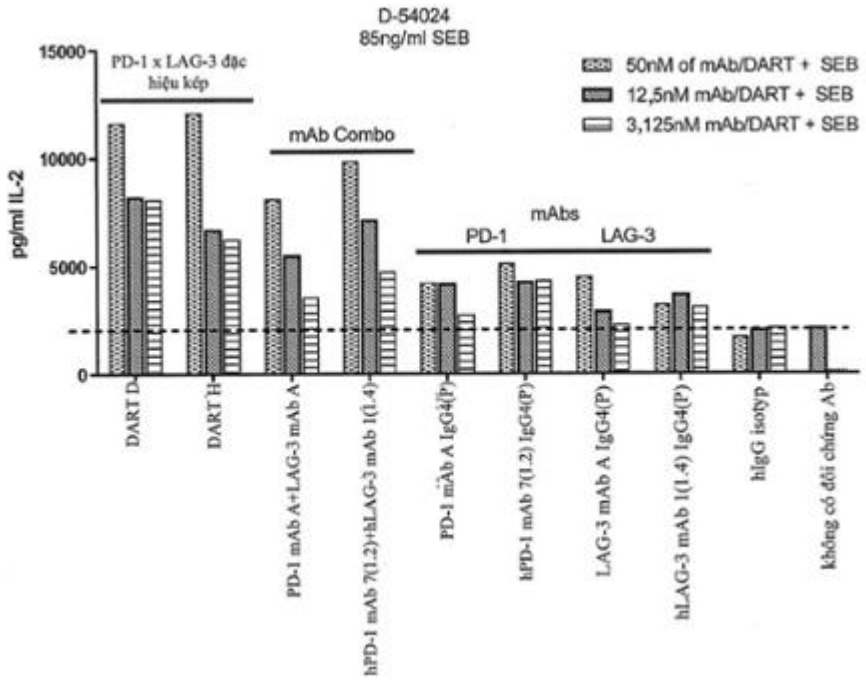
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0032672**
(51)[8] **A61K 39/00**; C07K 16/00; A61K 39/395 (13) **B**

(21) 1-2018-00644 (22) 28/07/2016
(86) PCT/US2016/044430 28/07/2016 (87) WO 2017/019846 02/02/2017
(30) 62/198,867 30/07/2015 US; 62/239,559 09/10/2015 US; 62/255,140 13/11/2015 US; 62/322,974 15/04/2016 US
(45) 25/07/2022 412 (43) 25/09/2018 366A
(73) MACROGENICS, INC. (US)
9704 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America
(72) SHAH, Kalpana (US); SMITH, Douglas, H. (US); LA MOTTE-MOHS, Ross (US); JOHNSON, Leslie, S. (US); MOORE, Paul, A. (GB); BONVINI, Ezio (US); KOENIG, Scott (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐƠN ĐẶC HIỆU CỦA NGƯỜI, KHÁNG THỂ ĐƠN ĐẶC HIỆU THỂ KHẢM HOẶC KHÁNG THỂ ĐƠN ĐẶC HIỆU ĐƯỢC LÀM GIỐNG NHƯ CỦA NGƯỜI KHÁNG PD-1

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc có khả năng gắn kết với cả PD-1 của khỉ cynomolgus và với PD-1 của người: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15, và đến các phiên bản được làm giống như của người và khảm của này các kháng thể. Sáng chế còn đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà bao gồm các mảnh gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 này, các thể tiếp hợp miễn dịch, và đến các phân tử đặc hiệu kép, bao gồm kháng thể thể đôi, các BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, v.v., mà bao gồm (i) mảnh gắn kết PD-1 này, và (ii) miền có khả năng gắn kết epitop của phân tử tham gia điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của các tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sử dụng các phân tử mà gắn kết PD-1 để kích thích các đáp ứng miễn dịch, cũng như các phương pháp phát hiện PD-1.


D-54024
85ng/ml SEB
50nM of mAb/DART + SEB
12,5nM mAb/DART + SEB
3,125nM mAb/DART + SEB
pg/ml IL-2
15000
10000
5000
0
PD-1 x LAG-3 đặc hiệu kép
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
DART D
DART H
PD-1 mAb A+LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2)+hLAG-3 mAb 1(1.4)
PD-1 mAb A IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG isotyp
không có đối chứng Ab

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 chứa miền gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc có khả năng gắn kết với cả PD-1 của khỉ cynomolgus và PD-1 của người: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15. Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà là các phiên bản được làm giống như của người hoặc khảm của các kháng thể này, hoặc bao gồm các mảnh gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 này (đặc biệt là các thể tiếp hợp miễn dịch, kháng thể thể đôi, các BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, v.v.). Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà còn có khả năng gắn kết epitop của một phân tử tham gia vào quá trình điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết PD-1 để phát hiện PD-1 hoặc để kích thích đáp ứng miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp điều trị kết hợp trong đó, phân tử gắn kết PD-1 bao gồm sử dụng một hoặc nhiều miền gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc này kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung mà hữu hiệu trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch và/hoặc kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

I. Các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào

Hệ miễn dịch của người và các các động vật có vú khác có vai trò bảo vệ chống lại bệnh nhiễm khuẩn và bệnh tật. Việc bảo vệ này được cung cấp bởi cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và bởi đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Đáp ứng thể dịch dẫn đến sự sản sinh các kháng thể và các phân tử sinh học khác có khả năng nhận diện và trung hoà các mục tiêu lạ (kháng nguyên). Trái lại, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào bao gồm sự hoạt hóa các đại thực bào, các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), và các lympho bào T gây độc tế bào đặc hiệu kháng nguyên bởi các tế bào T, và giải phóng các xytokin

khác nhau đáp ứng với việc nhận diện kháng nguyên (*"Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,"* Immunolog. Res. 28(1):39-48, (2003) của Dong, C. và các đồng tác giả).

Khả năng của các tế bào T trong việc tối ưu hóa điều tiết đáp ứng miễn dịch kháng lại kháng nguyên đòi hỏi hai tương tác phát tín hiệu riêng biệt (*"Modulating Co-Stimulation,"* Neurotherapeutics 4:666-675, (2007) của Viglietta, V. và các đồng tác giả; *"Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,"* Adv. Immunol. 90:297-339, (2007) của Korman, A.J. và các đồng tác giả). Thứ nhất, kháng nguyên mà đã được bộc lộ trên bề mặt của các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) cần phải được trình diện đến tế bào T $CD4^+$ chưa qua xử lý đặc hiệu kháng nguyên. Việc trình diện này chuyển tín hiệu qua thụ thể tế bào T (TCR) điều khiển tế bào T khởi đầu đáp ứng miễn dịch mà sẽ đặc hiệu với kháng nguyên đã trình diện. Thứ hai, một loạt các tín hiệu đồng kích thích và ức chế, được điều tiết thông qua các tương tác giữa APC và các phân tử bề mặt tế bào T riêng biệt, khơi mào đầu tiên là quá trình hoạt hóa và tăng sinh các tế bào T và cuối cùng là ức chế chúng. Do đó, tín hiệu thứ nhất mang lại tính đặc hiệu cho đáp ứng miễn dịch trong khi tín hiệu thứ hai có vai trò xác định bản chất, mức độ và thời gian kéo dài của đáp ứng.

Hệ miễn dịch được kiểm soát chặt chẽ bởi các phối tử và thụ thể đồng kích thích và đồng ức chế. Các phân tử này tạo ra tín hiệu thứ hai để hoạt hóa tế bào T và tạo ra một mạng lưới cân bằng giữa các tín hiệu dương và âm để tối đa hóa các đáp ứng miễn dịch chống lại bệnh nhiễm khuẩn đồng thời hạn chế khả năng miễn dịch đối với chính nó (*"VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses,"* J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16 (7/3/2011) của Wang, L. và các đồng tác giả; *"The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,"* Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288, (2008) của Lepenies, B. và các đồng tác giả). Có vai trò đặc biệt quan trọng là sự gắn kết giữa các phối tử B7.1 (CD80) và B7.2 (CD86) của tế bào trình diện kháng nguyên và các thụ thể CD28 và CTLA-4 của lympho bào T CD4+ (*"The B7-CD28 Superfamily,"* Nature Rev. Immunol. 2:116-126, (2002) của Sharpe, A.H. và các đồng tác giả; *"Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,"* Immunolog. Res. 28(1):39-48, (2003) của Dong, C. và các đồng tác giả; *"The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated*

Costimulation," Immunol. Rev. 229:307-321, (2009) của Lindley, P.S. và các đồng tác giả). Việc gắn kết của B7.1 hoặc của B7.2 với CD28 kích thích hoạt hóa hóa tế bào T; gắn kết của B7.1 hoặc B7.2 với CTLA-4 ức chế sự hoạt hóa hóa này (*"Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,"* Immunolog. Res. 28(1):39-48, (2003) của Dong, C. và các đồng tác giả; *"The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,"* Immunol. Rev. 229:307-321, (2009) của Lindley, P.S. và các đồng tác giả; *"The B7 Family Revisited,"* Ann. Rev. Immunol. 23:515-548, (2005) của Greenwald, R.J. và các đồng tác giả). CD28 được biểu hiện chủ yếu trên bề mặt của các tế bào T (*"Identification and Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,"* J. Immunol. 149:380–388, (1992) của Gross, J., và các đồng tác giả), trong khi đó biểu hiện CTLA-4 nhanh chóng được điều hoà tăng sau khi hoạt hóa hóa tế bào T *"Intracellular Trafficking Of CTLA4 and Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,"* Immunity 4:535–543, (1996) của Linsley, P. và các đồng tác giả). Do CTLA-4 là thụ thể có ái lực cao hơn (*"The B7-CD28 Superfamily,"* Nature Rev. Immunol. 2:116-126, (2002) của Sharpe, A.H. và các đồng tác giả), nên việc gắn kết trước tiên khởi đầu quá trình tăng sinh tế bào T (thông qua CD28) và tiếp đó ức chế tế bào này (thông qua biểu hiện mới sinh của CTLA-4), nhờ đó dập tắt tác dụng này khi sự tăng sinh này là không cần thiết nữa.

Các nghiên cứu khác về các phối tử của thụ thể CD28 đã dẫn đến việc nhận diện và biểu hiện đặc tính của tập hợp các phân tử B7 cùng họ ("Siêu họ B7") (*"The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function,"* Nature Immunol. 2(3):203-209, (2001) của Coyle, A.J. và các đồng tác giả; *"The B7-CD28 Superfamily,"* Nature Rev. Immunol. 2:116-126, (2002) của Sharpe, A.H. và các đồng tác giả; *"The B7 Family Revisited,"* Ann. Rev. Immunol. 23:515-548, (2005) của Greenwald, R.J. và các đồng tác giả; *"The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,"* Genome Biol. 6:223.1-223.7, (2005) của Collins, M. và các đồng tác giả; *"Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family and Regulatory T-Cells."* Arthritis Res. Ther. 6:208-214, (2004) của Loke, P. và các đồng tác giả; *"Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,"* Adv. Immunol. 90:297-339, (2007) của Korman, A.J. và các đồng tác giả; *"The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,"* J. Immunother. 30(3):251-260, (2007) của Flies, D.B. và các đồng tác giả; *"The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation*

and Tolerance," Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372, (2008) của Agarwal, A. và các đồng tác giả; *"CD28/B7 System of T-Cell Costimulation,"* Ann. Rev. Immunol. 14:233-258, (1996) của Lenschow, D.J. và các đồng tác giả; *"Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive and Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,"* Microbes Infect. 6:759-766, (2004) của Wang, S. và các đồng tác giả). Hiện có một vài thành viên đã biết của họ này: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), phối tử-chất đồng kích thích có thể gây cảm ứng (ICOS-L), phối tử chết theo chương trình-1 (PD-L1; B7-H1), phối tử chết theo chương trình-2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 và B7-H6 (*"The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,"* Genome Biol. 6:223.1-223.7, (2005) của Collins, M. và các đồng tác giả; *"Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 and Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, and Of B7's Historical Relationship With The MHC,"* Immunogenetics epub doi.org/10,1007/s00251-012-0616-2, (2012) của Flajnik, M.F. và các đồng tác giả).

II. Protein chết theo chương trình-1 ("PD-1")

Protein chết theo chương trình-1 ("PD-1", còn được gọi là "CD279") là một thành viên protein màng týp I cỡ khoảng 31 kD của họ các chất điều hoà tế bào T CD28/CTLA-4 mở rộng, mà nói chung điều hoà giảm đáp ứng miễn dịch (*"Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,"* EMBO J. 11:3887-3895, của Ishida, Y. và các đồng tác giả (1992); Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; các Bằng sáng chế Mỹ số 6,808,710; 7,101,550; 7,488,802; 7,635,757; 7,722,868; Công bố PCT số WO 01/14557).

PD-1 được biểu hiện trên các tế bào T, các tế bào B, và các bạch cầu đơn nhân đã hoạt hóa hóa (*"Expression Of The PD-1 Antigen On the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes,"* Int. Immunol. 8(5):765-772, (1996) của Agata, Y. và các đồng tác giả; *"Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells and APC,"* J. Immunol. 169:5538-5545, (2002) của Yamazaki, T. và các đồng tác giả) và ở mức thấp ở các tế bào T tiêu diệt tự nhiên (NK) (*"Facilitation Of Beta Selection and Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice,"* J. Exp. Med. 191:891-898, (2000) của Nishimura, H. và các đồng tác giả; *"Inhibitory Costimulation and Anti-*

Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298, (2007) của Martin-Orozco, N. và các đồng tác giả).

Vùng ngoại bào của PD-1 gồm có miền globulin miễn dịch đơn lẻ (Ig)V có độ tương đồng 23% với miền tương đương ở CTLA-4 (*"Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,"* Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298, (2007) của Martin-Orozco, N. và các đồng tác giả). Miền IgV ngoại bào được theo sau bởi vùng xuyên màng và đuôi nội bào. Đuôi nội bào có chứa hai vị trí phosphoryl hoá nằm trong mô-típ ức chế dựa trên tyrosin của thụ thể miễn dịch và motif chuyển đổi dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch, điều này gợi ý là PD-1 điều hoà giảm tín hiệu TCR (*"Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,"* EMBO J. 11:3887-3895, (1992) của Ishida, Y. và các đồng tác giả; *"Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer,"* Immunol. Immunother. 56(5):739-745, (2006) của Blank, C. và các đồng tác giả).

PD-1 điều tiết khả năng ức chế hệ miễn dịch của nó bằng cách gắn kết với B7-H1 và B7-DC (*"The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,"* J. Immunother. 30(3):251-260, (2007) của Flies, D.B. và các đồng tác giả; các Bằng sáng chế Mỹ số 6,803,192; 7,794,710; các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; các Công bố đơn PCT số WO 01/39722; WO 02/086083).

B7-H1 và B7-DC được biểu hiện rộng rãi trên bề mặt của các mô của người và chuột, như tim, nhau thai, cơ, gan bào thai, lách, hạch bạch huyết và tuyến ức cũng như gan, phổi, thận, tế bào đảo tuỵ và ruột non (*"Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity,"* Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298, (2007) của Martin-Orozco, N. và các đồng tác giả). Ở người, sự biểu hiện protein B7-H1 được tìm thấy ở các tế bào nội mô của người (*"Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells,"* Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92, (2005) của Chen, Y. và các đồng tác giả; *"Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L và B7-H1"* Kidney Int. 68:2091-2102, (2005) của de Haij, S. và các đồng tác giả; *"B7-H1 Is Expressed By Human Endotheliial Cells and Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis,"* J. Immunol. 169:3581-3588, (2002) của Mazanet, M.M. và các đồng tác giả), cơ tim của người

("Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-cell activation And Cytokine Production," J. Immunol. 170:1257-1266, (2003) của Brown, J.A. và các đồng tác giả), các hợp bào lá nuôi (*"B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface,"* Placenta 23:S95-S101, (2002) của Petroff, M.G. và các đồng tác giả). Các phân tử này cũng được biểu hiện bởi các đại thực bào thường trú ở một số mô, bởi các đại thực bào mà đã được hoạt hóa hóa bằng interferon (IFN)-γ hoặc yếu tố hoại tử khối u (TNF)-α *("PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-cell activation,"* Nat. Immunol 2:261-268, (2001) của Latchman, Y. và các đồng tác giả), và ở các khối u *("B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity,"* J. Mol. Med. 81:281-287, (2003) của Dong, H.).

Tương tác giữa B7-H1 và PD-1 được phát hiện là cung cấp tín hiệu đồng kích thích âm quan trọng cho các tế bào T và các tế bào B (*"Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity,"* Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298, (2007) của Martin-Orozco, N. và các đồng tác giả) và hoạt động như chất gây cảm ứng chết tế bào (*"Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,"* EMBO J. 11:3887-3895, (1992) của Ishida, Y. và các đồng tác giả; *"The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition,"* J. Molec. Med. 83:193-202, (2005) của Subudhi, S.K. và các đồng tác giả). Cụ thể hơn, đã phát hiện được rằng tương tác giữa các thụ thể PD-1 và phối tử B7-H1 ở nồng độ thấp dẫn đến truyền phát tín hiệu ức chế mà ức chế mạnh sự tăng sinh tế bào T $CD8^+$ đặc hiệu kháng nguyên; các tương tác với PD-1 ở nồng độ cao hơn không ức chế tăng sinh tế bào T nhưng làm giảm rõ rệt sự sản sinh của nhiều xytokin (*"The B7-CD28 Superfamily,"* Nature Rev. Immunol. 2:116-126, (2002) của Sharpe, A.H. và các đồng tác giả). Sự tăng sinh tế bào T và sản sinh xytokin bởi các tế bào T CD4 và CD8 ở cả trạng thái nghỉ và đã hoạt hóa hóa trước đó, và thậm chí cả các tế bào T chưa qua xử lý từ máu cuống rốn, đã được phát hiện là bị ức chế bởi các protein dung hợp B7-H1-Fc hoà tan *("Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation,"* J. Exp. Med. 192:1-9, (2000) của Freeman, G.J. và các đồng tác giả; *"PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-cell Activation,"* Nature Immunol. 2:261-268, (2001) của Latchman, Y. và các đồng tác giả; *"PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells and Is Overcome By IL-2,"* Eur. J. Immunol. 32(3):634-643, (2002) của Carter, L. và các

đồng tác giả; *"The B7-CD28 Superfamily,"* Nature Rev. Immunol. 2:116-126, (2002) của Sharpe, A.H. và các đồng tác giả).

Vai trò của B7-H1 và PD-1 trong việc ức chế sự hoạt hóa và tăng sinh tế bào T đã gợi ý rằng các phân tử sinh học này có thể có vai trò là đích trị liệu cho việc điều trị bệnh viêm nhiễm và ung thư. Do đó, việc sử dụng các kháng thể kháng PD-1 để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn và các khối u và điều biến tăng đáp ứng miễn dịch thích ứng đã được đề xuất (xem, các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; các Bằng sáng chế Mỹ số 7,521,051; 7,563,869; 7,595,048; các Công bố đơn PCT số WO 2004/056875; WO 2008/083174). Các kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu với PD-1 đã được Agata, T. và các đồng tác giả báo cáo trong tài liệu: *"Expression Of The PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes,"* Int. Immunol. 8(5):765-772, (1996); và *"Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies,"* Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051, (2008) của Berger, R. và các đồng tác giả (cũng tham khảo các Bằng sáng chế Mỹ số 8,008,449 và 8,552,154; các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 và 2014/0044738; và các Công bố đơn PCT số WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549 và WO 2013/014668).

Tuy nhiên, cho dù có tất cả các tiến bộ kỹ thuật này, vẫn có nhu cầu đối với các chế phẩm được cải tiến có khả năng điều khiển hệ miễn dịch của cơ thể tấn công các tế bào ung thư hoặc các tế bào lây nhiễm mầm bệnh mạnh mẽ hơn, đặc biệt là ở nồng độ điều trị thấp. Cho dù hệ miễn dịch thích ứng có thể là cơ chế phòng vệ mạnh mẽ chống lại bệnh ung thư và bệnh tật, nhưng hệ miễn dịch thường bị cản trở bởi cơ chế ức chế miễn dịch trong môi trường vi lượng của khối u, như biểu hiện của PD-1. Hơn nữa, các phân tử đồng ức chế được biểu hiện bởi các tế bào khối u, các tế bào miễn dịch, và các tế bào mô đệm trong môi trường khối u có thể chi phối làm giảm nhẹ các đáp ứng của tế bào T chống lại các tế bào ung thư. Do đó, vẫn có nhu cầu đối với các phân tử gắn kết PD-1 mạnh. Cụ thể là, có nhu cầu đối với các phân tử gắn kết PD-1 mạnh có profin động

học gắn kết mong muốn và các phân tử này đối kháng trục PD-1/PD-L1 bằng cách phong bế tương tác PD-1/PD-L1, mà có thể tạo ra giá trị trị liệu được cải thiện cho các bệnh nhân bị bệnh ung thư hoặc các bệnh và tình trạng bệnh lý khác. Sáng chế là nhằm đến các mục đích này và các mục đích khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 chứa miền gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc có khả năng gắn kết với cả PD-1 của khỉ cynomolgus và với PD-1 của người: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15. Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà là các phiên bản được làm giống như của người hoặc khảm của các kháng thể này, hoặc bao gồm các mảnh gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 này (đặc biệt là các thể tiếp hợp miễn dịch, kháng thể thể đôi, các BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, v.v.). Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà còn có khả năng gắn kết epitop của một phân tử tham gia vào quá trình điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của một tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết PD-1 này để phát hiện PD-1 hoặc để kích thích đáp ứng miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp điều trị kết hợp trong đó phân tử gắn kết PD-1 bao gồm một hoặc nhiều miền gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc này, được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung mà hữu hiệu trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch và/hoặc kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên ung thư.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng PD-1 của người mà bao gồm ba miền CDR chuỗi nặng, CDR_H1, CDR_H2 và CDR_H3 và ba miền CDR chuỗi nhẹ, CDR_L1, CDR_L2, và CDR_L3, trong đó:

(A) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 1, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 và SEQ ID NO:73; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 1, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77 và SEQ ID NO:78;

hoặc

(B) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 2, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 và SEQ ID NO:87; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 2, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:91 và SEQ ID NO:92;

hoặc

(C) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 3, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100 và SEQ ID NO:101; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 3, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 và SEQ ID NO:106;

hoặc

(D) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 4, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110 và SEQ ID NO:111; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 4, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115 và SEQ ID NO:116;

hoặc

(E) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 5, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:121; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 5, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125 và SEQ ID NO:126;

hoặc

(F) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 6, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130 và SEQ ID NO:131; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 6, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135 và SEQ ID NO:136;

hoặc

(G) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 7, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 và SEQ ID NO:141; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 7, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:145 và SEQ ID NO:146;

hoặc

(H) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 8, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162 và SEQ ID NO:163; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 8, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:167 và SEQ ID NO:168;

hoặc

(I) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 9, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:173; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 9, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:177 và SEQ ID NO:178;

hoặc

(J) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 10, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193 và SEQ ID NO:194; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 10, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:198 và SEQ ID NO:199;

hoặc

(K) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 11, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203 và SEQ ID NO:204; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 11, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208 và SEQ ID NO:209;

hoặc

(L) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 12, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213 và SEQ ID NO:214; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 12, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218 và SEQ ID NO:219

hoặc

(M) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 13, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223 và SEQ ID NO:224; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 13, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228 và SEQ ID NO:229;

hoặc

(N) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 14, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233 và SEQ ID NO:234; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 14, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238 và SEQ ID NO:239;

hoặc

(O) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của PD-1 mAb 15, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243 và SEQ ID NO:244; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của PD-1 mAb 15, và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 và SEQ ID NO:249;

hoặc

(P) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của hPD-1 mAb 7(1.2), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 và SEQ ID NO:141; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của hPD-1 mAb 7(1.2), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:145 và SEQ ID NO:146;

hoặc

(Q) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của hPD-1 mAb 7(1.3), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 và SEQ ID NO:141; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của hPD-1 mAb 7(1.3), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158 và SEQ ID NO:146;

hoặc

(R) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của hPD-1 mAb 9(2.2), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:172 và SEQ ID NO:173; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của hPD-1 mAb 9(2.2), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189 và SEQ ID NO:178.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án của tất cả các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này, trong đó phân tử này là kháng thể, và đặc biệt là trong đó phân tử là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án của các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:181, hoặc SEQ ID NO:250.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án của các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:186, or SEQ ID NO:251.

Sáng chế còn đề cập đến phương án, trong đó phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này là phân tử gắn kết đặc hiệu kép, có khả năng gắn kết đồng thời với PD-1 của người và với epitop thứ hai, và cụ thể đề cập đến phương án trong đó epitop thứ hai này là epitop của phân tử tham gia vào quá trình điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch (đặc biệt là trong đó epitop thứ hai này là epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 hoặc VISTA, và đặc biệt hơn cả là

trong đó epitop thứ hai này là epitop của CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT, hoặc TIM-3).

Sáng chế còn đề cập đến các phương án, trong đó phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này là phân tử đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết epitop LAG-3, cụ thể là trong đó vị trí gắn kết epitop LAG-3 này bao gồm:

(A) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 của chuỗi nặng biến đổi của LAG-3 mAb 1, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 của chuỗi nhẹ biến đổi của LAG-3 mAb 1, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 và SEQ ID NO:48;

hoặc

(B) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 của chuỗi nặng biến đổi của hLAG-3 mAb 1 VH1, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 của chuỗi nhẹ biến đổi của hLAG-3 mAb 1 VL4, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:47 và SEQ ID NO:48;

hoặc

(C) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 của chuỗi nặng biến đổi của LAG-3 mAb 6, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 của chuỗi nhẹ biến đổi của LAG-3 mAb 6, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62 và SEQ ID NO:63;

hoặc

(D) (1) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 của chuỗi nặng biến đổi của hLAG-3 mAb 6 VH1, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59; và

(2) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 của chuỗi nhẹ biến đổi của LAG-3 mAb 6, có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:298, SEQ ID NO:62 và SEQ ID NO:63.

Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này, trong đó phân tử này là kháng thể thể đôi, và đặc biệt là, trong đó kháng thể thể đôi này là phức hợp liên kết cộng hoá trị mà bao gồm hai, hoặc ba, hoặc bốn hoặc năm chuỗi polypeptit. Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này trong đó phân tử này là phân tử gắn kết hoá trị ba, và đặc biệt là trong đó phân tử gắn kết hoá trị ba này là phức hợp liên kết cộng hoá trị mà bao gồm ba, hoặc bốn hoặc năm hoặc nhiều hơn năm chuỗi polypeptit. Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này. trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc. Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này, trong đó phân tử này chứa miền gắn kết albumin, và đặc biệt là miền gắn kết albumin đã khử miễn dịch.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án của tất cả các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người này, trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc, và trong đó vùng Fc này là vùng Fc biến thể mà bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của vùng Fc biến thể này đối với FcγR và/hoặc tăng cường thời gian bán thải huyết thanh, và cụ thể hơn là, trong đó các cải biến này bao gồm ít nhất một thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(1) L234A; L235A;

(2) L234A và L235A;

(3) M252Y; M252Y và S254T;

(4) M252Y và T256E;

(5) M252Y, S254T và T256E; hoặc

(6) K288D và H435K;

trong đó cách đánh số là cách đánh số theo chỉ số EU như trong Kabat.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án trong đó phân tử phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết PD-1 nêu trên được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch qua

trung gian tế bào T. Sáng chế còn đề cập đến các phương án trong đó phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết PD-1 nêu trên được sử dụng trong việc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến hệ miễn dịch bị ức chế, đặc biệt là bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn.

Sáng chế cụ thể mô tả việc sử dụng trong điều trị hoặc chẩn đoán hoặc tiên lượng bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư này đặc trưng bởi sự có mặt của tế bào ung thư được chọn từ nhóm gồm tế bào của: khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư liên quan đến AIDS, sacom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tuỷ sống, khối u não di căn, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sacom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sacom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, chứng xương bất thường tạo sợi, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật bàng quang hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào gan, khối u tế bào đảo, sacom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, khối u mỡ lành tính/u mỡ, khối u mỡ ác tính/sacom mỡ, bệnh ung thư gan, u bạch huyết, bệnh ung thư phổi, u nguyên bào tuỷ, u melanin, u màng não, đa u tuyến nội tiết, đa u tuỷ, hội chứng loạn sản tuỷ, u nguyên bào thần kinh, các khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuỵ, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u hắc tố ác tính màng bồ đào sau, rối loạn huyết học hiếm gặp, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình que, sacom cơ vân, bệnh sacom, bệnh ung thư da, bệnh sacom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vẩy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh sacom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinoma tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư di căn tuyến giáp, và bệnh ung thư tử cung.

Sáng chế cụ thể mô tả việc sử dụng trong điều trị hoặc chẩn đoán hoặc tiên lượng bệnh ung thư, trong đó bệnh ung thư này là bệnh ung thư trực tràng, caxinom tế bào gan, u thần kinh đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư vú, đa u tuỷ, bệnh ung thư bàng quang, u nguyên bào thần kinh; bệnh sacom, u bạch huyết không phải Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuỵ, bệnh ung thư trực

tràng, bệnh bạch cầu dòng tuỷ cấp tính (AML), bệnh bạch cầu tuỷ xương mãn tính (CML), bệnh bạch cầu nguyên bào B cấp tính (B-ALL), bệnh bạch cầu bạch huyết bào mãn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), ung thư tế bào tua tương bào huyết (BPDCN), u lympho không phải Hodgkin (NHL), bao gồm bệnh bạch cầu tế bào vỏ (MCL), và u bạch huyết tế bào lympho nhỏ (SLL), u bạch huyết Hodgkin, bệnh tế bào mast toàn thân, hoặc u bạch huyết Burkitt.

Sáng chế còn đề cập đến các phương án trong đó phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết PD-1 nêu trên được đánh dấu có thể phát hiện được và được sử dụng trong việc phát hiện PD-1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ của kháng thể thể đôi liên kết cộng hoá trị điển hình có hai vị trí gắn kết epitop gồm có hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có miền thúc đẩy heterodime cuộn E hoặc cuộn K. Gốc xystein có thể có mặt trong liên kết và/hoặc trong miền thúc đẩy heterodime như được thể hiện trong Fig.3B. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig.2 là biểu đồ của phân tử kháng thể thể đôi liên kết cộng hoá trị điển hình có hai vị trí gắn kết epitop gồm có hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi được kết hợp lại tạo thành toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Các miền VL và VH mà nhận diện cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig.3A-Fig.3C là các biểu đồ thể hiện các kháng thể thể đôi hoá trị bốn điển hình có bốn vị trí gắn kết epitop gồm có hai cặp chuỗi polypeptit (nghĩa là, tổng cộng bốn chuỗi polypeptit). Một polypeptit của mỗi cặp này có miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi được kết hợp lại tạo thành toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng kiểu tô bóng hoặc tô đậm. Hai cặp chuỗi polypeptit này có thể giống nhau. Theo các phương án này, trong đó các miền VL và VH nhận dạng các epitop khác nhau (như được thể hiện trong Fig.3A-Fig.3C), phân tử thu được có bốn vị trí gắn kết epitop và là đặc hiệu kép và hoá trị hai đối với mỗi epitop đã gắn kết. Theo các phương án này, trong đó các miền VL và VH nhận biết cùng epitop (ví dụ, các CDR giống nhau của miền VL và các CDR giống nhau của miền VH được sử dụng trên cả hai chuỗi), phân tử thu được có bốn vị trí gắn kết

epitop và là đơn đặc hiệu và hoá trị bốn đối với epitop đơn lẻ. Theo cách khác, hai cặp polypeptit này có thể khác nhau. Theo các phương án này, trong đó các miền VL và VH của mỗi cặp polypeptit nhận dạng các epitop khác nhau (như thể hiện trong Fig.3A-Fig.3C), phân tử thu được có bốn vị trí gắn kết epitop và là tứ đặc hiệu và hoá trị một đối với mỗi epitop đã gắn kết. Fig.3A thể hiện kháng thể thể đôi Fc mà có chứa miền thúc đẩy heterodime peptit bao gồm gốc xystein. Fig.3B thể hiện kháng thể thể đôi chứa vùng Fc, mà có chứa các miền thúc đẩy heterodime cuộn E và cuộn K bao gồm gốc xystein và liên kết (với gốc xystein tuỳ ý). Fig.3C, thể hiện kháng thể thể đôi chứa vùng Fc, mà có chứa các miền CH1 và CL của kháng thể.

Fig.4A và Fig.4B là các biểu đồ của phân tử kháng thể thể đôi liên kết cộng hoá trị đại diện có hai vị trí gắn kết epitop gồm có ba chuỗi polypeptit. Hai trong số các chuỗi polypeptit này có miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi được kết hợp lại tạo thành toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Các chuỗi polypeptit chứa miền VL và VH còn chứa miền thúc đẩy heterodime. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig.5 là các biểu đồ của phân tử kháng thể thể đôi liên kết cộng hoá trị điển hình có bốn vị trí gắn kết epitop gồm có năm chuỗi polypeptit. Hai trong số các chuỗi polypeptit này có miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi được kết hợp lại tạo thành vùng Fc mà bao gồm toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc. Chuỗi polypeptit bao gồm các miền VL và VH đã liên kết còn chứa miền thúc đẩy heterodime. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig.6A-Fig.6F là các biểu đồ của các phân tử gắn kết hoá trị ba chứa vùng Fc điển hình có ba vị trí gắn kết epitop. Fig.6A và Fig.6B, tương ứng, minh hoạ biểu đồ các miền của các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi và miền gắn kết kiểu Fab có định hướng miền khác nhau, trong đó các miền gắn kết loại kháng thể thể đôi là đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng Cvới vùng Fc. Các phân tử trong Fig.6A và Fig.6B bao gồm bốn chuỗi. Fig.6C và Fig.6D tương ứng minh hoạ biểu đồ các miền của các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi đầu tận cùng N với vùng Fc, và miền gắn kết kiểu Fab, trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết thông qua vùng đệm polypeptit, hoặc miền gắn kết kiểu scFv. Các phân tử gắn kết hoá trị ba trong Fig.6E và Fig.6F, tương ứng, minh hoạ biểu đồ các

miền của các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi đầu tận cùng C với vùng Fc, và miền gắn kết kiểu Fab được liên kết, hoặc miền gắn kết kiểu scFv trong đó là các miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi. Các phân tử gắn kết hoá trị ba trong Fig.6C- Fig.6F bao gồm ba chuỗi. Các miền VL và VH mà nhận dạng cùng epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô bóng hoặc tô đậm.

Fig.7A-Fig.7D thể hiện các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1-15 gắn kết với PD-1 của người. Đường cong gắn kết đối với sự gắn kết với shPD-1-His được thể hiện trong Fig.7A (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4 và PD-1 mAb 9), Fig.7B (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, và PD-1 mAb 7), và Fig.7C (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, và PD-1 mAb 15). Đường cong gắn kết đối với sự gắn kết với shPD-1-Fc của người được thể hiện trong Fig.7D (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, và PD-1 mAb 15).

Fig.8A-Fig.8C thể hiện các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1-15 gắn kết với PD-1 của khỉ cynomolgus. Đường cong gắn kết đối với sự gắn kết với scynoPD-1-hFc được thể hiện trong Fig.8A (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7), Fig.8B (PD-1 mAb 9), và Fig.8C (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, và PD-1 mAb 15).

Fig.9A-Fig.9D thể hiện khả năng của các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1-15 để phong bế gắn kết của PD-L1 của người với PD-1 của người. Các đường cong ức chế được thể hiện trong Fig.9A (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 15, và PD-1 mAb A), Fig.9B (PD-1 mAb 4), Fig.9C (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, và PD-1 mAb A), và Fig.9D (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, PD-1 mAb 15, và PD-1 mAb A).

Fig.10A-Fig.10B thể hiện tính đặc hiệu mô của kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 7. Fig.10A thể hiện các vệt màu mô học của mô ruột kết bình thường (các phiến i và vii), mô gan (các phiến ii và viii), mô phổi (các phiến iii và ix), mô tuỵ (các phiến iv và x), mô thận (các phiến v và xi) và mô tim (các phiến vi và xii). Fig.10A, các phiến i-vi thể hiện kết quả mô được ủ với PD-1 mAb 7 được đánh dấu (0,313 µg/mL). Fig.10A, các phiến vii-xii thể hiện kết quả mô được ủ với mAb đối chứng isotyp được

đánh dấu (0,314 µg/mL). Fig.10B thể hiện các vệt màu mô học của da (các phiến i và iv), amiđan (các phiến ii và v), và các tế bào NSO biểu hiện PD-1 (các phiến iii và vi). Fig.10B, các phiến i-iii thể hiện kết quả mô được ủ với PD-1 mAb 7 được đánh dấu (0,313 µg/mL).

Fig.11 thể hiện các profin gắn kết của các kháng thể kháng PD-1 của người được làm giống như của người hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.1), hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B có IgG1 (AA) hoặc IgG4 (P) để gắn kết với PD-1 bề mặt tế bào.

Fig.12A- Fig.12B thể hiện khả năng của các kháng thể kháng PD-1 được làm giống như của người hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.1), hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B, có IgG1 (AA) hoặc IgG4 (P) để phong bế gắn kết của PD-L1 của người hoà tan (Fig.12A) và PD-L2 của người hoà tan (Fig.12B) với PD-1 của người trên bề mặt tế bào.

Fig.13 thể hiện khả năng của các kháng thể kháng PD-1 được làm giống như của người hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.1), hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B, có IgG1 (AA) hoặc IgG4 (P) để đối kháng trục PD-1/PD-L1 bằng cách phong bế tương tác PD-1/PD-L1 và ngăn chặn sự điều hoà giảm của các đáp ứng tế bào T trong thử nghiệm chất báo cáo luciferaza Jurkat-luc-NFAT / CHO-PD-L1.

Fig.14 thể hiện PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 và PD-1 mAb 15 có khả năng kích thích sự sản sinh xytokin đến mức tương đương hoặc cao hơn các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A và PD-1 mAb B) và việc điều trị bằng PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 và PD-1 mAb 15 kết hợp với LAG-3 mAb 1 tạo ra sự tăng cường giải phóng xytokin ở mức lớn nhất. Các profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng độc tố ruột typ B của *Staphylococcus* (SEB) được điều trị bằng các kháng thể kháng PD-1 và kháng-LAG-3 đơn độc và kết hợp.

Fig.15A-Fig.15B thể hiện khả năng của các kháng thể kháng PD-1 được làm giống như của người hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B, có IgG1 (AA) hoặc IgG4 (P) để kích thích sự sản sinh xytokin. IFNγ (Fig.15A) và TNFα (Fig.15B), là các

profin bài tiết từ các PBMC được kích thích bằng-SEB được điều trị bằng các kháng thể kháng PD-1.

Fig.16A-Fig.16B thể hiện các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART A, DART D, DART E, DART F, DART G và DART H, có thể kích thích sự sản sinh xytokin đến mức tương đương hoặc cao hơn mức nhận thấy khi sử dụng kết hợp kháng thể kháng PD-1 (mAb) + kháng thể kháng LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), và các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART A, DART D, DART E, DART F và DART G tạo ra sự tăng cường giải phóng xytokin ở mức cao nhất. Vẽ đồ thị các profin bài tiết IFNγ của các PBMC được kích thích bằng SEB với nồng độ thấp (0,2 ng/mL được điều trị bằng kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3, hoặc các kháng thể kháng PD-1 và kháng LAG-3 đơn độc hoặc kết hợp. Các kết quả này sử dụng các PBMC từ hai đối tượng cho đại diện được thể hiện trên Fig.16A và Fig.16B.

Fig.17A-Fig.17B thể hiện các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART A, DART B và DART C có thể kích thích sự sản sinh xytokin đến mức cao hơn mức nhận thấy khi sử dụng kết hợp kháng thể kháng PD-1 mAb + kháng thể kháng LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Vẽ đồ thị các profin bài tiết IFNγ của các PBMC từ hai đối tượng cho đại diện, được kích thích bằng SEB nồng độ cao (85 ng/mL) được điều trị bằng kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3, hoặc các kháng thể kháng PD-1 và kháng LAG-3 đơn độc hoặc kết hợp. Các kết quả này sử dụng các PBMC từ hai đối tượng cho đại diện được thể hiện trên Fig.17A và Fig.17B.

Fig.18A-Fig.18B thể hiện các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART A, DART B và DART C có thể kích thích sự sản sinh xytokin đến mức cao hơn mức nhận thấy khi sử dụng kết hợp kháng thể kháng PD-1 mAb + kháng thể kháng LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Vẽ đồ thị các profin bài tiết IFNγ của các PBMC từ hai đối tượng cho đại diện, được kích thích bằng SEB ở nồng độ trung bình (0,5 ng/mL) được điều trị bằng kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3, hoặc các kháng thể kháng PD-1 và kháng-LAG-3 đơn độc hoặc kết hợp. Các kết quả này sử dụng các PBMC từ 2 đối tượng cho đại diện được thể hiện trên Fig.18A và Fig.18B.

Fig.19 thể hiện các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART D và DART H có thể kích thích sự sản sinh xytokin đến mức tương đương hoặc cao hơn

mức nhận thấy khi sử dụng kết hợp kháng thể kháng PD-1 mAb + kháng thể kháng LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), và DART D tạo ra sự tăng cường giải phóng xytokin ở mức lớn nhất. Vẽ đồ thị các profin bài tiết IL-2 của các PBMC từ đối tượng cho đại diện được kích thích bằng SEB ở nồng độ cao (85 ng/mL) được điều trị bằng kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3, hoặc các kháng thể kháng PD-1 và kháng-LAG-3 đơn độc hoặc kết hợp.

Fig.20 thể hiện các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART B và DART I có thể kích thích sự sản sinh xytokin đến mức cao hơn mức nhận thấy khi sử dụng kết hợp kháng thể kháng PD-1 mAb + kháng thể kháng LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A, hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 1(1.4), hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 6(1.1)). Vẽ đồ thị các profin bài tiết IFNγ của các PBMC từ đối tượng cho đại diện, được kích thích bằng SEB ở nồng độ trung bình (0,5 ng/mL) được điều trị bằng kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3, hoặc các kháng thể kháng PD-1 và kháng-LAG-3 đơn độc hoặc kết hợp.

Fig.21A-Fig.21D thể hiện kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART I có thể kích thích sự sản sinh xytokin đến mức cao hơn mức nhận thấy khi sử dụng kết hợp kháng thể kháng PD-1 mAb + kháng thể kháng LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Vẽ đồ thị các profin bài tiết IFNγ (Fig.21A và Fig.21C) và IL-2 (Fig.21B và Fig.21D) của tế bào ký ức CD4 từ hai đối tượng cho đại diện, được kích thích bằng biến độc tố uốn ván (5 μg/mL) được điều trị bằng kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART-I, các kháng thể kháng PD-1 và kháng LAG-3 kết hợp, hoặc đối chứng isotyp. Các kết quả ở ngày 7 sử dụng các tế bào T ký ức CD4 từ hai đối tượng cho đại diện được thể hiện trong Fig.21A-Fig.21B và Fig.21C-Fig.21D.

Fig.22 thể hiện dược động học của phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3, DART I là tương đương với dược động học của kháng thể kháng PD-1, PD-1 mAb A IgG4 (P) ở khỉ cynomolgus. Các đường kẻ chỉ nồng độ trung bình trong huyết thanh của DART I (vạch liền) và PD-1 mAb A (vạch đứt quãng). Vẽ đồ thị các giá trị riêng cho khỉ đực (hình đặc) và khỉ cái (hình rỗng) đối với DART I (các tam giác) và PD-1 mAb A (các hình tròn).

Fig.23A-Fig.23C thể hiện nồng độ kháng thể trong huyết thanh và tỷ lệ phần trăm PD-1 đã gắn kết trên bề mặt của các tế bào T CD4+ hoặc CD8+ theo thời gian ở động

vật sau khi điều trị bằng các kháng thể kháng PD-1 khác nhau. Tỷ lệ phần trăm PD 1 đã gắn kết trên bề mặt của các tế bào T CD4+ hoặc CD8+ sau khi điều trị bằng kháng thể kháng PD 1 mAb được vẽ đồ thị trên các trục y bên phải; các ký hiệu thể hiện % PD 1 đã gắn kết trên tế bào T cho mỗi con riêng lẻ và vạch đứt quãng thể hiện các giá trị trung bình. Các nồng độ mAb trong huyết thanh được vẽ đồ thị trên trục y bên trái; các ký hiệu thể hiện nồng độ trong huyết thanh cho mỗi con riêng lẻ và vạch liền thể hiện khớp các dữ liệu không tuyến tính. Mỗi panen thể hiện dữ liệu cho các con (n = 1/giới tính/nhóm) được sử dụng 10 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) (Fig.23A), PD-1 mAb A IgG4 (P) (Fig.23B), hoặc PD-1 mAb B IgG4 (P) (Fig.23B) bằng cách truyền tĩnh mạch (IV) vào ngày 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 chứa miền gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc có khả năng gắn kết với cả PD-1 của khỉ cynomolgus và với PD-1 của người: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15. Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà là các phiên bản được làm giống như của người hoặc khảm của các kháng thể này, hoặc là bao gồm mảnh gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 này (đặc biệt là các thể tiếp hợp miễn dịch, kháng thể thể đôi (bao gồm nhưng không giới hạn ở DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I, và DART-J), các BiTE, các kháng thể đặc hiệu kép, *etc.*). Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 mà còn có khả năng gắn kết epitop của phân tử tham gia vào quá trình điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết PD-1 này để phát hiện PD-1 hoặc để kích thích đáp ứng miễn dịch. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp điều trị kết hợp, trong đó phân tử gắn kết PD-1 bao gồm một hoặc nhiều miền gắn kết PD-1 của các kháng thể kháng PD-1 được chọn lọc này được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung hữu hiệu trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch và/hoặc kết hợp với một hoặc nhiều phân tử bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên ung thư.

I. Các kháng thể và các miền gắn kết của chúng

Các kháng thể theo sáng chế là các phân tử globulin miễn dịch có khả năng gắn kết đặc hiệu với đích, như hydrat cacbon, polynucleotit, lipit, polypeptit, v.v., thông qua ít nhất một vị trí nhận biết kháng nguyên, nằm ở miền biến đổi của phân tử globulin miễn dịch. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "kháng thể" và "các kháng thể" chỉ các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa đặc hiệu, các kháng thể của người, các kháng thể được làm giống như của người, các kháng thể tổng hợp, các kháng thể khảm, các kháng thể đa dòng, các kháng thể được làm giống như của lạc đà, các Fv chuỗi đơn (scFv), các kháng thể chuỗi đơn, các mảnh Fab, các mảnh F(ab'), các Fv đặc hiệu kép được liên kết đisulfua (sdFv), kháng thể nội bào, và các mảnh gắn kết epitop của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Cụ thể là, các kháng thể bao gồm các phân tử globulin miễn dịch và các mảnh có hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, nghĩa là, các phân tử có chứa vị trí gắn kết kháng nguyên. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc loại bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), lớp bất kỳ (ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 và IgA_2) hoặc phân lớp bất kỳ. Ngoài các ứng dụng đã biết của chúng trong chẩn đoán, các kháng thể đã chứng tỏ là hữu ích làm các chất trị liệu. Các kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với polypeptit hoặc protein hoặc phân tử không phải protein do có mặt trên phân tử này của miền hoặc gốc hoặc cấu dạng cụ thể ("epitop"). Phân tử có chứa epitop có thể có hoạt tính gây miễn dịch, sao cho phân tử này kích thích đáp ứng sản sinh kháng thể ở động vật; các phân tử này được gọi là "các kháng nguyên"). Vài thập kỷ qua đã chứng kiến sự hồi sinh mối quan tâm đến tiềm năng trị liệu của các kháng thể, và các kháng thể trở thành một trong các nhóm thuốc thu được từ công nghệ sinh học hàng đầu *("The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,"* Singapore Med. J. 50(7):663-666, (2009) của Chan, C.E. và các đồng tác giả). Trên 200 thuốc gốc kháng thể đã được cấp phép lưu hành hoặc đang trong giai đoạn nghiên cứu.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ quần thể kháng thể đồng nhất, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm các axit amin (có trong tự nhiên và không có trong tự nhiên) mà tham gia vào việc gắn kết chọn lọc của kháng nguyên. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, nhằm hướng đến epitop (hoặc vị trí kháng nguyên) duy nhất. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" không chỉ bao gồm các kháng thể đơn dòng nguyên

vẹn và các kháng thể đơn dòng có độ dài đầy đủ, mà còn bao gồm các mảnh của chúng (như Fab, Fab', $F(ab')_2$ Fv), chuỗi đơn (scFv), các thể đột biến của chúng, các protein dung hợp bao gồm đoạn kháng thể, các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người, các kháng thể đơn dòng thể khảm, và cấu hình được cải biến bất kỳ khác của phân tử globulin miễn dịch mà bao gồm vị trí nhận biết kháng nguyên có tính đặc hiệu cần thiết và khả năng gắn kết với kháng nguyên. Không nhằm giới hạn đối với nguồn gốc của kháng thể hoặc cách thức, trong đó kháng thể này được tạo ra (ví dụ, bằng tế bào lai, chọn lọc thể thực khuẩn, biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, v.v.). Thuật ngữ này bao gồm các globulin miễn dịch toàn vẹn cũng như các mảnh v.v. nêu trên trong định nghĩa về "kháng thể." Các phương pháp tạo ra các kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực này. Một phương pháp mà có thể được sử dụng là phương pháp của Kohler, G. và các đồng tác giả trong tài liệu *"Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,"* Nature 256:495-497, (1975) hoặc phương pháp cải biến của nó. Thông thường, các kháng thể đơn dòng được phát triển ở chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ. Các kháng thể được sản xuất bằng cách gây miễn dịch động vật bằng một lượng gây miễn dịch của các tế bào, dịch chiết tế bào hoặc các chế phẩm protein mà có chứa epitop mong muốn. Chất gây miễn dịch có thể là, nhưng không giới hạn ở, các tế bào sơ cấp, các dòng tế bào nuôi cấy, các tế bào ung thư, các protein, các peptit, các axit nucleic, hoặc mô. Các tế bào được sử dụng để gây miễn dịch có thể được nuôi cấy trong một thời gian (ví dụ, ít nhất là 24 giờ) trước khi sử dụng chúng làm chất gây miễn dịch. Các tế bào có thể được sử dụng làm chính các chất gây miễn dịch hoặc kết hợp với chất phụ trợ không làm biến tính, như Ribi (xem, ví dụ, *"Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production,"* ILAR J. 37(3):119-125, (1995) của Jennings, V.M.). Nói chung, các tế bào nên được giữ nguyên vẹn và tốt hơn là còn sống khi được sử dụng làm các chất gây miễn dịch. Các tế bào nguyên vẹn có thể cho phép động vật được gây miễn dịch phát hiện các kháng nguyên tốt hơn là các tế bào bị phá vỡ. Sử dụng các chất phụ trợ làm biến tính hoặc thô, ví dụ, chất phụ trợ Freud, có thể phá vỡ các tế bào và do đó không được khuyến khích sử dụng. Chất gây miễn dịch có thể được sử dụng nhiều lần cách quãng theo chu kỳ, như hai lần/tuần, hoặc một lần/tuần, hoặc có thể được sử dụng theo cách sao cho duy trì khả năng sống còn ở động vật này (ví dụ, tái tổ hợp mô). Theo cách khác, các kháng thể đơn dòng hiện có và các kháng thể tương đương khác bất kỳ mà đặc hiệu miễn dịch đối với epitop của mầm bệnh mong

muốn có thể được xác định trình tự và sản xuất theo cách tái tổ hợp bằng cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, kháng thể này được xác định trình tự và trình tự polynucleotit, tiếp đó được tách dòng vào vật truyền để biểu hiện hoặc nhân giống. Trình tự mã hoá kháng thể quan tâm có thể được duy trì trong vật truyền ở tế bào chủ và tế bào chủ này tiếp đó có thể được nhân rộng và làm đông lạnh để sử dụng trong tương lai. Trình tự polynucleotit của các kháng thể này có thể được sử dụng để thao tác di truyền để tạo ra các phân tử đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép, tam đặc hiệu và tứ đặc hiệu) theo sáng chế cũng như ái lực được tối ưu hoá, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, và/hoặc được làm giống như của chó, để cải thiện ái lực, hoặc các đặc tính khác của kháng thể này. Nguyên tắc chung để làm giống như của người một kháng thể bao gồm việc giữ lại trình tự cơ bản của đoạn gắn kết-kháng nguyên của kháng thể này, đồng thời hoán đổi phần còn lại không phải của người của kháng thể với các trình tự kháng thể của người.

