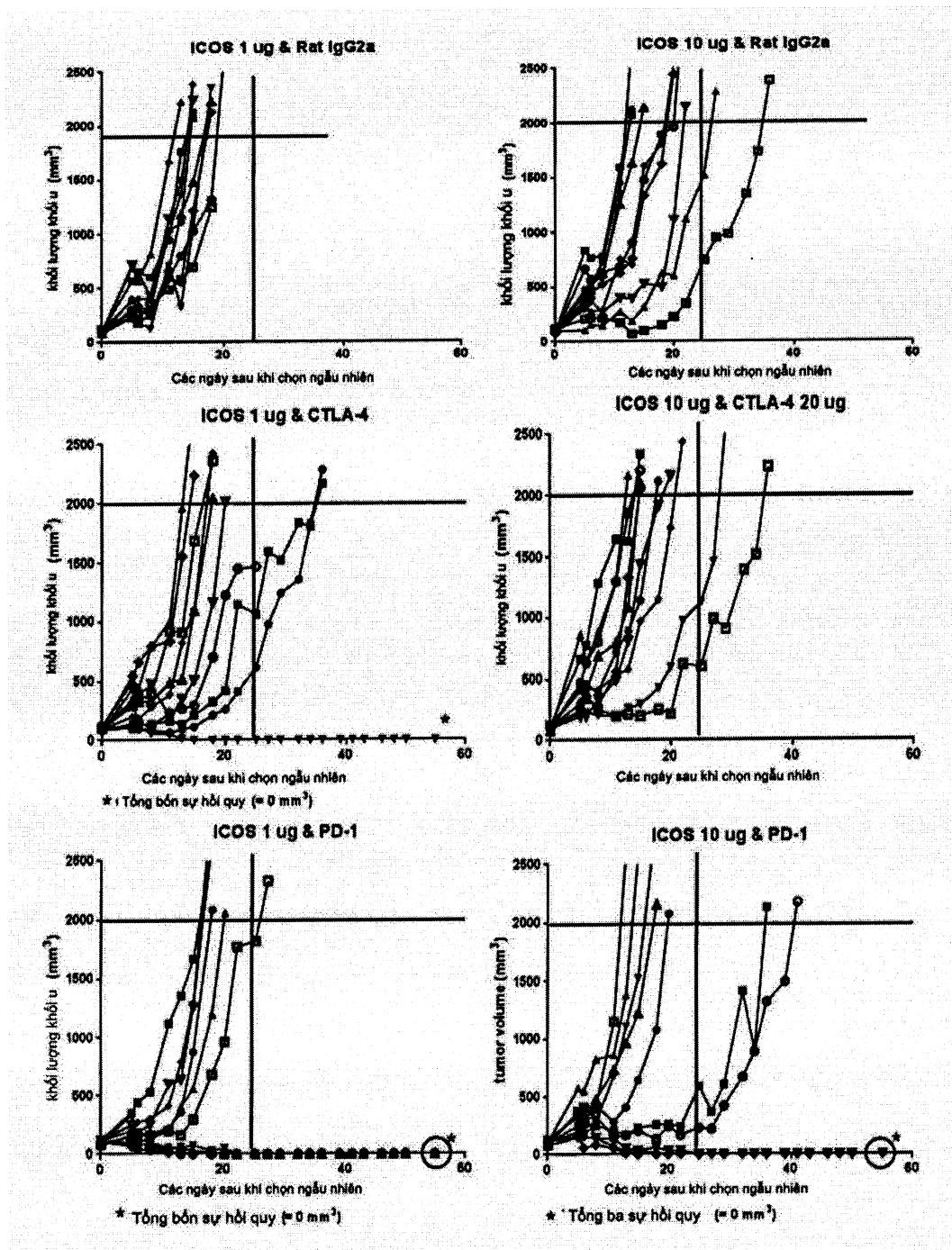


Fig. 22 (tiếp)