Các kháng thể tự nhiên (như các kháng thể IgG) gồm có 2 chuỗi nhẹ được tạo phức với hai chuỗi nặng. Mỗi chuỗi nhẹ có chứa miền biến đổi (VL) và miền hằng định (CL). Mỗi chuỗi nặng có chứa miền biến đổi (VH), ba miền hằng định (CH1, CH2 và CH3), và miền bản lề nằm giữa các miền CH1 và CH2. Đơn vị cấu trúc cơ bản của các globulin miễn dịch có trong tự nhiên (ví dụ, IgG) do đó là tetrame có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, thường được biểu hiện dưới dạng glycoprotein khoảng 150.000 Da. Đoạn đầu tận cùng amino ("đầu tận cùng N") của mỗi chuỗi chứa miền biến đổi nằm trong khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin chủ yếu có vài trò nhận biết kháng nguyên. Đoạn đầu tận cùng carboxy ("đầu tận cùng C") của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định, các chuỗi nhẹ có một miền hằng định duy nhất và các chuỗi nặng thường có ba miền hằng định và miền bản lề. Do đó, cấu trúc của các chuỗi nhẹ của phân tử IgG là n-VL-CL-c và cấu trúc các chuỗi nặng của IgG là n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (trong đó H là miền bản lề, và n và c tương ứng là đầu tận cùng N và đầu tận cùng C của polypeptit). Các miền biến đổi của phân tử IgG gồm có các vùng quyết định bổ sung (CDR), mà có chứa các gốc tiếp xúc với epitop, và các đoạn không phải CDR, được gọi là các đoạn khung (FR), đoạn này nói chung duy trì cấu trúc và xác định vị trí của các vòng CDR để cho phép sự tiếp xúc này (mặc dù một số gốc khung nhất định cũng có thể tiếp xúc kháng nguyên). Do đó, các miền VL và VH có cấu trúc n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Các polypeptit mà là (hoặc có thể có vai trò như) CDR thứ

nhất, thứ hai và thứ ba của chuỗi nhẹ kháng thể trong bản mô tả này tương ứng được gọi là miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3. Tương tự, các polypeptit mà là (hoặc có thể có vai trò như) CDR thứ nhất, thứ hai và thứ ba của chuỗi nặng kháng thể trong bản mô tả này tương ứng được gọi là miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3. Do đó, các thuật ngữ miền CDR_L1, miền CDR_L2, miền CDR_L3, miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là đề cập đến các polypeptit mà khi kết hợp vào protein sẽ làm cho protein đó có khả năng gắn kết với epitop đặc hiệu bất kể cho dù protein này là kháng thể có các chuỗi nhẹ và nặng hoặc kháng thể thể đôi hoặc phân tử gắn kết chuỗi đơn (ví dụ, scFv, BiTe, v.v.), hoặc một loại protein khác. Do đó, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh gắn kết epitop" nghĩa là mảnh kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop, và thuật ngữ "vị trí gắn kết epitop" dùng để chỉ đoạn của phân tử bao gồm mảnh gắn kết epitop mà có vai trò để gắn kết epitop. Vị trí gắn kết epitop có thể có chứa 1, 2, 3, 4, 5 hoặc toàn bộ 6 miền CDR của kháng thể này và, mặc dù có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop này, có thể biểu hiện tính đặc hiệu miễn dịch, ái lực hoặc tính chọn lọc đối với epitop này sao cho khác biệt với các đặc tính của kháng thể này. Tuy nhiên, tốt hơn nếu mảnh gắn kết epitop sẽ chứa toàn bộ 6 miền CDR của kháng thể này. Mảnh gắn kết epitop của kháng thể có thể là chuỗi polypeptit đơn (ví dụ, scFv), hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có đầu tận cùng amino và đầu tận cùng carboxy (ví dụ, kháng thể thể đôi, mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, v.v.).

Cụ thể sáng chế bao gồm các đoạn miền biến đổi chuỗi chuỗi đơn ("scFv") của các kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế và các phân tử gắn kết đa đặc hiệu chứa các đoạn này. Các đoạn miền biến đổi chuỗi đơn được tạo ra bằng cách liên kết miền biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng bằng cách sử dụng peptit liên kết ngắn. (*"Single-Chain Antigen-Binding Proteins,"* Science 242:423-426, (1988) của Bird và các đồng tác giả) mô tả ví dụ về các peptit liên kết mà cầu nối khoảng 3,5 nm giữa đầu tận cùng carboxy của một miền biến đổi và đầu tận cùng amino của miền biến đổi còn lại. Các liên kết của các trình tự khác đã được thiết kế và sử dụng (*"Single-Chain Antigen-Binding Proteins,"* Science 242:423-426, (1988) của Bird và các đồng tác giả). Các liên kết tiếp đó có thể được cải biến cho chức năng bổ sung, như gắn các thuốc hoặc gắn với chất nền rắn. Các biến thể chuỗi đơn có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Để sản xuất tổng hợp scFv, có thể sử dụng thiết bị tổng hợp tự động. Để sản

xuất tái tổ hợp scFv, plasmit thích hợp có chứa polynucleotit mà mã hoá scFv có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp, hoặc là sinh vật nhân thực, như nấm men, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc là sinh vật nhân sơ, như E. coli. Các polynucleotit mã hoá scFv quan tâm có thể được điều chế bằng cách xử lý thông thường như nối các polynucleotit. scFv thu được có thể được phân tách bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Cụ thể sáng chế còn bao gồm các biến thể được làm giống như của người của các kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế và các phân tử gắn kết đa đặc hiệu bao gồm các biến thể này. Thuật ngữ kháng thể "được làm giống như của người" chỉ phân tử khảm, nói chung được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, có vị trí gắn kết-kháng nguyên của globulin miễn dịch từ loài không phải là người và cấu trúc globulin miễn dịch còn lại của phân tử này dựa trên cấu trúc và/hoặc trình tự globulin miễn dịch của người. Các kháng thể kháng PD-1 của người theo sáng chế bao gồm các biến thể được làm giống như của người, biến thể khảm hoặc các biến thể được làm giống như của chó của các kháng thể PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15. Trình tự polynucleotit của các miền biến đổi của các kháng thể này có thể được sử dụng để xử lý di truyền nhằm tạo ra các dẫn xuất này và nhằm cải thiện ái lực, hoặc các đặc tính khác của các kháng thể này. Nguyên tắc chung để làm giống như của người một kháng thể bao gồm việc giữ lại trình tự cơ bản của đoạn gắn kết-kháng nguyên của kháng thể này, đồng thời hoán đổi phần còn lại không phải của người của kháng thể với các trình tự kháng thể của người. Có 4 bước nói chung để làm giống như của người kháng thể đơn dòng. Đó là: (1) xác định trình tự nucleotit và trình tự axit amin đã dự đoán của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể bắt đầu (2) thiết kế kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được làm giống như của chó, nghĩa là, xác định vùng khung của kháng thể để sử dụng trong quá trình làm giống như của người hoặc làm giống như của chó (3) các kỹ thuật/phương pháp luận để làm giống như của người hoặc làm giống như của chó trên thực tế và (4) chuyển nhiễm và biểu hiện kháng thể được làm giống như của người. Xem, ví dụ các Bằng sáng chế Mỹ số 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692 và 6,331,415.

Vị trí gắn kết kháng nguyên có thể chứa miền biến đổi toàn vẹn được dung hợp với miền hằng định hoặc chỉ các vùng quyết định bổ sung (CDR) của miền biến đổi này được ghép với các vùng khung thích hợp. Các vị trí gắn kết-kháng nguyên có thể là kiểu dại hoặc được cải biến bởi một hoặc nhiều thay thế axit amin. Việc cải biến này loại bỏ vùng hằng định là chất gây miễn dịch ở các cá thể người, nhưng vẫn còn khả năng có đáp ứng miễn dịch đối với miền biến đổi lạ (*"Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics and Immune Responses,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224, (1989) của LoBuglio, A.F. và các đồng tác giả). Một phương thức tiếp cận khác không chỉ tập trung vào việc tạo ra các vùng hằng định có nguồn gốc từ người, mà còn cải biến các miền biến đổi cũng như tạo hình lại các miền này sao cho gần nhất có thể với dạng của người. Đã biết là các miền biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chứa 3 vùng quyết định bổ sung (CDR) mà các vùng này có thể thay đổi trong việc đáp ứng với các kháng nguyên quan tâm và xác định khả năng gắn kết, bốn vùng khung (FR) được gắn bên sườn, các vùng này có tính bảo toàn tương đối ở loài nhất định và các vùng này được cho là tạo giá đỡ cho các CDR. Khi các kháng thể không phải của người được điều chế liên quan đến một kháng nguyên cụ thể, các miền biến đổi có thể "được tạo hình lại" hoặc "được làm giống như của người" bằng cách ghép các CDR thu được từ kháng thể không phải của người trên các FR có mặt trong kháng thể người sẽ được cải biến. Việc ứng dụng phương thức tiếp cận này cho nhiều loại kháng thể khác nhau đã được Sato, K. và các đồng tác giả báo cáo trong tài liệu: Cancer Res 53:851-856, (1993). *"Reshaping Human Antibodies for Therapy,"* Nature 332:323-327, (1988) của Riechmann, L. và các đồng tác giả; *"Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,"* Science 239:1534-1536, (1988) của Verhoeyen M. và các đồng tác giả; "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,*" Protein Engineering 4:773-3783, (1991) của Kettleborough, C. A. và các đồng tác giả; *"Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,"* Human Antibodies Hybridoma 2:124-134, (1991) của Maeda, H. và các đồng tác giả; *"Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185, (1991) của Gorman, S. D. và các đồng tác giả; *"Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,"* Bio/Technology 9:266-271, (1991) của Tempest, P.R. và các đồng tác giả; *"Humanized Antibodies For*

Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873, (1991) của Co, M. S. và các đồng tác giả; *"Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289, (1992) của Carter, P. và các đồng tác giả; và *"Chimeric and Humanized Antibodiies With Specificity For The CD33 Antigen,"* J. Immunol. 148:1149-1154, (1992) của Co, M.S. và các đồng tác giả. Theo vài phương án, các kháng thể được làm giống như của người bảo toàn tất cả các trình tự CDR (ví dụ, kháng thể của chuột được làm giống như của người có chứa cả sáu CDR từ các kháng thể của chuột). Theo các phương án khác, các kháng thể được làm giống như của người có một hoặc nhiều CDR (một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu), các CDR này khác biệt về trình tự so với kháng thể gốc.

Một số phân tử kháng thể "được làm giống như của người" bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thu được từ globulin miễn dịch không phải của người đã được mô tả, bao gồm các kháng thể khảm có miền biến đổi của loài gặm nhấm hoặc miền biến đổi của loài gặm nhấm được cải biến và các vùng quyết định bổ sung kết hợp của chúng (các CDR) được dung hợp với các miền hằng định của người (xem, ví dụ *"Man-made Antibodies,"* Nature 349:293-299, (1991) của Winter và các đồng tác giả; *"Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics and Immune Response,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989) của Lobuglio và các đồng tác giả, *"Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen,"* J. Immunol. 138:4534-4538, (1987) của Shaw và các đồng tác giả và *"Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody,"* Cancer Res. 47:3577-3583, (1987) của Brown và các đồng tác giả). Các tài liệu tham chiếu khác mô tả các CDR của loài gặm nhấm được ghép vào vùng khung nâng đỡ của người (FR) trước khi dung hợp với miền hằng định kháng thể của người thích hợp (xem, ví dụ *"Reshaping Human Antibodies for Therapy,"* Nature 332:323-327, (1988) của Riechmann, L. và các đồng tác giả; *"Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,"* Science 239:1534-1536, (1988) của Verhoeyen, M. và các đồng tác giả; và *"Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse,"* Nature 321:522-525, (1986) của Jones và các đồng tác giả). Một tài liệu tham chiếu khác mô tả các CDR của loài gặm nhấm được nâng đỡ bằng các vùng khung của loài gặm nhấm được bọc lót bằng cách tái tổ hợp. Xem, ví dụ Công bố sáng chế Châu

Âu số EP 519,596. Các phân tử "được làm giống như của người" này được thiết kế để giảm thiểu đáp ứng miễn dịch không mong muốn đối với các phân tử kháng thể kháng kháng thể người của loài gặm nhấm, việc này hạn chế thời gian và hiệu quả của các ứng dụng trị liệu của các gốc đó ở người nhận. Các phương pháp khác để làm giống như của người các kháng thể mà cũng có thể được sử dụng được Daugherty và các đồng tác giả đề cập trong *"Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, và Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins,"* Nucl. Acids Res. 19:2471-2476, (1991) và trong các Bằng sáng chế Mỹ số 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867 và 5,866,692.

II. Các thụ thể Fcγ (FcγRs)

Các miền CH2 và CH3 của hai chuỗi nặng tương tác để tạo thành vùng Fc, vùng này là miền được nhận biết bởi các thụ thể Fc của tế bào, bao gồm nhưng không giới hạn ở các thụ thể Fc gamma (FcγRs). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng Fc" được sử dụng để chỉ vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng IgG. Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG1 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:1):

```
231     240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

        290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

        340         350         360         370         380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

        390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

        440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

được đánh số theo chỉ số Châu Âu như đề cập trong Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG2 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:2):

```
231    240         250         260         270         280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

       340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

       390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

       440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

được đánh số theo chỉ số Châu Âu như đề cập trong Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG3 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:3):

```
231    240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

       340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

       390         400         410         420         430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

       440     447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

được đánh số theo chỉ số Châu Âu như đề cập trong Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG4 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:4):

```
231     240         250         260         270         280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

        290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

        340         350         360         370         380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

        390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

        440     447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

được đánh số theo chỉ số Châu Âu như đề cập trong Kabat, trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Trong suốt bản mô tả này, cách đánh số các gốc trong vùng hằng định của chuỗi nặng IgG là cách đánh số theo chỉ số Châu Âu như trong tài liệu của Kabat và các đồng tác giả, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), được viện dẫn ở đây để tham khảo. Thuật ngữ "chỉ số Châu Âu như trong Kabat" chỉ cách đánh số kháng thể IgG1 của người theo Châu Âu. Các axit amin từ các miền biến đổi của các chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành của các globulin miễn dịch được chỉ định theo vị trí của axit amin trong chuỗi này. Kabat mô tả nhiều trình tự axit amin đối với các kháng thể, xác định trình tự liên ứng axit amin đối với mỗi phân nhóm, và gán chỉ số gốc cho mỗi axit amin, và các CDR được xác định bằng Kabat (sẽ được hiểu là CDR_H1 được xác định theo *"Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins,"*. J. Mol. Biol. 196:901-917), (1987) của Chothia, C. & Lesk, A. M. bắt đầu ở 5 gốc sớm hơn). Sơ đồ đánh số của Kabat có thể mở rộng cho các các kháng thể không được bao gồm trong bản tóm tắt của ông, bằng cách làm thẳng mạch kháng thể quan tâm bằng một trong số các trình tự liên ứng trong Kabat bằng cách tham chiếu đến các axit amin được bảo toàn. Phương pháp này nhằm gán các chỉ số gốc đã trở thành phương pháp chuẩn trong lĩnh vực này và dễ dàng xác định các axit amin ở các vị trí tương đương ở các kháng thể khác nhau, bao gồm các biến thể khảm hoặc

được làm giống như của người. Ví dụ, axit amin ở vị trí 50 của chuỗi nhẹ kháng thể của người chiếm vị trí trương đương với axit amin ở vị trí 50 của chuỗi nhẹ kháng thể của chuột.

Tính đa hình đã được nhận thấy ở một số vị trí khác nhau trong các vùng hằng định của kháng thể (ví dụ, các vị trí CH1, bao gồm nhưng không giới hạn ở các vị trí 192, 193, và 214; các vị trí Fc, bao gồm nhưng không giới hạn ở các vị trí 270, 272, 312, 315, 356, và 358 được đánh số theo chỉ số Châu Âu như đề cập trong Kabat), và do đó có thể có sự khác biệt không đáng kể giữa trình tự được trình bày và các trình tự đã biết trong lĩnh vực này. Các dạng đa hình của các globulin miễn dịch của người đã được xác định đặc tính rõ ràng. Hiện nay, 18 alotyp Gm là đã biết: G1m (1, 2, 3, 17) hoặc G1m (a, x, f, z), G2m (23) hoặc G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) hoặc G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (*"The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation."* Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990), của Lefranc, và các đồng tác giả; Hum. Genet.: 50, 199-211, của Lefranc, G. và các đồng tác giả, 1979). Các kháng thể theo sáng chế được dự tính cụ thể là có thể kết hợp với alotyp, isoalotyp, hoặc haplotyp bất kỳ của gen globulin miễn dịch bất kỳ, và không chỉ giới hạn ở alotyp, isoalotyp hoặc haplotyp của các trình tự được đề xuất trong bản mô tả này. Hơn nữa, trong một vài hệ biểu hiện, gốc axit amin đầu tận cùng C (in đậm ở trên) của miền CH3 có thể được loại bỏ sau dịch mã. Do đó, gốc đầu tận cùng C của miền CH3 là gốc axit amin tuỳ ý trong các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế. Sáng chế cụ thể bao gồm các phân tử gắn kết PD-1 thiếu gốc đầu tận cùng C của miền CH3. Sáng chế cũng cụ thể bao gồm các cấu trúc bao gồm gốc lysin đầu tận cùng C của miền CH3 này.

Các tín hiệu hoạt hóa và ức chế được tải nạp thông qua việc nối vùng Fc với thụ thể Fc gamma của tế bào (FcγR). Việc nối này có khả năng dẫn đến các chức năng hoàn toàn đối lập là do các khác biệt về cấu trúc giữa các FcγR khác nhau. Hai miền phân biệt trong các miền tín hiệu tế bào chất của thụ thể này được gọi là mô-típ hoạt hóa dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (các ITAM) và mô-típ ức chế dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (các ITIM) có vai trò đối với các đáp ứng khác nhau. Việc tuyển mộ các enzym tế bào chất khác nhau vào các cấu trúc này quyết định kết quả của các đáp ứng tế bào qua trung gian FcγR. Các phức hợp FcγR chứa ITAM bao gồm FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA,

trong khi đó các phức hợp có chứa ITIM chỉ bao gồm FcγRIIB. Các bạch cầu trung tính của người biểu hiện gen FcγRIIA. Cụm FcγRIIA thông qua các phức hợp miễn dịch hoặc liên kết ngang kháng thể đặc hiệu có vai trò kết tập các ITAM cùng với các kinaza được kết hợp thụ thể mà tạo thuận lợi cho quá trình phosphoryl hoá ITAM. Quá trình phosphoryl hoá ITAM đóng vai trò làm vị trí neo giữ đối với Syk kinaza, sự hoạt hóa này dẫn đến hoạt hóa các cơ chất xuôi dòng (ví dụ, PI_3K). Sự hoạt hóa tế bào dẫn đến giải phóng các chất trung gian tiền viêm. Gen FcγRIIB được biểu hiện trên các lympho bào B; miền ngoại bào của nó tương đồng ở mức 96% với FcγRIIA và gắn kết các phức hợp IgG theo cách không phân biệt. Sự có mặt của ITIM trong miền tế bào chất của FcγRIIB xác định phân lớp ức chế của FcγR này. Gần đây, cơ chế phân tử của việc ức chế này đã được xác định. Khi được nối đồng thời đồng thời với FcγR hoạt hóa, ITIM trong FcγRIIB được phosphoryl hoá và thu hút miền SH2 của inositol polyphosphat 5'-phosphataza (SHIP), enzym này thuỷ phân các chất truyền tin phosphoinositol được giải phóng là kết quả của sự hoạt hóa tyrosin kinaza qua trung gian FcγR có chứa ITAM, do đó ngăn dòng Ca^{++} nhập nội bào. Do đó, liên kết ngang của FcγRIIB dập tắt đáp ứng hoạt hóa đối với việc nối FcγR và ức chế tính đáp ứng của tế bào. Do đó, sự hoạt hóa tế bào B, tăng sinh tế bào B và bài tiết kháng thể bị huỷ bỏ.

III. Các kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể thể đôi đa đặc hiệu và kháng thể thể đôi DART®

Khả năng của kháng thể để gắn kết epitop của kháng nguyên phụ thuộc vào sự có mặt và trình tự axit amin của các miền VL và VH của kháng thể này. Tương tác của chuỗi nhẹ kháng thể và chuỗi nặng kháng thể và, cụ thể là, tương tác của các miền VL và VH của nó tạo thành một trong hai vị trí gắn kết epitop của kháng thể tự nhiên. Các kháng thể tự nhiên có khả năng gắn kết với chỉ một loại epitop (nghĩa là, chúng là đơn đặc hiệu), mặc dù chúng có thể gắn kết nhiều bản sao của loại này (nghĩa là, biểu thị thể hoá trị hai hoặc thể đa hoá trị).

Các miền gắn kết theo sáng chế gắn kết các epitop theo cách "đặc hiệu miễn dịch". Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể, kháng thể thể đôi hoặc phân tử gắn kết epitop khác được cho là gắn kết "đặc hiệu miễn dịch" với vùng của một phân tử khác (nghĩa là, epitop) nếu phân tử này phản ứng hoặc kết hợp thường xuyên hơn, nhanh hơn, với khoảng thời gian dài hơn và/hoặc với ái lực lớn hơn với epitop đó so với

các epitop thay thế. Ví dụ, kháng thể gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của virut là kháng thể mà gắn kết epitop của virut này với ái lực lớn hơn, độ phàm lớn hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc kéo dài hơn so với khi nó gắn kết đặc hiệu miễn dịch với các epitop khác của virut hoặc các epitop không phải của virut. Cũng nên hiểu là, theo định nghĩa này, ví dụ, kháng thể (hoặc gốc hoặc epitop) mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với đích thứ nhất có thể hoặc không thể gắn kết đặc hiệu hoặc ưu tiên với đích thứ hai. Do đó, "gắn kết đặc hiệu miễn dịch" không nhất thiết đòi hỏi (mặc dù có thể bao gồm) gắn kết riêng biệt. Nói chung, nhưng không nhất thiết, tham chiếu đến gắn kết nghĩa là gắn kết "đặc hiệu". hai phân tử được cho là có khả năng gắn kết với nhau theo cách "đặc hiệu sinh lý", nếu việc gắn kết này thể hiện tính đặc hiệu với các thụ thể mà gắn kết với phối tử tương ứng của chúng.

Chức năng của các kháng thể có thể được tăng cường bằng cách tạo ra các phân tử dựa trên kháng thể đa đặc hiệu mà có thể gắn kết đồng thời hai kháng nguyên riêng rẽ và phân biệt (hoặc các epitop khác nhau của cùng kháng nguyên) và/hoặc bằng cách tạo ra phân tử dựa trên kháng thể có hoá trị cao hơn (nghĩa là, nhiều hơn hai vị trí gắn kết) đối với cùng epitop và/hoặc kháng nguyên.

Để tạo ra các phân tử có khả năng cao hơn các kháng thể tự nhiên, nhiều loại kiểu kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp đã được phát triển (xem, ví dụ, các Công bố đơn PCT số WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), phần lớn trong số này sử dụng các peptit liên kết để dung hợp thêm mảnh gắn kết epitop (ví dụ, scFv, VL, VH, v.v.) với, hoặc trong phạm vi nhân kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM), hoặc để dung hợp nhiều mảnh gắn kết epitop (ví dụ, hai mảnh Fab hoặc scFv). Kiểu khác sử dụng các peptit liên kết để dung hợp mảnh gắn kết epitop (ví dụ, scFv, VL, VH, v.v.) với miền dime hoá như miền CH2-CH3 hoặc các polypeptit khác (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Thông thường, các phương thức tiếp cận này bao gồm các thoả hiệp và trao đổi. Ví dụ, các Công bố đơn PCT số WO 2013/174873, WO 2011/133886 và WO 2010/136172 đề cập đến việc sử dụng các liên kết có thể gây ra các vấn đề trong bối cảnh trị liệu, và đưa ra kháng thể tam đặc hiệu trong đó các miền CL và CH1 được chuyển đổi từ các vị trí tự nhiên tương ứng của chúng và các miền VL và VH đã được đa dạng hoá (WO 2008/027236; WO

2010/108127) để cho phép chúng gắn kết với nhiều hơn một kháng nguyên. Do đó, các phân tử được đề cập trong các tài liệu này trao đổi tính đặc hiệu gắn kết cho khả năng gắn kết các loại kháng nguyên bổ sung. Các Công bố đơn PCT số WO 2013/163427 và WO 2013/119903 đề cập đến việc cải biến miền CH2 để chứa sản phẩm cộng protein dung hợp chứa miền gắn kết. Tài liệu này lưu ý là miền CH2 có thể chỉ đóng vai trò tối thiểu trong việc điều tiết chức năng hiệu ứng. Các Công bố đơn PCT số WO 2010/028797, WO 2010/028796 và WO 2010/028795 đề cập đến các kháng thể tái tổ hợp, mà các vùng Fc của chúng đã được thay thế bằng các miền VL và VH bổ sung, để tạo thành các phân tử gắn kết hoá trị ba. Các Công bố đơn PCT số WO 2003/025018 và WO 2003/012069 bộc lộ kháng thể thể đôi tái tổ hợp, mà các chuỗi riêng rẽ của chúng có chứa các miền scFv. Công bố đơn PCT số WO 2013/006544 bộc lộ các phân tử Fab đa giá mà được tổng hợp dưới dạng chuỗi polypeptit đơn và tiếp đó được thuỷ phân protein để cho các cấu trúc heterodime. Do đó, các phân tử đã bộc lộ trong các tài liệu này trao đổi toàn bộ hoặc một vài khả năng của chức năng hiệu ứng điều tiết cho khả năng gắn kết các loại kháng nguyên bổ sung. Các Công bố đơn PCT số WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 và WO 1991/003493 bộc lộviệc bổ sung các miền gắn kết bổ sung hoặc các nhóm chức năng cho kháng thể hoặc đoạn kháng thể (ví dụ, bổ sung kháng thể thể đôi vào chuỗi nhẹ của kháng thể này, hoặc bổ sung các miền VL và VH bổ sung vào các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể này, hoặc bổ sung protein dung hợp khác loài hoặc nối chuỗi nhiều miền Fab với nhau). Do đó, các phân tử đã bộc lộ trong các tài liệu này trao đổi cấu trúc kháng thể chưa qua xử lý cho khả năng gắn kết các loại kháng nguyên bổ sung.

Lĩnh vực này còn được lưu ý thêm khả năng sản xuất kháng thể thể đôi mà khác biệt với các kháng thể tự nhiên ở khả năng gắn kết hai hoặc nhiều loại epitop (nghĩa là, thể hiện tính đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu ngoài hoá trị hai hoặc đa hoá trị) (xem, ví dụ, *"Diabodies": Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448, (1993) của Holliger và các đồng tác giả; US 2004/0058400 (Hollinger và các đồng tác giả); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens và các đồng tác giả); FEBS Lett. 454(1-2):90-94, (1999) của Alt và các đồng tác giả; *"A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The*

Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, (2005) của Lu, D. và các đồng tác giả; WO 02/02781 (Mertens và các đồng tác giả); *"Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,"* Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27, (2004) của Olafsen, T. và các đồng tác giả; *"Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange,"* Protein Engineering 14(2):1025-1033, (2001) của Wu, A. và các đồng tác giả; *"A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,"* Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992, (2004) của Asano và các đồng tác giả; *"Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,"* Protein Eng. 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. và các đồng tác giả; *"Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,"* Cancer Res. 69(12):4941-4944, (2009) của Baeuerle, P.A. và các đồng tác giả).

Việc thiết kế kháng thể thể đôi là dựa trên dẫn xuất kháng thể được biết đến là mảnh miền biến đổi chuỗi đơn (scFv). Các phân tử này được tạo ra bằng cách liên kết các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc nặng bằng cách sử dụng peptit liên kết ngắn. Bird và các đồng tác giả (1988) (*"Single-Chain Antigen-Binding Proteins,"* Science 242:423-426) mô tả ví dụ về các peptit liên kết mà cầu nối là khoảng 3,5 nm giữa đầu tận cùng carboxy của một miền biến đổi và đầu tận cùng amino của miền biến đổi còn lại. Các liên kết của các trình tự khác đã được thiết kế và sử dụng (*"Single-Chain Antigen-Binding Proteins,"* Science 242:423-426, (1988) của Bird và các đồng tác giả). Các liên kết tiếp đó có thể được cải biến cho các chức năng bổ sung, như gắn các thuốc hoặc gắn với chất nền rắn. Các biến thể chuỗi đơn có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Để sản xuất tổng hợp scFv, có thể sử dụng thiết bị tổng hợp tự động. Để sản xuất tái tổ hợp scFv, plasmit thích hợp có chứa polynucleotit mà mã hoá scFv có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp, hoặc là sinh vật nhân thực, như các tế bào nấm men, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc là sinh vật nhân thực, như E. coli. Các polynucleotit mã hoá scFv quan tâm có thể được tạo ra bằng cách xử lý thông thường như nối các polynucleotit. scFv thu được có thể được phân lập bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Việc tạo ra kháng thể thể đôi không phải đơn đặc hiệu tạo ra ưu thế đáng kể đối với các kháng thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở, khả năng nối đồng thời đồng thời và định vị đồng thời các tế bào biểu hiện các epitop khác nhau. Do đó, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép có các ứng dụng rộng rãi kể cả trị liệu và chẩn đoán miễn dịch. Tính đặc hiệu kép cho phép khả năng linh hoạt tốt trong việc thiết kế và thao tác di truyềnkháng thể thể đôi trong nhiều ứng dụng, tạo ra tính phàm được gia tăng đối với các kháng nguyên multime, liên kết ngang của các kháng nguyên phân biệt, và nhắm đích có điều khiển đến các loại tế bào cụ thể dựa trên sự có mặt của cả hai kháng nguyên đích. Do hoá trị gia tăng của chúng, tỷ lệ phân ly thấp và thanh thải nhanh chóng từ hệ tuần hoàn (đối với kháng thể thể đôi cỡ nhỏ, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50 kDa), các phân tử kháng thể thể đôi đã biết trong lĩnh vực này cũng đã chứng tỏ ứng dụng cụ thể trong lĩnh vực chụp khối u (*"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabody Expressed In Pichia pastoris,"* Protein Eng. 10:1221, (1997) của Fitzgerald và các đồng tác giả).

Tính đặc hiệu kép của kháng thể thể đôi đã dẫn đến việc sử dụng chúng để nối đồng thời các tế bào phân biệt, ví dụ, liên kết ngang của tế bào T gây độc tế bào với các tế bào khối u (*"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,"* Nature 314:628-631, (1985) của Staerz và các đồng tác giả và *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-cell Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305, (1996) của Holliger và các đồng tác giả; *"Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,"* Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658, (2005) của Marvin và các đồng tác giả). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép có thể được sử dụng để nối đồng thời các thụ thể trên bề mặt của các tế bào khác nhau hoặc trên một tế bào duy nhất. Việc nối đồng thời các tế bào và/hoặc thụ thể khác nhau là hữu ích đối với các chức năng hiệu ứng điều biến và/hoặc tín hiệu của tế bào miễn dịch. Các phân tử đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép) bao gồm các vị trí gắn kết epitop có thể hướng đến yếu tố quyết định bề mặt của tế bào miễn dịch bất kỳ, như B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), thụ thể hoạt hóa tiêu diệt (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d,

OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), và/hoặc VISTA (PD-1H), mà được biểu hiện trên các tế bào lympho T, các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), các tế bào trình diện kháng nguyên hoặc tế bào bạch cầu đơn nhân khác. Cụ thể là, các vị trí gắn kết epitop nhằm đến thụ thể bề mặt tế bào mà tham gia điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch (hoặc phối tử của nó) là hữu ích để tạo ra các phân tử gắn kết đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu mà đối kháng hoặc phong bế tín hiệu ức chế của các phân tử điểm kiểm tra miễn dịch và nhờ đó kích thích, điều hoà tăng hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Các phân tử tham gia quá trình điều hoà các điểm kiểm tra miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 và/hoặc VISTA.

Tuy nhiên, các ưu thế trên đi kèm với chi phí tương đối. Việc tạo thành kháng thể thể đôi không phải đơn đặc hiệu này đòi hỏi phải lắp ráp thành công hai hoặc nhiều polypeptit phân biệt và khác nhau (nghĩa là, việc tạo thành này đòi hỏi kháng thể thể đôi phải được tạo thành thông qua quá trình heterodime hoá các loại chuỗi polypeptit khác nhau). Thực tế này trái ngược với kháng thể thể đôi đơn đặc hiệu, kháng thể này được tạo thành thông qua quá trình homodime hoá chuỗi polypeptit tương đồng. Do ít nhất hai polypeptit không tương tự (nghĩa là, hai loại polypeptit) cần phải được tạo ra để tạo thành kháng thể thể đôi không phải đơn đặc hiệu, và do quá trình homodime hoá các polypeptit này dẫn đến phân tử không có hoạt tính (*"Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,"* Protein Eng. 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. và các đồng tác giả), việc sản xuất các polypeptit này cần phải hoàn thành theo cách sao cho ngăn cản sự liên kết cộng hoá trị giữa các polypeptit cùng loại (nghĩa là, sao cho ngăn cản quá trình homodime hoá) *"Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,"* Protein Eng. 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. và các đồng tác giả). Do đó, lĩnh vực kỹ thuật này đã đưa ra việc kết hợp không phải cộng hoá trị các polypeptit này (xem, ví dụ, *"Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,"* Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27,

(2004) của Olafsen và các đồng tác giả; *"A Antibody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,"* Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992, (2004) của Asano và các đồng tác giả; *"Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,"* Protein Eng. 13(8):583-588, (2000) của Takemura, S. và các đồng tác giả; *"A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,"* J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, (2005) của Lu, D. và các đồng tác giả).

Tuy nhiên, lĩnh vực này đã thừa nhận là kháng thể thể đôi đặc hiệu kép gồm có các polypeptit được kết hợp không phải theo cách cộng hoá trị là không ổn định và dễ bị phân ly thành các monome không hoạt động (xem, ví dụ, *"A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,"* J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, (2005) của Lu, D. và các đồng tác giả).

Đối mặt với thách thức này, lĩnh vực này đã thành công trong việc phát triển kháng thể thể đôi không phải đơn đặc hiệu heterodime được liên kết cộng hoá trị ổn định, được gọi là kháng thể thể đôi DART® (các chất tái nhắm đích ái lực kép - Dual Affinity Re-Targeting Reagents); xem, ví dụ, các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2013-0295121; 2010-0174053 và 2009-0060910; Công bố bằng sáng chế Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và Công bố đơn PCT số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; và *"Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells,"* PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10,1371/journal.ppat.1005233, (2015) của Sloan, D.D. và các đồng tác giả; *"Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform,"* Blood pii: blood-2014-05-575704, (2015) của Al Hussaini, M. và các đồng tác giả; *"A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity and Safety In Nonhuman Primates,"* Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82, (2015) của Chichili, G.R. và các đồng tác giả; *"Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,"* Blood 117(17):4542-4551, (2011) của Moore, P.A. và các đồng tác giả;

"Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943, (2010) của Veri, M.C. và các đồng tác giả; *"Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis and in vivo B-Cell Depletion,"* J. Mol. Biol. 399(3):436-449, (2010) của Johnson, S. và các đồng tác giả). Kháng thể thể đôi bao gồm hai hoặc nhiều polypeptit được tạo phức cộng hoá trị và bao gồm thao tác di truyền một hoặc nhiều gốc xystein vào mỗi loại polypeptit được dùng, mà cho phép các liên kết đisulfua tạo thành và do đó liên kết theo cách cộng hoá trị 2 chuỗi polypeptit. Ví dụ, việc bổ sung gốc xystein vào đầu tận cùng C của các cấu trúc này đã chứng tỏ là cho phép tạo liên kết đisulfua giữa các chuỗi polypeptit, làm ổn định heterodime thu được mà không ảnh hưởng đến các đặc tính gắn kết của phân tử hoá trị hai này.

Một trong hai polypeptit của kháng thể thể đôi DART® đặc hiệu kép đơn giản nhất bao gồm 3 miền. Polypeptit thứ nhất bao gồm (theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ nhất (VL1), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ hai (VH2), và (iii) miền thứ ba có chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và miền thúc đẩy heterodime nhằm thúc đẩy quá trình heterodime hoá với polypeptit thứ hai của kháng thể thể đôi và để liên kết cộng hoá trị các polypeptit thứ nhất và thứ hai của kháng thể thể đôi này với nhau. Polypeptit thứ hai có chứa (theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ hai (VL2), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ nhất (VH1), và (iii) miền thứ ba có chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và miền thúc đẩy heterodime bổ trợ mà tạo phức với miền thúc đẩy heterodime của chuỗi polypeptit thứ nhất để thúc đẩy quá trình heterodime hoá với chuỗi polypeptit thứ nhất. Gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) của miền thứ ba thuộc chuỗi polypeptit thứ hai có vai trò thúc đẩy tạo liên kết cộng hoá trị của chuỗi polypeptit thứ hai với chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này. Các phân tử là ổn định, có hiệu lực, và có khả năng gắn kết đồng thời hai hoặc nhiều kháng nguyên. Theo một phương án, các miền thứ ba của polypeptit thứ nhất và thứ hai, mỗi miền có chứa gốc xystein, gốc này có vai trò liên kết các polypeptit với nhau thông qua liên kết đisulfua. Fig.1 là biểu đồ

của kháng thể thể đôi này, kháng thể này sử dụng các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/cuộn K và liên kết có chứa xystein để tạo liên kết cộng hoá trị. Như được đưa ra trong Fig.2 và Fig.3A-Fig.3C, một hoặc cả hai polypeptit này có thể có thêm trình tự của miền CH2-CH3, sao cho việc tạo phức giữa hai polypeptit của kháng thể thể đôi tạo thành vùng Fc mà có khả năng gắn kết với thụ thể Fc của các tế bào (như các tế bào lympho B, các tế bào tua, các tế bào tiêu diệt tự nhiên, các đại thực bào, các bạch cầu trung tính, các tế bào ưa eosin, các bạch cầu ưa kiềm và các tế bào mast). Như được đề cập chi tiết hơn dưới đây, các miền CH2 và/hoặc CH3 của chuỗi polypeptit này không nhất thiết phải tương đồng về trình tự, và có lợi là được cải biến để hỗ trợ việc tạo phức giữa hai chuỗi polypeptit.

Nhiều biến thể của các phân tử này đã được mô tả (xem, ví dụ, các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 và 2009/0060910; Công bố sáng chế Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và Công bố đơn PCT số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Kháng thể thể đôi DART® chứa vùng Fc này có thể bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit. Chuỗi polypeptit thứ nhất bao gồm (theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ nhất (VL1), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ hai (VH2), (iii) miền thứ ba có chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và có vai trò thúc đẩy quá trình heterodime hoá với polypeptit thứ hai của kháng thể thể đôi và để liên kết cộng hoá trị polypeptit thứ nhất và thứ hai của kháng thể thể đôi này với nhau, và (iv) miền CH2-CH3. Polypeptit thứ hai có chứa (theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C): (i) miền thứ nhất bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thứ hai (VL2), (ii) miền thứ hai bao gồm vùng gắn kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch thứ nhất (VH1), và (iii) miền thứ ba có chứa gốc xystein (hoặc miền chứa xystein) và miền thúc đẩy heterodime mà thúc đẩy quá trình heterodime hoá với chuỗi polypeptit thứ nhất. Tại đây hai polypeptit thứ nhất tạo phức với nhau để tạo thành vùng Fc. Fig.3A-Fig.3C là các biểu đồ ba biến thể của các kháng thể thể đôi này sử dụng các miền thúc đẩy heterodime khác nhau.

Kháng thể thể đôi DART® chứa vùng Fc khác có thể bao gồm ba chuỗi polypeptit. Polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi DART® này có chứa ba miền: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền chứa trình tự CH2-CH3. Polypeptit thứ hai của các kháng thể thể đôi DART® này có chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1 và (iii) miền thúc đẩy quá trình heterodime hoá và tạo liên kết cộng hoá trị với chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này. Polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi DART® này bao gồm trình tự CH2-CH3. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của kháng thể thể đôi DART® này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL1/VH1 mà có khả năng gắn kết với epitop, cũng như vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai. Các phân tử DART® phức tạp hơn cũng có các miền chứa xystein có chức năng tạo thành phức hợp liên kết cộng hoá trị. Do đó, polypeptit thứ nhất và thứ hai được liên kết với nhau thông qua liên kết đisulfua gồm các gốc xystein ở các miền thứ ba tương ứng của chúng. Đáng chú ý là, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo thành vùng Fc mà được làm ổn định nhờ liên kết đisulfua. Fig.4A-Fig.4B cung cấp các biểu đồ của kháng thể thể đôi này bao gồm ba chuỗi polypeptit.

Kháng thể thể đôi DART® chứa vùng Fc khác nữa có thể bao gồm năm chuỗi polypeptit, các chuỗi này có thể bao gồm các vùng gắn kết từ các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của tối đa đến ba globulin miễn dịch khác nhau (được gọi là VL1/VH1, VL2/VH2 và VL3/VH3). Ví dụ, chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này có thể có chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của các kháng thể thể đôi này có thể có chứa: (i) miền chứa VL1, và (ii) miền chứa CL. Chuỗi polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi có thể có chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3, (iv) miền chứa VL2, (v) miền chứa VH3 và (vi) miền thúc đẩy heterodime, trong đó các miền thúc đẩy heterodime thúc đẩy quá trình dime hoá của chuỗi thứ ba với chuỗi thứ tư. Polypeptit thứ tư của kháng thể thể đôi này có thể có chứa: (i) miền chứa VL3, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền thúc đẩy heterodime hoá và tạo liên kết cộng hoá trị với chuỗi polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi này. Tại đây polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo thành vùng Fc. Các phân tử DART® phức tạp hơn cũng có chứa các miền chứa xystein, các miền này có chức năng tạo thành phức hợp liên kết cộng hoá trị, sao cho mỗi chuỗi polypeptit được liên kết với

ít nhất một chuỗi polypeptit bổ sung thông qua liên kết đisulfua gồm các gốc xystein. Tốt hơn là, các miền này có thứ tự theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C. Fig.5 là biểu đồ của các kháng thể thể đôi này bao gồm năm chuỗi polypeptit.

Các cấu trúc khác là đã biết trong lĩnh vực này đối với các ứng dụng, trong đó phân tử hoá trị bốn là phân tử mong muốn, nhưng Fc là không cần thiết, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể tandem hoá trị bốn, còn được gọi là "TandAbs" (xem, ví dụ, các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; các Công bố sáng chế Châu Âu số EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 và EP 1293514; các Công bố đơn PCT số WO 1999/057150, WO 2003/025018, và WO 2013/013700), các kháng thể này được tạo thành bằng cách homodime hoá hai chuỗi tương đồng, mỗi chuỗi có miền VH1, VL2, VH2, và VL2.

Gần đây, các cấu trúc hoá trị ba kết hợp hai miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi và một miền gắn kết không phải kiểu kháng thể thể đôi và vùng Fc đã được mô tả (xem, ví dụ, Đơn PCT số: PCT/US15/33076, có tên "Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof," nộp đơn ngày 29/5/2015; và PCT/US15/33081, có tên "Tri-Specific Binding Molecules That specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof," nộp đơn ngày 29/5/2015). Các phân tử hoá trị ba này có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc tam đặc hiệu. Fig.6A-Fig.6F là các biểu đồ của các phân tử hoá trị ba này bao gồm ba hoặc bốn chuỗi polypeptit.

IV. Các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người theo sáng chế

Các phân tử gắn kết PD-1 được ưu tiên theo sáng chế bao gồm các kháng thể, các kháng thể thể đôi, các BiTE, v.v. và có khả năng gắn kết với đoạn liên tục hoặc không liên tục (ví dụ, cấu dạng) (epitop) của PD-1 của người (CD279). Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế sẽ tốt hơn nếu bộc lộ khả năng gắn kết với các phân tử PD-1 của một hoặc nhiều loài không phải của người, cụ thể là, loài động vật linh trưởng (và đặc biệt là loài động vật linh trưởng, như khỉ cynomolgus). Polypeptit PD-1 của người điển hình (trình tự NCBI NP_005009.2; bao gồm trình tự tín hiệu 20 gốc axit amin (được thể hiện gạch chân) và protein trưởng thành 268 gốc axit amin) có trình tự axit amin (SEQ ID NO:68):

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA

TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người theo sáng chế được đặc trưng bởi bất kỳ (một hoặc nhiều) tiêu chí trong số các tiêu chí dưới đây:

(1) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người được biểu hiện nội sinh trên bề mặt của tế bào T của người bị kích thích;

(2) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người với hằng số gắn kết cân bằng (K_D) là nhỏ hơn hoặc bằng 40 nM;

(3) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người với hằng số gắn kết cân bằng (K_D) là nhỏ hơn hoặc bằng 5 nM;

(4) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người với tốc độ kết hợp (k_a) là lớn hơn hoặc bằng 1,5 x 10^4 M^{-1}phút^{-1};

(5) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người với tốc độ kết hợp (k_a) là lớn hơn hoặc bằng 90,0 x 10^4 M^{-1}phút^{-1};

(6) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người với tốc độ phân ly (k_d) là nhỏ hơn hoặc bằng 7 x 10^{-4}phút^{-1};

(7) gắn kết đặc hiệu PD-1 của người với tốc độ phân ly (k_d) là nhỏ hơn hoặc bằng 2 x 10^{-4}phút^{-1};

(8) gắn kết đặc hiệu PD-1 của động vật linh trưởng không phải của người (ví dụ, PD-1 của khỉ cynomolgus);

(9) ức chế (nghĩa là, phong bế hoặc gây nhiễu) hoạt tính gắn kết/ức chế của phối tử PD-1 (PD-L1/PD-L2) với PD-1;

(10) kích thích đáp ứng miễn dịch; và/hoặc

(11) hiệp đồng với kháng thể kháng LAG-3 của người để kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên" chỉ các đáp ứng bởi tế bào T mà là do sự kích thích tế bào T này bằng kháng nguyên mà tế bào T này đặc hiệu với. các ví dụ không giới hạn về các đáp ứng bởi tế bào T khi kích thích đặc hiệu kháng nguyên bao gồm quá trình tăng sinh và sản sinh xytokin (ví dụ, sản sinh TNF-α, IFN-γ). Khả năng kích thích đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên của phân tử có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được kích thích bằng kháng nguyên độc tố ruột týp B của *Staphylococcus aureus* ("SEB") được mô tả trong bản mô tả này.

Các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người được ưu tiên theo sáng chế có các miền VH và/hoặc VL của các kháng thể đơn dòng của chuột kháng PD-1 của người "PD-1 mAb 1," "PD-1 mAb 2," "PD-1 mAb 3,""PD-1 mAb 4," "PD-1 mAb 5," "PD-1 mAb 6," "PD-1 mAb 7," "PD-1 mAb 8," "PD-1 mAb 9," "PD-1 mAb 10," "PD-1 mAb 11," "PD-1 mAb 12," "PD-1 mAb 13," "PD-1 mAb 14," hoặc "PD-1 mAb 15," và tốt hơn là có 1, 2 hoặc toàn bộ 3 CDR_H của miền VH và/hoặc 1, 2 hoặc toàn bộ 3 CDR_L của miền VL của các kháng thể đơn dòng kháng PD-1 của người này. Các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người được ưu tiên này bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép (hoặc đa đặc hiệu), khảm hoặc được làm giống như của người, các BiTe, kháng thể thể đôi, v.v., và các phân tử gắn kết này có các vùng Fc biến thể.

Sáng chế cụ thể đề cập đến các phân tử gắn kết PD-1 chứa miền gắn kết PD-1 mà có:

(A) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1mAb 1;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 1;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 1 và 3 CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 1;

(4) miền VH của hPD-1 mAb 1 VH1;

(5) miền VL của hPD-1 mAb 1 VL1;

(6) các miền VH và VL của hPD-1 mAb 1;

(B) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 2;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 2;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 2 và 3 CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 2;

(4) miền VH của hPD-1 mAb 2 VH1;

(5) miền VL của hPD-1 mAb 2 VL1;

(6) các miền VH và VL của hPD-1 mAb 2;

(C) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 3;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 3;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 3 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 3;

(D) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 4;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 4;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 4 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 4;

(E) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 5;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 5;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 5 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 5;

(F) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 6;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 6;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 6 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 6;

(G) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 7;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 7, hoặc hPD-1 mAb 7 VL2, hoặc hPD-1 mAb 7 VL3;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 7 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 7, hoặc hPD-1 mAb 7 VL2, hPD-1 mAb 7 VL3;

(4) miền VH của hPD-1 mAb 7 VH1, hoặc hPD-1 mAb 7 VH2;

(5) miền VL của hPD-1 mAb 7 VL1, hoặc hPD-1 mAb 7 VL2, hoặc hPD-1 mAb 7 VL 3;

(6) các miền VH và VL của hPD-1 mAb 7(1.1), hoặc hPD-1 mAb 7(1.2), hoặc hPD-1 mAb 7(1.3), hoặc hPD-1 mAb 7(2.1), hoặc hPD-1 mAb 7(2.2), hoặc hPD-1 mAb 7(2.3);

(H) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 8;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 8;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 8 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 8;

(I) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 9, hoặc hPD-1 mAb 9 VH2;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 9, hoặc hPD-1 mAb 9 VL2;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 9, hoặc hPD-1 mAb 9 VH2 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 9, hoặc hPD-1 mAb 9 VL2;

(4) miền VH của hPD-1 mAb 9 VH1, hoặc hPD-1 mAb 9 VH2;

(5) miền VL của hPD-1 mAb 9 VL1, hoặc hPD-1 mAb 9 VL2;

(6) các miền VH và VL của hPD-1 mAb 9(1.1), hoặc hPD-1 mAb 9(1.2), hoặc hPD-1 mAb 9(2.1), hoặc hPD-1 mAb 9(2.2);

(J) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 10;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 10;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 10 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 10;

(K) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 11;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 11;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 11 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 11;

(L) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 12;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 12;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 12 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 12;

(M) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 13;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 13;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 13 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 13;

(N) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 14;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 14;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 14 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 14;

(O) (1) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 15;

(2) ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 15;

(3) ba CDR_H của miền VH của PD-1 mAb 15 và ba CDR_L của miền VL của PD-1 mAb 15;

(4) miền VH của hPD-1 mAb 15 VH1;

(5) miền VL của hPD-1 mAb 15 VL1;

(6) các miền VH và VL của hPD-1 mAb 15;

hoặc

mà gắn kết, hoặc cạnh tranh để gắn kết với, cùng epitop như PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15.

A. Kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 1

1. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 1

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:69) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT **NDYAWN**WIRQ FPGNKLEWMG **HITYSGSTSY NPSLKS**RISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCAR**DY GSGYPYTLDY** WGQGTSVTVS S

CDR_H1 của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:71): NDYAWN

CDR_H2 của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:72): HITYSGSTSYNPSLKS

CDR_H3 của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:73): DYGSGYPYTLDY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 1 là SEQ ID NO:70 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc acctgcactg tcactggctt ctcaatcacc **aatgattatg cctggaac**tg gatccgacag tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc **cacataacct acagtggcag cactagctac aacccatctc tcaaa**agtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc aaga**gattac ggtagtggct acccctatac tttggactac** tggggtcaag gtacctcagt caccgtctcc tcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:74) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTC**SATSIVS YVY**WYQQKPG SSPQPWIY**LT SNLAS**GVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW SDNPYT**FGGG TKLEIK

CDR_L1 của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:76): SATSIVSYVY

CDR_L2 của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:77): LTSNLAS

CDR_L3 của PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:78): QQWSDNPYT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 1 là SEQ ID NO:75 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgc**a gtgccacctc aattgtaagt tacgtttac**t ggtaccagca gaagcctgga tcctcccccc aaccctggat ttat**ctcaca tccaacctgg cttct**ggagt ccctgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcagcat ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg c**cagcagtgg agtgataacc cgtacacg**tt cggaggggg accaagctgg aaataaaa

2. Quá trình làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 1 để tạo thành "hPD-1 mAb 1"

Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 1 nêu trên được làm giống như của người và còn được khử miễn dịch khi các epitop kháng nguyên được xác định để chứng tỏ khả năng làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người nhằm làm giảm tính kháng nguyên của nó khi sử dụng cho người nhận. Quá trình làm giống như của người tạo ra một miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 1 VH1," và một miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 1 VL1." Do đó, kháng thể bao gồm các miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi là "hPD-1 mAb 1."

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 1 VH1 (SEQ ID NO:79) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCTVSGFSIS **NDYAWN**WIRQ PPGKGLEWIG **HITYSGSTSY NPSLKS**RLTI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCAR**DY GSGYPYTLDY** WGQGTTVTVS S

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 1 VH1 là SEQ ID NO:80 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac
actgagcctg acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca **aatgactacg**
cctggaattg gattaggcag cctcccggta aagggctgga gtggatcggc
cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatcccagtc tgaagagccg
tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt ctgaccatga
ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcga**gattat**
ggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt
gaccgtgagc tcc

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO:81) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITC**SATSIVS YVY**WYQQKPG QAPQPLIY**LT SNLAS**GIPAR FSGSGSGTDF TLTISSLEAE DAATYYC**QQW SDNPYT**FGGG TKVEIK

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 1 VL1 là SEQ ID NO:82 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaaatcgttc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga
aaaggtcacc attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact
ggtatcagca gaagcccggt caggctcccc agccattgat atatctgacc
agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt ttttccggta gcgggtccgg
gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa gacgccgcca
cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc
accaaagtcg aaataaag

B. Kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 2

1. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 2

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:83) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSGSMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLS
DYFDYWGQGT TLTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:85): SFGMH

CDR_H2 của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:86): YISSGSMSISYADTVKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:87): LSDYFDY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 2 là SEQ ID NO:84 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc
ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac
atcagtagtg gcagtatgag catttcctat gcagacacag tgaagggccg
attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga
ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atcctgagt
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:88) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQSLV HSTGNTYLH**W YLQKPGQSPK LLIY**RVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFC**SQTTHVP WT**FGGGTKLE IK

CDR_L1 của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:90): RSSQSLVHSTGNTYLH

CDR_L2 của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:91): RVSNRFS

CDR_L3 của PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:92): SQTTHVPWT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 2 là SEQ ID NO:89 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgc**a gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttacat**tgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ac**agggtttc taaccgattt tct**ggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgc**t ctcaaactac acatgttccg tggacg**ttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

2. Quá trình làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 2 để tạo thành "hPD-1 mAb 2"

Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 2 nêu trên được làm giống như của người và còn được khử miễn dịch khi các epitop kháng nguyên được xác định để chứng tỏ khả năng làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người nhằm làm giảm tính kháng nguyên của nó khi sử dụng cho người nhận. Việc làm giống như của người tạo ra một miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 2 VH1," và một miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 1 VL1." Do đó, kháng thể bất kỳ bao gồm các miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi là "hPD-1 mAb 2."

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 2 VH1 (SEQ ID NO:93 được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS **SFGMH**WVRQA PGKGLEWVA**Y**
ISSGSMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTED TALYYCAS**LS**
DYFDYWGQGT TVTVSS

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 2 VH1 là SEQ ID NO:94 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaagtgcaat tggttgagag tggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag
tctgcggttg tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc **tcttttggga**
tgcattgggt gcgccaggct cccggcaagg gtctcgagtg ggtagca**tac**
atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaaggcag
gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac ctgcaaatga
atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttcc**ctgtct**
gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 2 VL1 (SEQ ID NO:95 được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISC**RSSQSLV HSTGNTYLH**W YLQKPGQSPQ
LLIY**RVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**SQTTHVP**
WTFGQGTKLE IK

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 2 VL1 là SEQ ID NO:96 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca
gccagccagt atttcttgt**c ggagttcaca gagtctggta cattccacag**
gaaatacata tctccattgg tacctgcaaa aaccagggca gagcccccag
ctgctgattt at**agagtgtc taatcgattt tct**ggcgtgc cagatcggtt
cagcggcagc gggtctggca ctgatttcac actgaaaatc tctagggtgg
aggcagagga cgtaggcgtt tactactgt**a gtcagaccac ccatgtaccc**
tggacttttg gccaaggtac taagctggaa atcaag

C. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 3

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:97) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT **DYVMH**WVKQT PVHGLEWIG**T**
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYFTR**EK**
ITTIVEGTYW YFDVWGTGTT VTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:99): DYVMH

CDR_H2 của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:100): TIDPETGGTAYNQKFKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:101): EKITTIVEGTYWYFDV

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 3 là SEQ ID NO:98 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact **gactatgtaa tgcac**tgggt gaagcagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattgga**act attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggc**aa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aaga**gagaag attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tc**tggggcac agggaccacg gtcaccgtct cctca

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:102) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQNIV HSNGDTYLE**W YLQKPGQSPK LLIY**KVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**FQGSHLP YT**FGGGTKLE IK

CDR_L1 của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:104): RSSQNIVHSNGDTYLE

CDR_L2 của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:105): KVSNRFS

CDR_L3 của PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:106): FQGSHLPYT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 3 là SEQ ID NO:103 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgc**a gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaa**tgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct at**aaagtttc caaccgattt tct**ggggtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgc**t ttcaaggttc acatcttccg tacacg**ttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

D. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 4

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:107) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS **SFGMH**WVRQA PEKGLEWVA**Y**
ISSGSMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCAS**LT**
DYFDYWGQGT TLTVSS

CDR$_H$1 của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:109): SFGMH

CDR$_H$2 của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:110): YISSGSMSISYADTVKG

CDR$_H$3 của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:111): LTDYFDY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 4 là SEQ ID NO:108 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR$_H$ được thể hiện gạch chân):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc
ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt **agctttggaa**
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgca**tat**
attagtagtg gcagtatgag tatttcctat gcagacacag tgaagggccg
attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga
ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atcc**ctgact**
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:112) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR$_L$ được thể hiện gạch chân):

DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQSLV HSTGNTYFH**W YLQKPGQSPK
LLIY**RVSNRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFC**SQTTHVP**
WTFGGGTKLE IK

CDR$_L$1 của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:114): RSSQSLVHSTGNTYFH

CDR$_L$2 của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:115): RVSNRFS

CDR$_L$3 của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:116): SQTTHVPWT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 4 là SEQ ID NO:113 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR$_L$ được thể hiện gạch chân):

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
tcaagcctcc atctcctgc**a gatctagtca gagccttgtt cacagtactg**
gaaacaccta tttccattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag
ctcctgatct ac**agggtttc taaccgattt tct**ggggtcc ccgacaggtt
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
aggctgagga tctgggagtt tatttctgc**t ctcaaactac acatgttccg**
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

E. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 5

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:117) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT **AYWMN**WMKQR PGQGLEWIG**V**
IHPSDSETWL NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAR**EH**
YGSSPFAYWG QGTLVTVSA

CDR_H1 của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:119): AYWMN

CDR_H2 của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:120): VIHPSDSETWLNQKFKD

CDR_H3 của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:121): EHYGSSPFAY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 5 là SEQ ID NO:118 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

caggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc
agtgaagctg tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc **gcctactgga**
tgaactggat gaaacagagg cctggacaag gccttgagtg gattggc**gtg**
attcatcctt ccgatagtga aacttggtta aatcagaagt tcaaggacaa
ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactca
tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaga**gagcac**
tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:122) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RANESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL
LIY**AASNQGS** GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FC**QQSKEVPY**
TFGGGTKLEI K

CDR_L1 của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:124): RANESVDNYGMSFMN

CDR_L2 của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:125): AASNQGS

CDR_L3 của PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:126): QQSKEVPYT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 5 là SEQ ID NO:123 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
gagggccacc atctcctgc**a gagccaacga aagtgttgat aattatggca**

tgagttttat gaactggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag
tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg
aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

F. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 6

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:127) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRLEWVAT
ISGGGSDTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSSLRSED TALYYCARQK
ATTWFAYWGQ GTLVTVST

CDR_H1 của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:129): SYGMS

CDR_H2 của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:130): TISGGGSDTYYPDSVKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:131): QKATTWFAY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 6 là SEQ ID NO:128 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct ggggtgcctt cacgtttttc
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:132) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NYGISFMNWF QQKPGQPPKL
LIYPASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FCQQSKEVPW
TFGGGTKLEI K

CDR_L1 của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:134): RASESVDNYGISFMN

CDR_L2 của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:135): PASNQGS

CDR_L3 của PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:136): QQSKEVPWT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 6 là SEQ ID NO:133 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

G. **gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc atctcctgc**a gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaac**tggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctat**c ctgcatccaa ccaaggatcc **ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgt**cagc aaagtaagga ggttccgtgg acg**ttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa**Kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 7

1. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 7

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:137) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT **SYWMN**WVKQR PGQGLEWIG**V IHPSDSETWL DQKFKD**KATL TVDKSSTTAY MQLISPTSED SAVYYCAR**EH YGTSPFAY**WG QGTLVTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:139): SYWMN

CDR_H2 của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:140): VIHPSDSETWLDQKFKD

CDR_H3 của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:141): EHYGTSPFAY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 7 là SEQ ID NO:138 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc **agctactgga tgaac**tgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggc**gtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta gatcagaagt tcaagga**caa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagg**gagcac tacggtacta gcccgtttgc ttac**tggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:142) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RANESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL LIH**AASNQGS** GVPARFSGSG FGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FC**QQSKEVPY T**FGGGTKLEI K

CDR_L1 của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:144): RANESVDNYGMSFMN

CDR_L2 của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:145): AASNQGS

CDR_L3 của PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:146): QQSKEVPYT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 7 là SEQ ID NO:143 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc atctcctgc**a gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaac**tggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccat**g ctgcatccaa ccaaggatcc** ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgt**cagc aaagtaagga ggttccgtac acg**ttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

2. Quá trình làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 7 để tạo thành "hPD-1 mAb 7"

Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 7 nêu trên được làm giống như của người và còn được khử miễn dịch khi các epitop kháng nguyên được xác định để chứng tỏ khả năng làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người nhằm làm giảm tính kháng nguyên của nó khi sử dụng cho người nhận. Việc làm giống như của người tạo ra hai miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 7 VH1," và "hPD-1 mAb 7 VH2," và ba miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 7 VL1," "hPD-1 mAb 7 VL2," và "hPD-1 mAb 7 VL3." Miền bất kỳ trong số các miền VL được làm giống như của người có thể được ghép cặp với một trong hai miền VH được làm giống như của người. Do đó, kháng thể bất kỳ bao gồm một trong số các miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi chung là "hPD-1 mAb 7," và các tổ hợp cụ thể của các miền VH/VL được làm giống như của người được gọi bằng cách viện dẫn đến các miền VH/VL cụ thể, ví dụ kháng thể được làm giống như của người bao gồm hPD-1 mAb 7 VH1 và hPD-1 mAb 1 VL2 được gọi cụ thể là "hPD-1 mAb 7(1.2)."

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 7 VH1 (SEQ ID NO:147) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT **SYWMN**WVRQA PGQGLEWIG**V**
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR**EH**
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 7 VH1 là SEQ ID NO:148 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag
tgttaaggtg tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca **agctattgga**
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg gattggg**gtg**
atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc caga**gagcac**
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt
atcctcc

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 7 VH2 (SEQ ID NO:149) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT **SYWMN**WVRQA PGQGLEWAG**V**
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR**EH**
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 7 VH2 là SEQ ID NO:150 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag
tgttaaggtg tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca **agctattgga**
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggg**gtg**
atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc caga**gagcac**
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt
atcctcc

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 7 VL1 (SEQ ID NO:151) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RANESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL
LIH**AASNQGS** GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FC**QQSKEVPY**
TFGGGTKVEI K

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 7 VL1 là SEQ ID NO:152 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
acgtgccact ctcagctgc**a gagcaaatga gagtgtggac aattacggca**
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
ctcatccac**g ccgcctctaa ccagggatct** ggggtgcctt cacgtttttc
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat**
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 7 VL2 (SEQ ID NO:153) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL
LIH**AASNQGS** GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FC**QQSKEVPY**
TFGGGTKVEI K

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 7 VL2 là SEQ ID NO:154 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
acgtgccact ctcagctgc**a gagcaagtga gagtgtggac aattacggca**
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
ctcatccac**g ccgcctctaa ccagggatct** ggggtgcctt cacgtttttc
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat**
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 7 VL3 (SEQ ID NO:155) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASESVD NYGMSFMN**WF QQKPGQPPKL
LIH**AASNRGS** GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FC**QQSKEVPY**
TFGGGTKVEI K

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 7 VL3 là SEQ ID NO:156 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct ggggtgcctt cacgtttttc
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

CDR_L1 của miền VL của cả hPD-1 mAb 7 VL2 và hPD-1 mAb 7 VL3 bao gồm thay thế axit amin từ asparagin thành serin và có trình tự axit amin: RASESVDNYGMSFMN ((SEQ ID NO:157), serin thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền PD-1 mAb 7 CDR_L1 nêu trên.

Ngoài ra, CDR_L2 của miền VL của hPD-1 mAb 7 VL3 bao gồm thay thế axit amin từ glutamin thành arginin và có trình tự axit amin: **AASNRGS** ((SEQ ID NO:158), arginin thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền PD-1 mAb 7 CDR_L2 nêu trên.

H. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 8

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:159) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EGQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT **DYYMN**WVKQN HGKSLEWIG**D**
INPKNGDTHY NQKFKGEATL TVDKSSTTAY MELRSLTSED SAVYYCAS**DF**
DYWGQGTTLT VSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 8 **(SEQ ID NO:161)**: **DYYMN**

CDR_H2 của PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO:162**): **DINPKNGDTHYNQKFKG**

CDR_H3 của PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO:163**): **DFDY**

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 8 là SEQ ID NO:160 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc
agtgaagata tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca
tgaactgggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagtg gattggagat
attaatccta aaaatggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggcga
ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac atggagctcc

gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:164) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DVVMTQTPLS LPVGLGDQAS ISCRSSQTLV YSNGNTYLNW FLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IK

CDR_L1 của PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:166): RSSQTLVYSNGNTYLN

CDR_L2 của PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:167): KVSNRFS

CDR_L3 của PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:168): SQSTHVPFT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 8 là SEQ ID NO:165 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa

I. Kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 9

1. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 9

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:169) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQT PEKRLEWVAT ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCARYG FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:171): SYLVS

CDR_H2 của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:172): TISGGGGNTYYSDSVKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:173): YGFDGAWFAY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 9 là SEQ ID NO:170 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt **agttatcttg**
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc
attagtggtg gtggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggtcg
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatca
gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagg**tatggt**
ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
ctcttcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:174) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITC**RASENIY SYLA**WYQQKQ EKSPQLLVY**N**
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYC**QH HYAVPWT**FGG
GTRLEIT

CDR_L1 của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:176): RASENIYSYLA

CDR_L2 của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:177): NAKTLAA

CDR_L3 của PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:178): QHHYAVPWT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 9 là SEQ ID NO:175 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga
tattgtcacc atcacatgt**c gagcaagtga gaatatttac agttatttag**
catggtatca gcagaaacag gaaaaatctc ctcagctcct ggtctat**aat**
gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc
aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct gaagattttg
ggaattatta ctgt**cagcat cattatgctg ttccgtggac g**ttcggtgga
ggcaccagac tggaaatcac a

2. Quá trình làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 9 để tạo thành "hPD-1 mAb 9"

Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 9 nêu trên được làm giống như của người và còn được khử miễn dịch khi các epitop kháng nguyên được xác định để chứng tỏ khả năng làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người nhằm làm giảm tính kháng nguyên của nó khi sử dụng cho người nhận. Việc làm giống như của người tạo ra hai miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản

mô tả này là "hPD-1 mAb 9 VH1," và "hPD-1 mAb 9 VH2," và hai miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 9 VL1," và "hPD-1 mAb 9 VL2." Miền bất kỳ trong số các miền VL được làm giống như của người có thể được ghép cặp với các miền VH được làm giống như của người. Do đó, kháng thể bất kỳ bao gồm một trong số các miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi chung là "hPD-1 mAb 9," và các tổ hợp cụ thể của các miền VH/VL được làm giống như của người được gọi bằng cách viện dẫn đến các miền VH/VL cụ thể, ví dụ kháng thể được làm giống như của người bao gồm hPD-1 mAb 9 VH1 và hPD-1 mAb 9 VL2 được gọi cụ thể là "hPD-1 mAb 9(1.2)."

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 9 VH1 (SEQ ID NO:179) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS **SYLVS**WVRQA PGKGLEWVA**T**
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCAR**YG**
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

Polynucleotit ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 9 VH1 là SEQ ID NO:180 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag
tctgaaactg tcctgtgcag catcaggatt tacttttca **tcttatctcg**
tgtcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaagggaag
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgc**tatgga**
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt
tagctcc

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 9 VH2 (SEQ ID NO:181) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG LARPGGSLKL SCAASGFTFS **SYLVG**WVRQA PGKGLEWTA**T**
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSARAED TATYYCAR**YG**
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 9 VH2 là SEQ ID NO:182 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag
tctgaaactg tcctgtgcag catcaggatt tacttttca **tcttatctcg**

tgggctgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg gacggcc**act**
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaagggaag
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgc**tatgga**
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt
tagctcc

CDR_H1 của miền VH của hPD-1 mAb 9 VH2 bao gồm thay thế axit amin từ serin thành glyxin và có trình tự axit amin: SYLV**G** ((SEQ ID NO:183), glyxin thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền PD-1 mAb 9 CDR_H1 nêu trên.

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 9 VL1 (SEQ ID NO:184) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY SYLA**WYQQKP GKAPKLLIY**N**
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ
GTKLEIK

Polynucleotit ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 9 VL1 là SEQ ID NO:185 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga
tcgggtcacc atcacctgc**c gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg**
cctggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttac**aac**
gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc
agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg
ccacttacta ctgc**cagcat cattacgcag tgccctggac c**ttcggacaa
ggcactaagc tcgagatcaa a

Trình tự axit amin của miền VL của hPD-1 mAb 9 VL2 (SEQ ID NO:186) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY NYLA**WYQQKP GKAPKLLIY**D**
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ
GTKLEIK

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 9 VL2 là SEQ ID NO:187 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga
tcgggtcacc atcacctgc**c gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg**
cctggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttac**gac**

gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg ccacttacta ctgc**cagcat cattacgcag tgccctggac c**ttcggacaa ggcactaagc tcgagatcaa a

CDR_L1 của miền VL của hPD-1 mAb 9 VL2 bao gồm thay thế axit amin từ serin thành asparagin và có trình tự axit amin: RASENIY**N**YLA (SEQ ID NO:188), asparagin thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền PD-1 mAb 9 CDR_L1 nêu dưới trên.

CDR_L2 của miền VL của hPD-1 mAb 9 VL2 bao gồm thay thế axit amin từ asparagin thành aspartat và có trình tự axit amin: **D**AKTLAA ((SEQ ID NO:189), aspartat thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền PD-1 mAb 7 CDR_L2 nêu trên.

J. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 10

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:190) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **NYLMS**WVRQT PEKRLEWVA**S** **ISGGGSNIYY PDSVKG**RFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCAR**QE** **LAFDY**WGQGT TLTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:192): NYLMS

CDR_H2 của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:193): SISGGGSNIYYPDSVKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:194): QELAFDY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 10 là SEQ ID NO:191 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaagtgatac tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt **aactatctca** **tgtct**tgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgca**agt** **attagtggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggt**cg attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaga**caagaa** **ctggcttttg actac**tgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:195) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC**RTSQDIS NFLN**WYQQKP DGTIKLLIY**Y TSRLHS**GVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFC**QQ GSTLPWT**FGG GTKLEII

CDR$_L$1 của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:197): RTSQDISNFLN

CDR$_L$2 của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:198): YTSRLHS

CDR$_L$3 của PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:199): QQGSTLPWT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 10 là SEQ ID NO:196 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR$_L$ được thể hiện gạch chân):

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc atcagttgc**a ggacaagtca ggacattagc aatttttaa ac**tggtatca gcagaaacca gatggaacta ttaaactcct gatctac**tac acatcaagat tacactca**gg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg ccacttactt ttgc**caacag ggtagtacgc ttccgtggac g**ttcggtgga ggcaccaagc tggaaatcat a

K. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 11

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:200) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR$_H$ được thể hiện gạch chân).

EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT **GYWMH**WVKQR PGQGLKWMG**A IYPGNSDTHY NQKFKG**KAKL TAVTSASTAY MELSSLTNED SAIYYCTT**GT YSYFDV**WGTG TTVTVSS

CDR$_H$1 của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:202): GYWMH

CDR$_H$2 của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:203): AIYPGNSDTHYNQKFKG

CDR$_H$3 của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:204): GTYSYFDV

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 11 là SEQ ID NO:201 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR$_H$ được thể hiện gạch chân):

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc **ggctactgga tgcac**tgggt aaaacagagg cctggacagg gtctgaaatg gatgggg**gct atttatcctg gaaatagtga tactcactac aaccagaagt tcaagggc**aa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tact**gggacc**

tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc
a

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:205) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSC**RASQSIG TSIH**WYQHRT NGSPRLLIK**Y**
ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYC**QQ SNSWLT**FGAG
TKLELK

CDR_L1 của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:207): RASQSIGTSIH

CDR_L2 của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:208): YASESIS

CDR_L3 của PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:209): QQSNSWLT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 11 là SEQ ID NO:206 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga
aagagtcagt ttctcctgc**a gggccagtca gagcattggc acaagcatac**
actggtatca gcacagaaca aatggttctc caaggcttct cataaag**tat**
gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc aggtttagtg gcagtggatc
agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct gaagatattg
cagattatta ctgt**caacaa agtaatagct ggctcacg**tt cggtgctggg
accaagctgg agctgaaa

L. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 12

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:210) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QGHLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT **DYEMH**WVKQT PVHGLEWIG**T**
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TVDKSSTTTY MELRSLTSED SAVFYCSR**ER**
ITTVVEGAYW YFDVWGTGTT VTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:212): DYEMH

CDR_H2 của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:213): TIDPETGGTAYNQKFKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:214): ERITTVVEGAYWYFDV

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 12 là SEQ ID NO:211 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc
agtgacgctg tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact **gactatgaga**
tgcactgggt gaaacagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattggg**act**

attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa
ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc
gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aaga**gagagg**
attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac
agggaccacg gtcaccgtct cctca

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:215) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISC**RSSQNIV HSNGNTYLE**W YLQKPGQSPK
LLIC**KVSTRF S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**FQGSHVP**
YTFGGGTKLE IK

CDR_L1 của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:217): RSSQNIVHSNGNTYLE

CDR_L2 của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:218): KVSTRFS

CDR_L3 của PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:219): FQGSHVPYT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 12 là SEQ ID NO:216 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gatgttttga tgacccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
tcaagcctcc atctcttgc**a gatctagtca gaacattgta catagtaatg**
gaaacaccta tttagaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag
ctcctgatct gc**aaagtttc cacccgattt tct**ggggtcc cagacaggtt
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
aggctgagga tctgggagtt tattattgc**t ttcaaggttc acatgttccg**
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

M. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 13

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:220) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **SHTMS**WVRQT PEKRLEWVA**T**
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCAR**QA**
YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S

CDR_H1 của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:222): SHTMS

CDR_H2 của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:223): TISGGGSNIYYPDSVKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:224): QAYYGNYWYFDV

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 13 là SEQ ID NO:221 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt **agccatacca**
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgca**acc**
attagtggtg gtggttctaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga
gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaga**caagct**
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt
caccgtctcc tcc

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:225) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITC**LASQTIG TWLA**WYQQKP GKSPQLLIY**A**
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSFKISSLQA EDFVSYYC**QQ LDSIPWT**FGG
GTKLEIK

CDR_L1 của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:227): LASQTIGTWLA

CDR_L2 của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:228): AATSLAD

CDR_L3 của PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:229): QQLDSIPWT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 13 là SEQ ID NO:226 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacattcaga tgacccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga
aagtgtcacc atcacgtgc**c tggcaagtca gaccattggt acatggttag**
catggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttat**gct**
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc
tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg
taagttatta ctgt**caacaa cttgacagta ttccgtggac g**ttcggtgga
ggcaccaagc tggaaatcaa a

N. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 14

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:230) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI **SYWIT**WVKQR PGQGLQWIG**N**
IYPGTDGTTY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLSRLTSED SAVYYCAT**GL**
HWYFDVWGTG TTVTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:232): SYWIT

CDR_H2 của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:233): NIYPGTDGTTYNEKFKS

CDR_H3 của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:234): GLHWYFDV

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 14 là SEQ ID NO:231 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg tcctgcaagg cttctggcta caacttcatc **agctactgga taacc**tgggt gaaacagagg cctggacaag gccttcagtg gattgga**at atttatcctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagc**aa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aact**gggcta cactggtact tcgatgtc**tg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc c

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:235) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTC**KASQSVG TNVA**WYQQKP GQSPKALIY**S ASSRFS**GVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFC**QQ YNSYPYT**FGG GTKLEIK

CDR_L1 của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:237): KASQSVGTNVA

CDR_L2 của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:238): SASSRFS

CDR_L3 của PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:239): QQYNSYPYT

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 14 là SEQ ID NO:236 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt gtcacctgc**a aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag cc**tggtatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaagcact gatttac**tcg gcatcctccc gattcagt**gg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct gaagacttgg cagagtattt ctgt**cagcaa tataacagct atccgtacac g**ttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa a

O. Kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 15

1. Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 15

Trình tự axit amin của miền VH của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:240) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS **SYLIS**WVRQT PEKRLEWVA**A**
ISGGGADTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTR**RG**
TYAMDYWGQG TSVTVSS

CDR_H1 của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:242): SYLIS

CDR_H2 của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:243): AISGGGADTYYADSVKG

CDR_H3 của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:244): RGTYAMDY

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá miền VH của PD-1 mAb 15 là SEQ ID NO:241 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt **agctatctca**
tctcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgct**gcc**
attagtggtg gtggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaagggtcg
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat ctgcaaatga
gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aaga**cgaggg**
acctatgcta tggactactg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc
c

Trình tự axit amin của miền VL của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:245) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITC**LASQTIG TWLA**WYQQKP GKSPQLLIY**A**
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSFKISSLQA EDFVNYYC**QQ LYSIPWT**FGG
GTKLEIK

CDR_L1 của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:247): LASQTIGTWLA

CDR_L2 của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:248): AATSLAD

CDR_L3 của PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:249): QQLYSIPWT

Polynucleotit ví dụ mã hoá miền VL của PD-1 mAb 15 là SEQ ID NO:246 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

gacattcaga tgacccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga
aagtgtcacc atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag
catggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc
tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg
taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga
ggcaccaagc tggaaatcaa a

2. Quá trình làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 15 để tạo thành "hPD-1 mAb 15"

Kháng thể của chuột kháng PD-1 của người PD-1 mAb 15 nêu trên được làm giống như của người và còn được khử miễn dịch khi các epitop kháng nguyên được xác định để chứng tỏ khả năng làm giống như của người kháng thể kháng PD-1 của người nhằm làm giảm tính kháng nguyên của nó khi sử dụng cho người nhận. Việc làm giống như của người tạo ra một miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 2 VH1," và các miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 1 VL1." Kháng thể chứa miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi là "hPD-1 mAb 15."

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 15 VH1 (SEQ ID NO:250) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS **SYLIS**WVRQA PGKGLEWVA**A**
ISGGGADTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCAR**RG**
TYAMDYWGQG TLVTVSS

Polynucleotit được lấy làm ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 15 VH1 là SEQ ID NO:251 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc
actcagactg tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta
tctcttgggt gcgccaagcc ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc
attagtgggg gtggtgccga tacatattat gccgacagcg tcaaggga cg
tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac ctgcagatga
actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg

acttacgcta tggactattg gggccagggc accttggtca ctgtctcatc c

Trình tự axit amin của miền VH của hPD-1 mAb 15 VL1 (SEQ ID NO:252) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**LASQTIG TWLA**WYQQKP GKAPKLLIY**A ATSLAD**GVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDFATYYC**QQ LYSIPWT**FGQ GTKLEIK

Polynucleotit ví dụ mã hoá hPD-1 mAb 15 VL1 là SEQ ID NO:253 (các nucleotit mã hoá các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

gatatccaga tgacccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc atcacctgt**c tggccagtca gaccattgga acctggctcg cc**tggtatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc **gccacctccc tcgcagat**gg agtgccctcc cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc gaggatttcg ctacatacta ctgt**caacag ctctactcca ttccatggac c**tttggtcag ggtactaaac tggagatcaa

V. Các kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 1-15, và dẫn xuất của chúng có vùng Fc được thao tác di truyền

Trong chức năng miễn dịch truyền thống, tương tác của các phức hợp kháng thể-kháng nguyên với các tế bào của hệ miễn dịch dẫn đến một loạt các đáp ứng, từ các chức năng hiệu ứng như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể, mất hạt tế bào mast, và thực bào cho đến các tín hiệu điều biến miễn dịch như điều hòa tăng sinh lympho bào và bài tiết kháng thể. Tất cả các tương tác này bắt đầu thông qua gắn kết của vùng Fc của các kháng thể hoặc các phức hợp miễn dịch với các thụ thể bề mặt tế bào chuyên biệt trên các tế bào tạo máu. Tính đa dạng của các đáp ứng tế bào khơi mào bởi các kháng thể và các phức hợp miễn dịch là do tính không đồng nhất về mặt cấu trúc của ba thụ thể Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), và FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) và FcγRIII (CD16) là các thụ thể hoạt hóa (nghĩa là, tăng cường hệ miễn dịch); FcγRIIB (CD32B) là thụ thể ức chế (nghĩa là, ức chế hệ miễn dịch). Ngoài ra, tương tác với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) điều tiết việc tái sinh các phân tử IgG từ nội bào đến bề mặt tế bào và giải phóng vào máu. Trình tự axit amin của kháng thể kiểu dại được lấy làm ví

dụ IgG1 (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:2), IgG3 (SEQ ID NO:3), và IgG4 (SEQ ID NO:4) được trình bày ở trên.

Sự cải biến vùng Fc thường dẫn đến kiểu hình thay đổi, ví dụ thời gian bán thải huyết tương thay đổi, độ ổn định thay đổi, độ nhạy với các enzym tế bào thay đổi hoặc chức năng hiệu ứng thay đổi. Có thể mong muốn cải biến kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác theo sáng chế đối với chức năng hiệu ứng, ví dụ, để tăng cường hiệu lực của phân tử này trong việc điều trị bệnh ung thư. Việc giảm thiểu hoặc loại bỏ chức năng hiệu ứng là mong muốn trong một số trường hợp nhất định, ví dụ trong trường hợp các kháng thể mà cơ chế hoạt động của nó bao gồm việc phong bế hoặc đối kháng, nhưng không phải là tiêu diệt các tế bào mang kháng nguyên đích. Nói chung mong muốn có chức năng hiệu ứng gia tăng khi nhắm đến các tế bào không mong muốn, như các tế bào khối u và tế bào lạ, trong đó các FcγR được biểu hiện ở các mức thấp, ví dụ, các tế bào B đặc hiệu khối u với các mức FcγRIIB thấp (ví dụ, u bạch huyết không phải Hodgkins, CLL, và u bạch huyết Burkitt). Theo các phương án nêu trên, các phân tử theo sáng chế được mang lại hoặc thay đổi hoạt tính chức năng hiệu ứng là hữu ích để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh, rối loạn hoặc bệnh nhiễm khuẩn, trong đó mong muốn có hiệu lực tăng cường của hoạt tính chức năng hiệu ứng.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc mà có một hoặc nhiều cải biến (ví dụ, thay thế, khuyết đoạn, hoặc cài xen) đối với trình tự các axit amin của vùng Fc kiểu dại (ví dụ, SEQ ID NO:1), các cải biến này làm giảm ái lực và tính phàm của vùng Fc này và, do đó, phân tử theo sáng chế, đối với một hoặc nhiều thụ thể FcγR. Theo các phương án khác, các phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc mà có một hoặc nhiều cải biến đối với các axit amin của vùng Fc kiểu dại, cải biến này gia tăng ái lực và tính phàm của vùng Fc và, do đó, phân tử theo sáng chế, đối với một hoặc nhiều thụ thể FcγR. Theo các phương án khác, các phân tử bao gồm vùng Fc biến thể, trong đó biến thể này mang lại hoặc điều tiết hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) tăng và/hoặc khả năng gắn kết với FcγRIIA tăng, so với phân tử không bao gồm vùng Fc hoặc bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án khác, các phân tử bao gồm vùng Fc biến thể, trong đó biến thể này mang lại hoặc điều tiết hoạt tính ADCC (hoặc chức năng hiệu ứng khác) giảm và/hoặc khả năng gắn kết với FcγRIIB tăng, so với phân tử không bao gồm vùng Fc hoặc bao

gồm vùng Fc kiểu dại. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết PD-1 bao gồm vùng Fc biến thể, vùng Fc biến thể này không thể hiện khả năng gắn kết có thể phát hiện đối với FcγR bất kỳ, so với phân tử tương đương bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết PD-1 bao gồm vùng Fc biến thể, vùng Fc biến thể này chỉ gắn kết FcγR đơn nhất, tốt hơn là một trong số FcγRIIA, FcγRIIB, hoặc FcγRIIIA. Ái lực và/hoặc tính phàm tăng bất kỳ tốt hơn là được đánh giá bằng cách đo in vitro mức độ gắn kết có thể phát hiện đối với FcγR hoặc hoạt tính liên quan đến-FcγR ở các tế bào mà biểu hiện FcγR ở mức thấp khi hoạt tính gắn kết của phân tử gốc (không có vùng Fc được cải biến) không thể phát hiện được trong các tế bào, hoặc trong các tế bào mà biểu hiện các kháng nguyên đích không phải thụ thể FcγR ở mật độ từ 30.000 đến 20.000 phân tử/tế bào, ở mật độ từ 20.000 đến 10.000 phân tử/tế bào, ở mật độ từ 10.000 đến 5.000 phân tử/tế bào, ở mật độ từ 5.000 đến 1.000 phân tử/tế bào, ở mật độ từ 1.000 đến 200 phân tử/tế bào hoặc ở mật độ từ 200 phân tử/tế bào hoặc ít hơn (nhưng ít nhất là 10, 50, 100 hoặc 150 phân tử/tế bào).

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể bao gồm vùng Fc biến thể có ái lực thay đổi đối với thụ thể Fcγ hoạt hóa và/hoặc ức chế. Theo một phương án, phân tử gắn kết PD-1 bao gồm vùng Fc biến thể mà có ái lực tăng đối với FcγRIIB và ái lực giảm đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, vùng này có ái lực giảm đối với FcγRIIB và ái lực tăng đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại. Theo một phương án khác nữa, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể có ái lực giảm đối với FcγRIIB và ái lực giảm đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại. Theo một phương án khác nữa, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, vùng này có ái lực không thay đổi đối với FcγRIIB và ái lực giảm (hoặc tăng) đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA, so với phân tử tương đương có vùng Fc kiểu dại.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể có ái lực thay đổi đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA sao cho globulin miễn dịch có chức năng hiệu ứng tăng cường. Các ví dụ không giới hạn về các chức năng tế bào hiệu ứng bao gồm độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng

thể, thực bào phụ thuộc kháng thể, thực bào, opsonin hoá, thực bào opsonin hoá, gắn kết tế bào, tạo hình hoa thị, gắn kết C1q, và độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc bổ thể.

Theo phương án được ưu tiên, sự thay đổi ái lực hoặc chức năng hiệu ứng ít nhất là 2 lần, tốt hơn là ít nhất là 4 lần, ít nhất là 5 lần, ít nhất là 6 lần, ít nhất là 7 lần, ít nhất là 8 lần, ít nhất là 9 lần, ít nhất là 10 lần, ít nhất là 50 lần, hoặc ít nhất là 100 lần, so với phân tử tương đương bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án khác theo sáng chế, vùng Fc biến thể này gắn kết đặc hiệu miễn dịch với một hoặc nhiều FcR với ái lực lớn hơn nhất ít nhất là 65%, tốt hơn là ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, hoặc 250% so với phân tử bao gồm vùng Fc kiểu dại. Các chỉ số đo này có thể là các thử nghiệm in vivo hoặc in vitro, và theo phương án được ưu tiên là các thử nghiệm in vitro như ELISA hoặc thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo các phương án khác nhau, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể trong đó biến thể này chủ vận ít nhất một hoạt tính của thụ thể FcγR, hoặc đối kháng ít nhất một hoạt tính của thụ thể FcγR. Theo phương án được ưu tiên, các phân tử bao gồm biến thể mà đối kháng một hoặc nhiều hoạt tính của FcγRIIB, ví dụ, tín hiệu qua trung gian thụ thể tế bào B, hoạt hóa các tế bào B, tăng sinh tế bào B, sản sinh kháng thể, nhậpcanxi nội bào của tế bào B, tiến triển chu kỳ tế bào, ức chế qua trung gian FcγRIIB của tín hiệu FcεRI, phosphoryl hoá FcγRIIB, tuyển mộ SHIP, phosphoryl hoá SHIP và kết hợp với Shc, hoặc hoạt tính một hoặc nhiều phân tử xuôi dòng (ví dụ, MAP kinaza, JNK, p38, hoặc Akt) trong con đường tải nạp tín hiệu FcγRIIB. Theo một phương án khác, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm biến thể mà chủ vận một hoặc nhiều hoạt tính của FcεRI, ví dụ, hoạt hóa tế bào mast, huy động canxi, mất hạt, sản sinh xytokin, hoặc giải phóng serotonin.

Theo các phương án nhất định, các phân tử bao gồm vùng Fc bao gồm các vùng từ hai hoặc nhiều isotyp IgG (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4). Như được sử dụng trong bản mô tả này, vùng Fc được cho là có isotyp IgG cụ thể nếu trình tự axit amin của nó tương đồng hơn cả với isotyp đó so với các isotyp IgG khác. Các isotyp IgG khác nhau bộc lộ các tính chất vật lý và chức năng phân biệt, bao gồm thời gian bán thải huyết tương, cố định bổ thể, ái lực gắn kết FcγR và các hoạt tính chức năng hiệu ứng (ví dụ,

ADCC, CDC, v.v.) do các khác biệt về trình tự axit amin của các miền bản lề và/hoặc vùng Fc của chúng, ví dụ như mô tả trong tài liệu: J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156, (1999) của Flesch và Neppert; J. Biol. Chem. 33:25124-25131, (1993) của Chappel và các đồng tác giả; Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040, (1991) của Chappel và các đồng tác giả; hoặc J. Exp. Med 166:1351-1361, (1987) của Brüggemann và các đồng tác giả. Loại vùng Fc biến thể này có thể được sử dụng đơn độc, hoặc kết hợp với cải biến axit amin, nhằm tác động đến chức năng hiệu ứng và/hoặc hoạt tính gắn kết qua trung gian Fc. Kết hợp lại, cải biến axit amin và miền bản lề/vùngFc của IgG có thể thể hiện chức năng tương tự (ví dụ, ái lực gia tăng đối với FcγRIIA) và có thể tác dụng cộng hợp hoặc tốt hơn là, hiệp đồng để cải biến chức năng hiệu ứng trong phân tử theo sáng chế, so với phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc kiểu dại. Theo các phương án khác, cải biến axit amin và vùng Fc của IgG có thể thể hiện chức năng đối lập (ví dụ, tương ứng là ái lực tăng và ái lực giảm đối với FcγRIIA) và có thể có tác dụng kiềm chế chọn lọc hoặc giảm chức năng đặc hiệu trong phân tử theo sáng chế, so với phân tử theo sáng chế không bao gồm vùng Fc hoặc bao gồm vùng Fc kiểu dại của cùng isotyp.

Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này bao gồm ít nhất là một cải biến axit amin so với vùng Fc kiểu dại, sao cho phân tử này có ái lực thay đổi đối với FcR, miễn là vùng Fc biến thể này không có thay thế ở vị trí mà có tiếp xúc trực tiếp với FcγR dựa trên phân tích tinh thể học và cấu trúc các tương tác Fc-FcR như được Sondermann và các đồng tác giả đề cập trong tài liệu: Nature 406:267-73, (2000). Ví dụ về các vị trí trong vùng Fc mà có tiếp xúc trực tiếp với FcγR là các gốc axit amin 234-239, các gốc axit amin 265-269 (quai B/C), các gốc axit amin 297-299 (quai C'/E), và các gốc axit amin 327-332 (quai F/G). Theo một số phương án, các phân tử theo sáng chế bao gồm các vùng Fc biến thể bao gồm cải biến ít nhất là một gốc mà không có tiếp xúc trực tiếp với FcγR dựa trên sự phân tích cấu trúc và tinh thể học, ví dụ, không thuộc phạm vi vị trí gắn kết Fc-FcγR.

Các vùng Fc biến thể là đã biết trong lĩnh vực này, và vùng Fc biến thể đã biết bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế để mang lại hoặc cải biến chức năng hiệu ứng được thể hiện bởi phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc (hoặc đoạn của nó) theo thử nghiệm chức năng, ví dụ, trong thử nghiệm phụ thuộc NK hoặc phụ thuộc đại thực bào.

Ví dụ, các biến thể vùng Fc được xác định là chức năng hiệu ứng thay đổi được đề cập trong các Công bố đơn PCT số WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; và WO 2008/140603, và biến thể bất kỳ thích hợp được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phân tử theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, có một hoặc nhiều cải biến axit amin trong một hoặc nhiều vùng, (các) cải biến này làm thay đổi (so với vùng Fc kiểu dại) tỷ lệ ái lực của vùng Fc biến thể này giữa FcγR hoạt hóa (như FcγRIIA hoặc FcγRIIIA) so với FcγR ức chế (như FcγRIIB):

$$\text{Tỷ lệ ái lực} = \frac{\text{Thay đổi ái lực đối với FcγRhoạt hóa giữa kiểu dại so với biến thể}}{\text{Thay đổi ái lực đối với FcγR ức chế giữa kiểu dại so với biến thể}}$$

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế mà có vùng Fc biến thể (so với vùng Fc kiểu dại) trong đó vùng Fc biến thể này có tỷ lệ ái lực lớn hơn 1 được ưu tiên đặc biệt. Các phân tử này có ứng dụng cụ thể trong việc cung cấp phương pháp điều trị trị liệu hoặc dự phòng bệnh, rối loạn hoặc bệnh nhiễm khuẩn, hoặc cải thiện triệu chứng của nó, trong đó mong muốn có hiệu lực tăng cường của chức năng tế bào hiệu ứng (ví dụ, ADCC) qua trung gian FcγR, ví dụ, bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn. Trái lại, vùng Fc biến thể có tỷ lệ ái lực nhỏ hơn 1 điều tiết giảm hiệu lực của chức năng tế bào hiệu ứng. Bảng 1 liệt kê các đột biến đơn nhất, đột bến kép, đột biến ba, đột biến bốn và đột biến năm theo tỷ lệ ái lực là lớn hơn hoặc nhỏ hơn 1.

Bảng 1 Các đột biến đơn nhất và đa đột biến ví dụ được liệt kê theo tỷ lệ ái lực				
Đột biến đơn	Đột biến kép	Đột biến ba	Đột biến bốn	Đột biến năm
Tỷ lệ ái lực > 1				
F243L	F243L & R292P	F243L, P247L & N421K	L234F, F243L, R292P & Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L
D270E	F243L & Y300L	F243L, R292P & Y300L	L235I, F243L, R292P & Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L
R292G	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I	L235Q, F243L, R292P & Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L	F243L, R292P & P396L	F243L, P247L, D270E & N421K	
	R292P & Y300L	F243L, Y300L & P396L	F243L, R255L, D270E & P396L	
	R292P & V305I	P247L, D270E & N421K	F243L, D270E, G316D & R416G	
	R292P & P396L	R255L, D270E & P396L	F243L, D270E, K392T & P396L	
	Y300L & P396L	D270E, G316D & R416G	F243L, D270E, P396L & Q419H	
	P396L & Q419H	D270E, K392T & P396L	F243L, R292P, Y300L, & P396L	
		D270E, P396L & Q419H	F243L, R292P, V305I & P396L	
		V284M, R292L & K370N	P247L, D270E, Y300L & N421K	
		R292P, Y300L & P396L	R255L, D270E, R292G & P396L	
			R255L, D270E, Y300L & P396L	
			D270E, G316D, P396L & R416G	
Tỷ lệ ái lực < 1				
Y300L	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I		
P396L	P247L & N421K			
	R255L & P396L			
	R292P & V305I			
	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

Theo phương án cụ thể, trong các vùng Fc biến thể, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, cải biến thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328, hoặc 330 và tốt hơn là một hoặc nhiều gốc trong số các gốc sau đây: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328 hoặc V330. Theo phương án cụ thể khác, trong các vùng Fc biến thể, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, cải biến thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439 và tốt hơn là một hoặc nhiều gốc trong số các gốc sau đây: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 hoặc L300.

Theo phương án được ưu tiên, trong các vùng Fc biến thể mà gắn kết FcγR với ái lực thay đổi, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, cải biến thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể này có gốc bất kỳ trong số các gốc sau đây: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 hoặc A430.

Theo một phương án khác, trong các vùng Fc biến thể mà gắn kết FcγR (thông qua vùng Fc của nó) với ái lực giảm, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, cải biến thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 hoặc 439.

Theo một phương án khác, trong các vùng Fc biến thể mà gắn kết FcγR (thông qua vùng Fc của nó) với ái lực tăng cường, các cải biến axit amin bất kỳ (ví dụ, cải biến thay thế) ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 hoặc 430. Theo một phương án khác, trong các vùng Fc biến thể mà gắn kết FcγRIIA với ái lực tăng cường, gốc bất kỳ trong số các gốc sau đây: A255, A256, A258, A267, A268, N268,

A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 hoặc A430.

Các biến thể được ưu tiên bao gồm một hoặc nhiều cải biến ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 hoặc 332.

Các biến thể được ưu tiên cụ thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ các nhóm A-AI:

A	228E, 228K, 228Y hoặc 228G;
B	230A, 230E, 230Y hoặc 230G;
C	231E, 231K, 231Y, 231P hoặc 231G;
D	232E, 232K, 232Y, 232G;
E	233D;
F	234I hoặc 234F;
G	235D, 235Q, 235P, 235I hoặc 235V;
H	239D, 239E, 239N hoặc 239Q;
I	240A, 240I, 240M hoặc 240T;
J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H hoặc 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G, 247V hoặc 247L;
N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E hoặc 262F;
O	263A, 263I, 263M hoặc 263T;
P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T hoặc 264W;
Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N hoặc 265Q;
R	266A, 266I, 266M hoặc 266T;
S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W hoặc 271G;
T	273I;
U	275L hoặc 275W;
V	281D, 281K, 281Y hoặc 281P;
W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y hoặc 284M;
X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I hoặc 291G;
Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W hoặc 299Y;
Z	302I;
AA	304D, 304N, 304T, 304H hoặc 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;

AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W hoặc 325P;
AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M hoặc 328N;
AG	330L, 330Y, 330I hoặc 330V;
AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G hoặc 332Y; và
AI	336E, 336K hoặc 336Y

Cụ thể hơn nữa là các biến thể được ưu tiên bao gồm một hoặc nhiều cải biến được chọn từ các nhóm từ 1 đến 105:

Nhóm	Biến thể	Nhóm	Biến thể
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E

Nhóm	Biến thể	Nhóm	Biến thể
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I 332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

Theo một phương án, phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế sẽ bao gồm vùng Fc biến thể có ít nhất một cải biến trong vùng Fc này. Theo các phương án nhất định, vùng

Fc biến thể này bao gồm ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I, và P396L.

Theo phương án cụ thể, vùng Fc biến thể này bao gồm:

(A) ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm gồm F243L, R292P, Y300L, V305I, và P396L;

(B) ít nhất là hai thay thế được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) F243L và P396L;

(2) F243L và R292P; và

(3) R292P và V305I;

(C) ít nhất là ba thay thế được chọn từ nhóm bao gồm:

(1) F243L, R292P và Y300L;

(2) F243L, R292P và V305I;

(3) F243L, R292P và P396L; và

(4) R292P, V305I và P396L;

(D) ít nhất là bốn thay thế được chọn từ nhóm gồm:

(1) F243L, R292P, Y300L và P396L; và

(2) F243L, R292P, V305I và P396L; hoặc

(E) ít nhất là năm thay thế được chọn từ nhóm gồm:

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L; và

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L.

Theo một phương án cụ thể khác, vùng Fc biến thể này bao gồm các thay thế của:

(A) F243L, R292P, và Y300L;

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L, và P396L; hoặc

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I, và P396L.

Theo một phương án, phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể mà thể hiện khả năng gắn kết giảm (hoặc về cơ bản hầu như không có) với FcγRIA

(CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1)). Theo một phương án, phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế sẽ bao gồm vùng Fc biến thể mà thể hiện khả năng gắn kết giảm (hoặc về cơ bản hầu như không có) với FcγR (ví dụ, FcγRIIIA) và chức năng hiệu ứng ADCC giảm (hoặc về cơ bản hầu như không có). Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến thể này bao gồm ít nhất là một thay thế được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235A, D265A, N297Q, và N297G. Theo phương án cụ thể, vùng Fc biến thể này bao gồm các thay thế trong số L234A; L235A; L234A và L235A; D265A; N297Q, hoặc N297G.

Trình tự IgG1 được ưu tiên đối với các miền CH2 và CH3 của các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế sẽ có các thay thế L234A/L235A (SEQ ID NO:5):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Theo một phương án khác, phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc mà vốn đã thể hiện khả năng gắn kết giảm (hoặc về cơ bản hầu như không có) với FcγRIIIA (CD16a) và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1)). Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc IgG2 (SEQ ID NO:2) hoặc vùng Fc của IgG4 (SEQ ID:NO:4). Khi sử dụng vùng Fc của IgG4, sáng chế cũng bao gồm việc đưa vào một đột biến làm ổn định, như đột biến thay thế S228P ở miền bản lề của IgG4 (xem, ví dụ, SEQ ID NO:13: ESKYGPPCP**P**CP, *("The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation,"* J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969, (2008) Lu và các đồng tác giả,) để làm giảm sự cố trao đổi sợi. Các đột biến làm ổn định khác đã biết trong lĩnh vực này có thể được đưa vào vùng Fc của IgG4 (*"Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability,"* J. Biol. Chem., 287:24525-24533, (2012) của Peters, P và các đồng tác giả; Công bố đơn PCT số: WO 2008/145142).

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm việc sử dụng vùng Fc biến thể bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, như các vùng được bộc lộ trong tài liệu: *"Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current Models,"* Immunol. Lett. 82:57-65, (2002) của Jefferis, B.J. và các đồng tác giả; *"Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function,"* Biochem. Soc. Trans. 30:487-90, (2002) của Presta, L.G. và các đồng tác giả; *"Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement,"* J. Immunol. 166:2571-75, (2001) của Idusogie, E.E. và các đồng tác giả; *"High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, and FcRn and Design Of IgG1 Variants With Improved Binding to The Fc gamma R,"* J. Biol. Chem. 276:6591-6604, (2001) của Shields, R.L. và các đồng tác giả; *"Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc,"* J. Immunol. 164:4178-84, (2000) của Idusogie, E.E. và các đồng tác giả; *"Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4,"* J. Immunol. 164:1925-1933, (2000) của Reddy, M.P. và các đồng tác giả; *"In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies,"* Cell. Immunol. 200:16-26, (2000) của Xu, D. và các đồng tác giả; *"Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding and Monocyte Triggering Activities,"* Eur. J. Immunol. 29:2613-24, (1999) của Armour, K.L. và các đồng tác giả; *"Modulation Of Fc(Gamma)R and Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosacarit Interactions,"* Immunol. Lett. 54:101-04, (1996) của Jefferis, R. và các đồng tác giả; *"Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosacarit Can Modulate Recognition By Complement and Human Fc Gamma Receptor I and Influence The Synthesis Of Its Oligosacarit Chains,"* J. Immunol. 157:4963-4969, (1996) của Lund, J. và các đồng tác giả; *"Improved Biodistribution, Tumor Targeting, and Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84, (1995) của Hutchins và các đồng tác giả; *"Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation,"* Immunol. Lett. 44:111-17, (1995) của Jefferis, R. và các đồng tác giả; *"Oligosacarit-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors,"* FASEB J. 9:115-19, (1995) của Lund, J. và các đồng tác giả; *"A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo,"* Transplantation 57:1537-

1543, (1994) của Alegre, M.L. và các đồng tác giả; *"Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11,"* Mol. Immunol. 29:53-59, (1992) của Lund và các đồng tác giả; *"Human Fc Gamma RI and Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG,"* J. Immunol. 147:2657-2662, (1991) của Lund và các đồng tác giả; *"Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG,"* Nature 332:563-564, (1988) Duncan, A.R. và các đồng tác giả; các Bằng sáng chế mỹ số 5,624,821; 5,885,573; 6,194,551; 7,276,586; và 7,317,091; và các Công bố đơn PCT số WO 00/42072 và PCT WO 99/58572.

Theo vài phương án, các phân tử theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá, sao cho một hoặc nhiều nhóm hydrat cacbon được gắn cộng hoá trị vào phân tử này. Tốt hơn là, các phân tử theo sáng chế với một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá và/hoặc một hoặc nhiều cải biến trong vùng Fc mang lại hoặc có chức năng hiệu ứng qua trung gian kháng thể được tăng cường, ví dụ, hoạt tính ADCC tăng cường, so với kháng thể không được cải biến. Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm các phân tử bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin đã biết là trực tiếp hoặc gián tiếp tương tác với nhóm hydrat cacbon của vùng Fc, bao gồm nhưng không giới hạn ở các axit amin ở các vị trí 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, và 301. Các axit amin mà trực tiếp hoặc gián tiếp tương tác với nhóm hydrat cacbon của vùng Fc là đã biết trong lĩnh vực này, xem, ví dụ, *Immunology Letters*, 44: 111-7, 1995 của Jefferis và các đồng tác giả, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm các phân tử mà đã được cải biến bằng cách đưa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá vào một hoặc nhiều vị trí của các phân tử này, tốt hơn là không làm thay đổi chức năng nhiệm vụ của các phân tử này, ví dụ, hoạt tính gắn kết đối với kháng nguyên đích hoặc FcγR. Các vị trí glycosyl hoá có thể được đưa vào vùng biến đổi và/hoặc hằng định của các phân tử theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "các vị trí glycosyl hoá" bao gồm trình tự axit amin cụ thể bất kỳ trong kháng thể mà oligosacarit (nghĩa là, các hydrat cacbon có chứa hai hoặc nhiều đường đơn được liên kết với nhau) sẽ gắn vào đặc hiệu và cộng hoá trị. Các mạch bên oligosacarit thường được liên kết với khung của kháng thể thông qua các liên kết ở vị trí N hoặc liên kết ở vị trí O. Glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N dùng để chỉ việc gắn nhóm oligosacarit vào mạch bên của gốc asparagin. Glycosyl hoá được liên kết ở vị

trí O dùng để chỉ việc gắn nhóm oligosacarit vào axit hydroxyamino, ví dụ, serin, threonin. Các phân tử theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá, bao gồm các vị trí glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N và vị trí glycosyl hoá được liên kết ở vị trí O. Vị trí glycosyl hoá bất kỳ để glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N hoặc được liên kết ở vị trí O đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo sáng chế. Vị trí glycosyl hoá được liên kết ở vị trí N được lấy làm ví dụ mà hữu ích theo các phương pháp theo sáng chế là trình tự axit amin: Asn-X-Thr/Ser, trong đó X có thể là axit amin bất kỳ và Thr/Ser dùng để chỉ threonin hoặc serin. Vị trí hoặc các vị trí này có thể được đưa vào phân tử theo sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực của sáng chế (xem, ví dụ, IN VITRO MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, của J. D. Watson, và các đồng tác giả W.H. Freeman và Company, New York, 1983, chương 8, các trang 106-116, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Phương pháp được lấy làm ví dụ để đưa vị trí glycosyl hoá vào phân tử theo sáng chế có thể bao gồm: cải biến hoặc đột biến trình tự axit amin của phân tử này sao cho thu được trình tự Asn-X-Thr/Ser mong muốn.

Theo vài phương án, sáng chế bao gồm các phương pháp cải biến hàm lượng hydrat cacbon của phân tử theo sáng chế bằng cách bổ sung thêm hoặc xoá bỏ vị trí glycosyl hoá. Các phương pháp để cải biến hàm lượng hydrat cacbon của các kháng thể (và các phân tử bao gồm các miền kháng thể, ví dụ, vùng Fc) là đã biết trong lĩnh vực này và được bao gồm trong sáng chế, xem, ví dụ, Bằng sáng chế Mỹ số 6,218,149; Bằng sáng chế Châu Âu số EP 0 359 096 B1; Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2002/0028486; WO 03/035835; Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2003/0115614; Bằng sáng chế Mỹ số 6,218,149; Bằng sáng chế Mỹ số 6,472,511; tất cả các tài liệu này được đưa vào đây ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các phương pháp cải biến hàm lượng hydrat cacbon của phân tử theo sáng chế bằng cách xoá bỏ một hoặc nhiều nhóm hydrat cacbon nội sinh của phân tử này. Theo phương án cụ thể, sáng chế bao gồm bước chuyển dịch vị trí glycosyl hoá của vùng Fc của kháng thể, bằng cách cải biến các vị trí liền kề với vị trí 297. Theo phương án cụ thể, sáng chế bao gồm bước cải biến vị trí 296 sao cho vị trí 296 và mà không phải vị trí 297 được glycosyl hoá.

Chức năng hiệu ứng cũng có thể được cải biến bằng các kỹ thuật như đưa một hoặc nhiều gốc xystein vào vùng Fc, từ đó cho phép tạo thành liên kết đisulfua giữa các chuỗi trong vùng này, dẫn đến tạo ra kháng thể homodime mà có thể có khả năng nội hóa được cải thiện và/hoặc khả năng tiêu diệt tế bào qua trung gian bổ thể và ADCC tăng (*"Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies,"* J. Exp. Med. 176:1191-1195, (1992) của Caron, P.C. và các đồng tác giả; *"A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity,"* J. Immunol. 148(9):2918-2922, (1992) của Shopes, B.. Các kháng thể homodime có hoạt tính chống khối u tăng cường cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng các liên kết ngang chức năng kép khác loại như Wolff, E.A. và các đồng tác giả mô tả trong tài liệu: *"Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice,"* Cancer Research 53:2560-2565, (1993). Theo cách khác, kháng thể có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền mà có các vùng Fc kép và do đó có thể có khả năng phân giải bổ thể và ADCC tăng cường (*"A Chimeric Antibody With Dual Fc regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge,"* Anti-Cancer Drug Design 3:219-230, (1989) của Stevenson, G.T. và các đồng tác giả).

Thời gian bán thải trong huyết tương của phân tử theo sáng chế bao gồm các vùng Fc có thể được gia tăng bằng cách làm tăng ái lực gắn kết của vùng Fc đối với FcRn. Thuật ngữ "thời gian bán thải" như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là tính chất dược động học của phân tử mà là chỉ số đo thời gian tồn tại trung bình của phân tử đó sau khi sử dụng. Thời gian bán thải có thể được biểu thị theo thời gian cần thiết để thải trừ năm mươi phần trăm (50%) lượng đã biết của phân tử này từ cơ thể của một đối tượng (ví dụ, bệnh nhân hoặc động vật có vú khác) hoặc một khoang cụ thể của đối tượng này, ví dụ, như được đo trong huyết tương, nghĩa là, thời gian bán thải trong máu, hoặc các mô khác. Nói chung, gia tăng thời gian bán thải dẫn đến gia tăng thời gian tồn lưu trung bình (MRT) trong hệ tuần hoàn đối với phân tử đã sử dụng.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này bao gồm ít nhất một cải biến axit amin so với vùng Fc kiểu dại, sao cho phân tử này có thời gian bán thải gia tăng (so với vùng Fc kiểu dại).

Theo vài phương án, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này bao gồm thay thế axit amin kéo dài thời gian bán thải ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, và 436. Nhiều đột biến cụ thể có khả năng làm tăng thời gian bán thải của phân tử chứa vùng Fc đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ M252Y, S254T, T256E, và tổ hợp của chúng. Ví dụ, xem các đột biến được mô tả trong các Bằng sáng chế Mỹ số 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797, 8,088,376; Các Công bố đơn Mỹ số 2002/0147311; 2007/0148164; và Công bố đơn PCT số WO 98/23289; WO 2009/058492; và WO 2010/033279, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các phân tử chứa vùng Fc với thời gian bán thải tăng cường cũng bao gồm các phân tử với các thay thế ở hai hoặc nhiều gốc của vùng Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 và 436. Cụ thể là, hai hoặc nhiều thay thế được chọn từ: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, và Y436I.

Theo phương án cụ thể, vùng Fc biến thể này bao gồm các thay thế của:

(A) M252Y, S254T và T256E;

(B) M252Y và S254T;

(C) M252Y và T256E;

(D) T250Q và M428L;

(E) T307Q và N434A;

(F) A378V và N434A;

(G) N434A và Y436I;

(H) V308P và N434A; hoặc

(I) K288D và H435K.

Sáng chế còn bao gồm các biến thể vùng Fc bao gồm:

(A) một hoặc nhiều đột biến mà làm thay đổi chức năng hiệu ứng và/hoặc FcγR; và

(B) một hoặc nhiều đột biến mà kéo dài thời gian bán thải huyết thanh.

VI. Các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người đặc hiệu kép

Một phương án của sáng chế để cập đến các phân tử gắn kết đặc hiệu kép mà có khả năng gắn kết với "epitop thứ nhất" và "epitop thứ hai," trong đó epitop thứ nhất là epitop của PD-1 của người và epitop thứ hai này là epitop giống hoặc khác epitop của PD-1, hoặc là epitop của một phân tử khác mà có mặt trên bề mặt của tế bào miễn dịch (như lympho bào T) và tham gia vào quá trình điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch. Theo một phương án, epitop thứ hai này là epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC lớp I hoặc II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 hoặc VISTA. Theo một phương án, epitop thứ hai này không phải là epitop của PD-1. Theo phương án cụ thể, epitop thứ hai này là CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT, hoặc TIM-3. Theo các phương án nhất định, phân tử đặc hiệu kép bao gồm nhiều hơn hai các vị trí gắn kết epitop. Các phân tử đặc hiệu kép này có thể gắn kết hai hoặc nhiều epitop khác nhau của LAG-3 và ít nhất một epitop của phân tử không phải là LAG-3.

Sáng chế bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đồng thời với PD-1 và epitop thứ hai (ví dụ B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.). Theo vài phương án, kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đồng thời với PD-1 và epitop thứ hai này được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong các công bố đơn PCT số WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, và WO 2014/022540, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

A. Kháng thể thể đôi đặc hiệu kép thiếu các vùng Fc

Một phương án theo sáng chế đề cập đến kháng thể thể đôi đặc hiệu kép mà bao gồm, và tốt hơn cả là gồm có, chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, trình tự của các chuỗi này cho phép chuỗi polypeptit gắn kết cộng hoá trị với nhau để tạo thành kháng thể thể đôi được kết hợp cộng hoá trị mà có khả năng gắn kết đồng thời với epitop thứ nhất và epitop thứ hai, các epitop này không tương đồng với nhau. Kháng thể thể đôi đặc hiệu kép này do đó bao gồm các miền "VL1" / "VH1" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất và các miền "VL2" / "VH2" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai. Thuật ngữ "VL1" và "VH1" tương ứng chỉ miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng mà gắn kết epitop "thứ nhất" của kháng thể thể đôi đặc hiệu kép này. Tương tự, thuật ngữ "VL2" và "VH2" tương ứng chỉ miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng mà gắn kết epitop "thứ hai" của kháng thể thể đôi đặc hiệu kép này. Điều này chỉ thích hợp nếu epitop cụ thể được chỉ định làm epitop thứ nhất với epitop thứ hai; thuật ngữ này chỉ thich hợp đối với sự có mặt và định hướng của các miền chuỗi polypeptit của các phân tử gắn kết theo sáng chế. Theo một phương án, một epitop trong số các epitop này là epitop của PD-1 và epitop còn lại trong số các epitop này không phải là epitop của PD-1 (ví dụ, epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

Miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất tương tác với miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động thứ nhất mà đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (nghĩa là, PD-1 hoặc kháng nguyên có chứa epitop thứ hai). Tương tự, miền VL của chuỗi polypeptit thứ hai tương tác với miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động thứ hai mà đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai (nghĩa là, kháng nguyên có chứa epitop thứ hai hoặc PD-1). Do đó, việc chọn lọc các miền VL và VH của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai được phối hợp, sao cho hai chuỗi polypeptit của kháng thể thể đôi bao gồm chung các miền VL và VH có khả năng gắn kết với cả epitop của PD-1 và với epitop thứ hai (nghĩa là, bao gồm VL_{PD-1}/VH_{PD-1} và VL2/VH2, trong đó PD-1 là epitop "thứ nhất", hoặc VL1/VH1 và VL_{PD-1}/VH_{PD-1}, trong đó PD-1 là epitop "thứ hai").

Chuỗi polypeptit thứ nhất của một phương án của kháng thể thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, đầu tận cùng N, miền VL1 của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất hoặc epitop thứ hai (nghĩa là, VL_{PD-1} hoặc $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm can thiệp thứ nhất (Liên kết 1), miền VH2 của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ hai này (nếu chuỗi polypeptit thứ nhất này có chứa VL_{PD-1}) hoặc epitop thứ nhất này (nếu chuỗi polypeptit thứ nhất có chứa $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm can thiệp thứ hai (Liên kết 2) tuỳ ý có chứa gốc xystein, miền thúc đẩy heterodime và đầu tận cùng C (Fig.1).

Chuỗi polypeptit thứ hai của phương án này của kháng thể thể đôi đặc hiệu kép bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, đầu tận cùng N, miền VL2 của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 hoặc epitop thứ hai (nghĩa là, VL_{PD-1} hoặc $VL_{Epitop\ 2}$, và là miền VL không được lựa chọn để đưa vào chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này), peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1), miền VH1 của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ hai (nếu chuỗi polypeptit thứ hai này có chứa VL_{PD-1}) hoặc với PD-1 (nếu chuỗi polypeptit thứ hai này có chứa $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm can thiệp thứ hai (Liên kết 2) tuỳ ý có chứa gốc xystein, miền thúc đẩy heterodime, và đầu tận cùng C (Fig.1).

Tốt nhất là, độ dài của peptit liên kết can thiệp (ví dụ, Liên kết 1) mà tách riêng các miền VL và VH này được chọn về cơ bản hoặc hoàn toàn ngăn chặn các miền VL và VH của chuỗi polypeptit này gắn kết với nhau. Do đó, các miền VL và VH của chuỗi polypeptit thứ nhất về cơ bản hoặc hoàn toàn không có khả năng gắn kết với nhau. Tương tự, các miền VL và VH của chuỗi polypeptit thứ hai về cơ bản hoặc hoàn toàn không có khả năng gắn kết với nhau. Peptit đệm can thiệp (Liên kết 1) được ưu tiên có trình tự (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG.

Độ dài và thành phần của peptit liên kết can thiệp thứ hai (Liên kết 2) được lựa chọn dựa trên sự lựa chọn các miền thúc đẩy heterodime. Thông thường, peptit liên kết can thiệp thứ hai (Liên kết 2) bao gồm từ 3 đến 20 gốc axit amin. Cụ thể là, trong trường hợp các miền thúc đẩy heterodime không bao gồm gốc xystein, sử dụng peptit liên kết can thiệp thứ hai có chứa xystein (Liên kết 2). Peptit đệm can thiệp thứ hai có chứa xystein (Liên kết 2) chứa 1, 2, 3 hoặc nhiều xystein. Peptit đệm có chứa xystein được ưu tiên (Liên kết 2) có trình tự của SEQ ID NO:15: GGCGGG. Theo cách khác, Liên kết

2 không bao gồm xystein (ví dụ, GGG, GGGS (SEQ ID NO:29), LGGGSG (SEQ ID NO:261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262), ASTKG (SEQ ID NO:30), LEPKSS (SEQ ID NO:33), APSSS (SEQ ID NO:34), v.v.) và miền thúc đẩy heterodime có chứa-xystein, như được mô tả dưới đây được sử dụng. Tuỳ ý, cả Liên kết 2 có chứa xystein và miền thúc đẩy heterodime có chứa xystein được sử dụng.

Các miền thúc đẩy heterodime có thể là GVEPKSC (SEQ ID NO:16) hoặc VEPKSC (SEQ ID NO:17) hoặc AEPKSC (SEQ ID NO:18) trên một chuỗi polypeptit và GFNRGEC (SEQ ID NO:19) hoặc FNRGEC (SEQ ID NO:20) trên chuỗi polypeptit còn lại (US2007/0004909).

Tuy nhiên, tốt hơn nữa là, các miền thúc đẩy heterodime của kháng thể thể đôi này được tạo thành từ một, hai, ba hoặc bốn miền cuộn lặp lại theo cách cán kép của điện tích trái dấu mà bao gồm trình tự có ít nhất là sáu, ít nhất là bảy hoặc ít nhất là tám gốc axit amin sao cho miền thúc đẩy heterodime có điện tích toàn phần (*"pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil,"* Biomacromolecules 9:3173–3180, (2008) của Apostolovic, B. và các đồng tác giả; *"Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Stable Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain,"* J. Molec. Biol. 312:221-228, (2001) của Arndt, K.M. và các đồng tác giả; *"Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils,"* Structure 10:1235-1248, (2002) của Arndt, K.M. và các đồng tác giả; *"Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions,"* Analytical Biochemistry 399:138-140, (2010) của Boucher, C. và các đồng tác giả; *"Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity and Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture and Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy,"* J. Mol. Recognit. 17:540-557, (2004) của Cachia, P.J. và các đồng tác giả; *"Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding,"* Biochemistry 42:1754-1763, (2003) của De Crescenzo, G.D. và các đồng tác giả; *"Induced Heterodimerization and Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag,"* Protein Science 21:511-519, (2012) của Fernandez-Rodriquez, J. và các đồng tác giả; *"End-To-End and End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures,"* Acta

Crystallographica D65:1032-1041, (2009) của Ghosh, T.S. và các đồng tác giả; *"Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions,"* Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483, (2008) của Grigoryan, G. và các đồng tác giả; *"Designing Heterodimeric Two-Stranded α-Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity and α-Helical Propensity On Protein Folding, Stability, and Specificity,"* J. Biol. Chem. 277:37272-37279, (2002) của Litowski, J.R. và các đồng tác giả; *"The d'--d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a'* Vertical *Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif,"* J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626–2633, (2012) của Steinkruger, J.D. và các đồng tác giả; *"Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface,"* J. Molec. Biol. 366:1232-1242, (2007) của Straussman, R. và các đồng tác giả; *"Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance,"* J. Molec. Biol. 323:345–362, (2002) của Tripet, B. và các đồng tác giả; *"The Design Of Coiled-Coil Structures and Assemblies,"* Adv. Prot. Chem. 70:79-112, (2005) của Woolfson, D.N.; *"A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism,"* J. Gene Med. 10:355-367, (2008) của Zeng, Y. và các đồng tác giả).

Các miền cuộn lặp lại này có thể là các đoạn lặp chính xác hoặc có thể có các thay thế. Ví dụ, miền cuộn của miền thúc đẩy heterodime của chuỗi polypeptit thứ nhất có thể bao gồm trình tự gồm tám gốc axit amin được chọn để mang lại điện tích âm cho miền thúc đẩy heterodime này, và miền cuộn của miền thúc đẩy heterodime của chuỗi polypeptit thứ hai có thể bao gồm trình tự gồm tám gốc axit amin được chọn để mang lại điện tích dương cho miền thúc đẩy heterodime này. Không quan trọng là cuộn nào được cung cấp cho chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc thứ hai, miễn là cuộn mang điện tích trái dấu được sử dụng cho chuỗi polypeptit còn lại. Axit amin tích điện dương có thể là lysin, arginin, histidin, v.v. và/hoặc axit amin tích điện âm có thể là axit glutamic, axit aspartic, v.v. Axit amin tích điện dương tốt hơn là lysin và/hoặc axit amin tích điện âm tốt hơn là axit glutamic. Có thể chỉ sử dụng một miền thúc đẩy heterodime duy nhất (do miền này sẽ ức chế quá trình homodime hoá và do đó thúc đẩy quá trình heterodime hoá), tuy nhiên, ưu tiên cho cả hai chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của kháng thể thể đôi theo sáng chế có chứa các miền thúc đẩy heterodime.

Theo phương án được ưu tiên, một trong số các miền thúc đẩy heterodime bao gồm bốn miền xoắn "cuộn E" cán kép (SEQ ID NO:21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), các gốc glutamat của miền này sẽ tạo thành điện tích âm ở độ pH 7, trong khi miền còn lại của các miền thúc đẩy heterodime bao gồm 4 miền "cuộn K" cán kép (SEQ ID NO:22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), các gốc lysin của miền này sẽ tạo thành điện tích dương ở độ pH 7. Sự có mặt của các miền mang điện tích này thúc đẩy sự kết hợp giữa các polypeptit thứ nhất và thứ hai, và do đó tạo điều kiện tạo thành heterodime. Miền thúc đẩy heterodime trong đó một trong số bốn miền xoắn "cuộn E" cán kép của SEQ ID NO:21 đã được cải biến để có chứa gốc xystein: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23) được đặc biệt ưu tiên. Tương tự, miền thúc đẩy heterodime trong đó một trong số bốn miền xoắn "cuộn K" cán kép của SEQ ID NO:22 đã được cải biến để có chứa gốc xystein: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:24) được đặc biệt ưu tiên.

Như đề cập trong WO 2012/018687, để cải thiện các tính chất dược động học in vivo củakháng thể thể đôi, kháng thể thể đôi có thể được cải biến để chứa đoạn polypeptit của protein gắn kết huyết thanh ở một hoặc nhiều đầu tận cùng của kháng thể thể đôi này. Tốt nhất là, đoạn polypeptit này của protein gắn kết huyết thanh sẽ được lắp ở đầu tận cùng C của kháng thể thể đôi này. Albumin là protein sẵn có nhất trong huyết thanh và có thời gian bán thải 19 ngày ở người. Albumin có một vài trị trí gắn kết phân tử nhỏ mà cho phép nó gắn kết không cộng hoá trị với các protein khác và do đó kéo dài thời gian bán thải huyết tương của chúng. Miền gắn kết albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng Streptococcus G148 gồm có 46 gốc axit amin tạo thành bó ba cấu trúc xoắn ổn định và có tính đặc hiệu gắn kết albumin rộng (*"Structure, Specificity, and Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,"* J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120, (2002) của Johansson, M.U. và các đồng tác giả). Do đó, đoạn polypeptit được ưu tiên cụ thể của protein gắn kết huyết thanh để cải thiện các tính chất dược động học in vivo của kháng thể thể đôi là miền gắn kết albumin (ABD) từ chủng streptococcal G, và tốt hơn nữa là, miền gắn kết albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng *Streptococcus dysgalactiae* G148 (SEQ ID NO:25): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Như được đề cập trong WO 2012/162068 (được viện dẫn ở đây để tham khảo), các biến thể "được khử miễn dịch" của SEQ ID NO:25 có khả năng làm giảm bớt hoặc loại bỏ gắn kết MHC lớp II. Dựa vào các kết quả gây đột biến tổ hợp, các tổ hợp thay thế sau đây được xem là các thay thế được ưu tiên để tạo thành ABD được khử miễn dịch: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Các ABD biến thể có các cải biến L64A, I65A và D79A hoặc các cải biến N66S, T70S và D79A. ABD được khử miễn dịch biến thể có trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**D**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ **A**$_{71}$EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:26),

hoặc trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (SEQ ID NO:27),

hoặc trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**S**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP (SEQ ID NO:28),

là được ưu tiên cụ thể làm ABD được khử miễn dịch thể hiện khả năng gắn kết về cơ bản là kiểu dại đồng thời cung cấp khả năng gắn kết MHC lớp II giảm bớt. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này có ABD chứa liên kết peptit tốt hơn là ở vị trí đầu tận cùng C so với miền cuộn E (hoặc cuộn K) của chuỗi polypeptit này sao cho can thiệp vào giữa miền cuộn E (hoặc cuộn K) và ABD (mà tốt hơn là ABD được khử miễn dịch). Trình tự được ưu tiên cho liên kết peptit này là SEQ ID NO:29: GGGS.

B. Kháng thể thể đôi đặc hiệu kép có chứa các vùng Fc

Một phương án theo sáng chế đề cập đến kháng thể thể đôi đặc hiệu kép bao gồm vùng Fc có khả năng gắn kết đồng thời với PD-1 và epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.). Việc bổ sung miền CH2-CH3 của IgG vào một hoặc cả hai chuỗi polypeptit của kháng thể thể đôi, sao cho việc tạo phức của các chuỗi kháng thể thể đôi dẫn đến tạo thành vùng Fc, làm tăng thời gian bán thải sinh học và/hoặc thay đổi hoá trị của kháng thể thể đôi này. Kết hợp các miền CH2-CH3 của

IgG vào cả hai polypeptit của kháng thể thể đôi cho phép tạo thành kháng thể thể đôi chứa vùng Fc đặc hiệu kép hai chuỗi (Fig.2).

Theo cách khác, việc kết hợp các miền CH2-CH3 của IgG trên chỉ một trong số các polypeptit của kháng thể thể đôi sẽ cho phép tạo thành kháng thể thể đôi chứa vùng Fc đặc hiệu kép bốn chuỗi phức tạp hơn (Fig.3A-Fig.3C). Fig.3C thể hiện kháng thể thể đôi bốn chuỗi đại diện có miền nhẹ hằng định (CL) và miền CH1 nặng hằng định, tuy nhiên các mảnh của các miền này cũng như các polypeptit khác có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Fig.3A và Fig.3B, các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2013-0295121; 2010-0174053 và 2009-0060910; Công bố sáng chế Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và Công bố đơn PCT số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Do đó, ví dụ, thay vì miền CH1, có thể sử dụng peptit có trình tự axit amin GVEPKSC (SEQ ID NO:16) VEPKSC (SEQ ID NO:17), hoặc AEPKSC (SEQ ID NO:18), thu được từ miền bản lề của IgG của người, và thay vì miền CL, có thể sử dụng 6 axit amin đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ kappa của người, GFNRGEC (SEQ ID NO:19) hoặc FNRGEC (SEQ ID NO:20). Kháng thể thể đôi bốn-chuỗi có chứa peptit đại diện được thể hiện trên Fig.3A. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể sử dụng peptit bao gồm các miền cuộn cán kép của điện tích trái dấu như các miền xoắn "cuộn E" (SEQ ID NO:21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK hoặc SEQ ID NO:23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); và các miền "cuộn K" (SEQ ID NO:22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE hoặc SEQ ID NO:24: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Kháng thể thể đôi bốn chuỗi có chứa miền cuộn đại diện được thể hiện trên Fig.3B.

Các phân tử kháng thể thể đôi chứa vùng Fc theo sáng chế nói chung bao gồm các peptit liên kết can thiệp bổ sung (các Liên kết). Thông thường, các Liên kết bổ sung sẽ bao gồm từ 3 đến 20 gốc axit amin. Các liên kết bổ sung hoặc luân phiên có thể được sử dụng trong các phân tử kháng thể thể đôi chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm: GGGS (SEQ ID NO:29), LGGGSG (SEQ ID NO:261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262), ASTKG (SEQ ID NO:30), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31), EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:32), LEPKSS (SEQ ID NO:33), APSSS (SEQ ID NO:34), và APSSSPME (SEQ ID NO:35), LEPKSADKTHTCPPC SEQ ID NO:36), GGC, và GGG. SEQ ID NO:33 có thể được sử dụng thay vì GGG hoặc GGC để dễ dàng tách dòng. Ngoài ra, các

axit amin GGG, hoặc SEQ ID NO:33 có thể được tiếp sau ngay bằng SEQ ID NO:31 để tạo thành các liên kết luân phiên: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:263); và LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:37). Phân tử kháng thể thể đôi chứa vùng Fc theo sáng chế có thể kết hợp miền bản lề của IgG ngoài hoặc thay vì liên kết. Các miền bản lề được lấy làm ví dụ bao gồm: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:32) từ IgG1, ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:11) từ IgG2, ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:12) từ IgG4, và ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:13), biến thể bản lề của IgG4 bao gồm thay thế làm ổn định để giảm thiểu trao đổi sợi.

Như đề xuất trên Fig.3A- Fig.3C, kháng thể thể đôi theo sáng chế có thể bao gồm bốn chuỗi khác nhau. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của kháng thể thể đôi này có chứa 3 miền: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2, (iii) miền thúc đẩy heterodime và (iv) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư có chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1 và (iii) miền thúc đẩy heterodime, trong đó các miền thúc đẩy heterodime thúc đẩy quá trình dime hoá chuỗi polypeptit thứ nhất/thứ ba với chuỗi polypeptit thứ hai/thứ tư. Các miền VL và/hoặc VH của chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư, và các miền VL và/hoặc VH của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép gắn kết hoá trị bốn mà là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc tứ đặc hiệu. Ký hiệu "VL3" và "VH3" tương ứng chỉ miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng mà gắn kết epitop "thứ ba" của kháng thể thể đôi này. Tương tự, ký hiệu "VL4" và "VH4" tương ứng chỉ miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng mà gắn kết epitop "thứ tư" của kháng thể thể đôi này. Cấu trúc chung của chuỗi polypeptit của kháng thể thể đôi chứa vùng Fc bốn chuỗi đại diện theo sáng chế được đề xuất trong bảng 2:

Bảng 2		
Đặc hiệu kép	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
Tứ đặc hiệu	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL4-VH3-HPD-COOH

HPD = miền thúc đẩy heterodime

Theo phương án cụ thể, kháng thể thể đôi theo sáng chế là kháng thể thể đôi chứa vùng Fc đặc hiệu kép, hoá trị bốn (nghĩa là, có bốn vị trí gắn kết epitop) (Fig.3A-Fig.3C) mà gồm có tổng cộng bốn chuỗi polypeptit. Kháng thể thể đôi chứa vùng Fc, hoá trị bốn, đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm hai vị trí gắn kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với PD-1 (mà có khả năng gắn kết với epitop giống nhau của PD-1 hoặc với các epitop khác nhau PD-1), và hai vị trí gắn kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

Theo một phương án khác, kháng thể thể đôi chứa vùng Fc đặc hiệu kép có thể bao gồm ba chuỗi polypeptit. Polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này có chứa ba miền: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Polypeptit thứ hai của kháng thể thể đôi này có chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1 và (iii) miền thúc đẩy quá trình heterodime hoá và tạo liên kết cộng hoá trị với chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này. Polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi này bao gồm trình tự CH2-CH3. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của các kháng thể thể đôi này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL1/VH1 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất, cũng như vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai này. Polypeptit thứ nhất và thứ hai liên kết với nhau thông qua liên kết đisulfua gồm các gốc xystein ở các miền thứ ba tương ứng của chúng. Đáng chú

ý là, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo thành vùng Fc được làm ổn định nhờ liên kết đisulfua. Kháng thể thể đôi này có hiệu lực tăng cường. Fig.4A và Fig.4B minh hoạ các cấu trúc của kháng thể thể đôi này. Kháng thể thể đôi đặc hiệu kép chứa vùng Fc này có thể có một trong hai hướng (bảng 3):

Bảng 3		
Hướng thứ nhất	chuỗi thứ ba	NH_2-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
Hướng thứ hai	chuỗi thứ ba	NH_2-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH

HPD = miền thúc đẩy heterodime

Theo phương án cụ thể, kháng thể thể đôi theo sáng chế là kháng thể thể đôi chứa vùng Fc hoá trị hai (nghĩa là, có 2 vị trí gắn kết epitop), đặc hiệu kép (Fig.4A-Fig.4B) mà gồm có tổng cộng ba chuỗi polypeptit. Kháng thể thể đôi chứa vùng Fc hoá trị hai, đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm một vị trí gắn kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với PD-1, và một vị trí gắn kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

Theo một phương án khác, kháng thể thể đôi chứa vùng Fc đặc hiệu kép có thể bao gồm tổng cộng năm chuỗi polypeptit. Theo một phương án cụ thể, hai trong số năm chuỗi polypeptit này có cùng trình tự axit amin. Chuỗi polypeptit thứ nhất của kháng thể thể đôi này có chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ nhất có thể là chuỗi nặng của kháng thể có chứa VH1 và vùng hằng định chuỗi nặng. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của kháng thể thể đôi này có chứa: (i) miền chứa VL1, và (ii) miền chứa CL. Chuỗi polypeptit thứ hai và/hoặc thứ năm của kháng thể thể đôi này có thể là các chuỗi nhẹ của kháng thể có chứa VL1 bổ trợ cho VH1 của chuỗi polypeptit thứ nhất/thứ ba. Chuỗi polypeptit thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ năm có thể được phân lập từ các kháng thể có trong tự nhiên. Theo cách khác, các chuỗi này có thể được tạo cấu trúc bằng cách tái tổ hợp. Chuỗi

polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi này có chứa: (i) miền chứa VH1, (ii) miền chứa CH1, (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3, (iv) miền chứa VL2, (v) miền chứa VH3 và (vi) miền thúc đẩy heterodime, trong đó các miền thúc đẩy heterodime thúc đẩy quá trình dime hoá của chuỗi thứ ba với chuỗi thứ tư. Polypeptit thứ tư của kháng thể thể đôi này có chứa: (i) miền chứa VL3, (ii) miền chứa VH2 và (iii) miền thúc đẩy heterodime hoá và tạo liên kết cộng hoá trị với chuỗi polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi này.

Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, và thứ ba và thứ năm của kháng thể thể đôi này kết hợp với nhau để tạo thành hai vị trí gắn kết VL1/VH1 có khả năng gắn kết epitop thứ nhất. Chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư của kháng thể thể đôi này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai, cũng như vị trí gắn kết VL3/VH3 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ ba. Polypeptit thứ nhất và thứ ba liên kết với nhau thông qua liên kết đisulfua gồm các gốc xystein trong các vùng hằng định tương ứng của chúng. Đáng chú ý là, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo thành vùng Fc. Kháng thể thể đôi này có hiệu lực tăng cường. Fig.5 minh hoạ cấu trúc của kháng thể thể đôi này. Nên hiểu là các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép việc gắn kết là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc tam đặc hiệu. Tuy nhiên, như đề xuất trong bản mô tả này, các miền này tốt hơn là được chọn để gắn kết PD-1 và epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

Các miền VL và VH của chuỗi polypeptit được chọn sao cho tạo thành vị trí gắn kết VL/VH đặc hiệu đối với epitop mong muốn. Các vị trí gắn kết VL/VH được tạo thành bằng cách kết hợp chuỗi polypeptit có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép gắn kết hoá trị bốn mà là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép, tam đặc hiệu hoặc tứ đặc hiệu. Cụ thể là, các miền VL và VH có thể được chọn sao cho kháng thể thể đôi đặc hiệu kép có thể bao gồm hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc ba vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và một vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất, một vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai và một vị trí gắn kết đối với epitop thứ ba (như mô tả trên Fig.5). Cấu trúc chung

của chuỗi polypeptit của kháng thể thể đôi chứa vùng Fc năm chuỗi đại diện theo sáng chế được đề xuất trong bảng 4:

Bảng 4		
Đặc hiệu kép (2x2)	chuỗi thứ hai	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ năm	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL2-VH2-HPD-COOH
Đặc hiệu kép (3x1)	chuỗi thứ hai	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ năm	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
Tam đặc hiệu (2x1x1)	chuỗi thứ hai	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	chuỗi thứ năm	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL3-VH2-HPD-COOH

HPD = miền thúc đẩy heterodime

Theo phương án cụ thể, kháng thể thể đôi theo sáng chế là kháng thể thể đôi có chứa Fc đặc hiệu kép, hoá trị bốn (nghĩa là, có bốn vị trí gắn kết epitop), mà gồm có tổng cộng năm chuỗi polypeptit có hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai. Theo một phương án, kháng thể thể đôi chứa vùng Fc, hoá trị bốn, đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm hai vị trí gắn kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với PD-1 (mà có khả năng gắn kết với các epitop giống nhau của PD-1 hoặc với các epitop khác nhau của PD-1), và hai vị trí gắn kết epitop đặc hiệu đối với epitop

thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.). Theo một phương án khác, kháng thể thể đôi chứa vùng Fc, hoá trị bốn, đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm ba vị trí gắn kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với PD-1 mà có khả năng gắn kết với các epitop giống nhau của PD-1 hoặc với các epitop khác nhau của PD-1), và một vị trí gắn kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.). Theo một phương án khác, kháng thể thể đôi chứa vùng Fc, hoá trị bốn, đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm một vị trí gắn kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với PD-1, và ba vị trí gắn kết epitop đặc hiệu đối với epitop thứ hai (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

C. Các phân tử gắn kết hoá trị ba đặc hiệu kép có chứa các vùng Fc

Một phương án khác của sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết hoá trị ba, đặc hiệu kép, bao gồm vùng Fc, và có khả năng gắn kết đồng thời với epitop thứ nhất, epitop thứ hai và epitop thứ ba, trong đó ít nhất là một epitop trong số các epitop này là không tương đồng với nhau. Do đó, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép này bao gồm các miền "VL1" / "VH1" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất, các miền "VL2" / "VH2" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai và các miền "VL3" / "VH3" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ ba. Theo một phương án, một hoặc hai epitop trong số các epitop này là epitop của PD-1 và một epitop khác (hoặc epitop còn lại) trong số các epitop này không phải là epitop của PD-1 (ví dụ, epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, v,v.). Các phân tử gắn kết hoá trị ba đặc hiệu kép này bao gồm ba vị trí gắn kết epitop, hai trong số ba vị trí này là các miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi, mà tạo ra vị trí gắn kết A và vị trí gắn kết B, và một trong số các miền này là miền gắn kết không phải kiểu kháng thể thể đôi, mà tạo ra vị trí gắn kết C (xem, ví dụ, Fig.6A-Fig.6F, và Đơn PCT số: PCT/US15/33081; và PCT/US15/33076).

Thông thường, các phân tử gắn kết hoá trị ba theo sáng chế bao gồm bốn chuỗi polypeptit khác nhau (xem Fig.6A-Fig.6B), tuy nhiên, các phân tử này có thể bao gồm ít hơn hoặc nhiều hơn số chuỗi polypeptit, ví dụ bằng cách dung hợp chuỗi polypeptit

này với nhau (ví dụ, thông qua liên kết peptit) hoặc bằng cách phân chia chuỗi polypeptit này để tạo thành chuỗi polypeptit bổ sung, hoặc bằng cách kết hợp ít đi hoặc thêm chuỗi polypeptit bổ sung thông qua các liên kết đisulfua. Fig.6B-Fig.6F minh hoạ khía cạnh này của sáng chế bằng cách mô tả lược đồ các phân tử có ba chuỗi polypeptit này. Như đề xuất trên Fig.6A-Fig.6F, các phân tử gắn kết hoá trị ba theo sáng chế có thể có các định hướng khác, trong đó các miền gắn kết kiểu kháng thể thể đôi là đầu tận cùng N (Fig.6A, Fig.6C và Fig.6D) hoặc đầu tận cùng C (Fig.6B, Fig.6E và Fig.6F) so với vùng Fc.

Theo các phương án nhất định, chuỗi polypeptit thứ nhất của các phân tử gắn kết hoá trị ba theo sáng chế có chứa: (i) miền chứa VL1, (ii) miền chứa VH2, (iii) miền thúc đẩy heterodime, và (iv) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Các miền VL1 và VL2 nằm ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C so với miền chứa CH2-CH3 được trình bày trong bảng 5 (Fig.6A và Fig.6B). Chuỗi polypeptit thứ hai của các phương án này có chứa: (i) miền chứa VL2, (ii) miền chứa VH1, và (iii) miền thúc đẩy heterodime. Chuỗi polypeptit thứ ba của các phương án này có chứa: (i) miền chứa VH3, (ii) miền chứa CH1 và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ ba có thể là chuỗi nặng của kháng thể có chứa VH3 và vùng hằng định chuỗi nặng. Polypeptit thứ tư của các phương án này có chứa: (i) miền chứa VL3 và (ii) miền chứa CL. Chuỗi polypeptit thứ tư có thể là chuỗi nhẹ của kháng thể có chứa VL3 bổ trợ cho VH3 của chuỗi polypeptit thứ ba. Chuỗi polypeptit thứ ba hoặc thứ tư có thể được phân lập từ các kháng thể có trong tự nhiên. Theo cách khác, các chuỗi này có thể được tạo cấu trúc theo cách tái tổ hợp, tổng hợp hoặc theo cách khác.

Miền biến đổi chuỗi nhẹ của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai được tách khỏi các miền biến đổi chuỗi nặng của các chuỗi polypeptit này bằng liên kết đệm can thiệp có độ dài quá ngắn để cho phép các miền VL1/VH2 của chúng (hoặc VL2/VH1 của chúng) kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết epitop có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất hoặc epitop thứ hai. Peptit đệm can thiệp (Liên kết 1) được ưu tiên cho mục đích này có trình tự (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG. Các miền khác của các phân tử gắn kết hoá trị ba có thể được tách riêng bằng một hoặc nhiều peptit đệm can thiệp, tuỳ ý bao gồm gốc xystein. Các liên kết ví dụ để tạo ra các phân tử gắn kết hoá trị ba được đề xuất trong bản mô tả này và cũng được đề xuất trong các Đơn PCT số:

PCT/US15/33081; và PCT/US15/33076. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của các phân tử gắn kết hoá trị ba này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL1/VH1 có khả năng gắn kết epitop thứ nhất, cũng như vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai. Chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư của các phân tử gắn kết hoá trị ba này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL3/VH3 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ ba. Nên hiểu là các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép việc gắn kết là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc tam đặc hiệu.

Như được mô tả ở trên, các phân tử gắn kết hoá trị ba theo sáng chế có thể bao gồm ba polypeptit. Các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm ba chuỗi polypeptit có thể thu được bằng cách liên kết các miền của đầu tận cùng N của polypeptit thứ tư với miền chứa VH3 của polypeptit thứ ba. Theo cách khác, chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử gắn kết hoá trị ba theo sáng chế có chứa ba miền sau đây được sử dụng: (i) miền chứa VL3, (ii) miền chứa VH3, và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3, trong đó VL3 và VH3 ở cách xa nhau do peptit đệm can thiệp mà đủ dài (ít nhất là 9 hoặc nhiều hơn các gốc axit amin) sao cho cho phép kết hợp các miền này để tạo thành vị trí gắn kết epitop.

Nên hiểu là các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép việc gắn kết là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc tam đặc hiệu. Tuy nhiên, như đề xuất trong bản mô tả này, các miền này tốt hơn là được chọn để gắn kết PD-1 và epitop thứ hai (hoặc epitop thứ hai và epitop thứ ba) (tốt hơn là, các epitop này là các epitop của B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.).

Cụ thể là, các miền VL và VH có thể được chọn sao cho phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và một vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc một vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc một vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất, một vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai và một vị trí gắn kết đối với epitop thứ ba. Cấu trúc chung của chuỗi polypeptit các phân tử gắn kết hoá trị ba đại diện theo sáng chế được đề xuất trên Fig.6A-Fig.6F và trong trong bảng 5:

Bảng 5		
Bốn chuỗi Hướng thứ nhất	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL3-CL-COOH
Bốn chuỗi Hướng thứ nhất hai	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2 -CH2-CH3--VL1-VH2-HPD COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL3-CL-COOH
Ba chuỗi Hướng thứ nhất	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
Ba chuỗi Hướng thứ hai	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2 -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD = miền thúc đẩy heterodime

Một phương án của sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết hoá trị ba đặc hiệu kép mà bao gồm hai vị trí gắn kết epitop đối với PD-1 và hai vị trí gắn kết epitop đối với epitop thứ hai có mặt trên phân tử không phải là PD-1 (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, *v.v*). Hai vị trí gắn kết epitop đối với PD-1 có thể gắn kết cùng một epitop hoặc các epitop khác nhau. Một phương án khác của sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết hoá trị ba đặc hiệu kép mà bao gồm một vị trí gắn kết epitop đối với PD-1 và hai vị trí gắn kết epitop mà gắn kết kháng nguyên thứ hai có mặt trên một phân tử không phải là PD-1 (ví dụ, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC lớp I hoặc II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, v.v.). Hai vị trí gắn kết epitop đối với kháng nguyên thứ hai có thể gắn kết cùng một epitop

hoặc các epitop khác nhau của kháng nguyên này (ví dụ, các epitop giống nhau hoặc các epitop khác nhau của LAG-3). Như đề xuất ở trên, các phân tử gắn kết hoá trị ba đặc hiệu kép này có thể bao gồm ba hoặc bốn chuỗi polypeptit.

VII. Các miền hằng định và các vùng Fc

Sáng chế đề xuất trong bản mô tả này là các miền hằng định kháng thể hữu ích để tạo ra các phân tử gắn kết PD-1 (ví dụ, các kháng thể, kháng thể thể đôi, các phân tử gắn kết hoá trị ba, v.v.) theo sáng chế.

Miền CL được ưu tiên là miền Kappa CL của IgG của người. Trình tự axit amin của miền Kappa CL của người được láy làm ví dụ là (SEQ ID NO:8):

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

Theo cách khác, miền CL được lấy làm ví dụ là miền Lambda CL của IgG của người. Trình tự axit amin của miền Kappa CL của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:9):

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

Như đề xuất trong bản mô tả này, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể bao gồm vùng Fc. Vùng Fc của các phân tử theo sáng chế có thể thuộc isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4). Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể còn chứa miền CH1 và/hoặc vùng bản lề. Khi có mặt, miền CH1 và/hoặc vùng bản lề có thể là isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), và tốt hơn là có isotyp giống như vùng Fc mong muốn.

Miền CH1 được lấy làm ví dụ là miền CH1 của IgG1 của người. Trình tự axit amin của miền CH1 của IgG1 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:10):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Miền CH1 được lấy làm ví dụ là miền CH1 của IgG2 của người. Trình tự axit amin của miền CH1 của IgG2 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:257):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Miền CH1 được lấy làm ví dụ là miền CH1 của IgG4 của người. Trình tự axit amin của miền CH1 của IgG4 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:254):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

Một vùng bản lề được lấy làm ví dụ là vùng bản lề của IgG1 của người. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG1 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:32): EPKSCDKTHTCPPCP.

Một vùng bản lề được lấy làm ví dụ khác là vùng bản lề của IgG2 của người. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG2 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:11): ERKCCVECPPCP.

Một vùng bản lề ví dụ khác là vùng bản lề của IgG4 của người. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG4 của người được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:12): ESKYGPPCPSCP. Như được mô tả trong bản mô tả này, vùng bản lề của IgG4 có thể chứa đột biến làm ổn định như đột biến thay thế S228P. Trình tự axit amin của vùng bản lề của IgG4 được làm ổn định được lấy làm ví dụ là (SEQ ID NO:13): ESKYGPPCP**P**CP.

Vùng Fc của các phân tử chứa vùng Fc (ví dụ, các kháng thể, kháng thể thể đôi, và các phân tử hoá trị ba) theo sáng chế có thể là vùng Fc toàn vẹn (ví dụ, vùng Fc toàn vẹn của IgG) hoặc chỉ một đoạn của vùng Fc. Tuỳ ý, vùng Fc của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế thiếu gốc axit amin lysin đầu tận cùng C. Cụ thể là, vùng Fc của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có thể là vùng Fc biến thể được thao tác di truyền. Mặc dù vùng Fc của các phân tử chứa vùng Fc đặc hiệu kép theo sáng chế có thể có khả năng gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc (ví dụ, FcγR(s)), tốt hơn nữa là vùng Fc biến thể này có khả năng gắn kết với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) thay đổi (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi vùng Fc kiểu dại) hoặc có khả năng về cơ bản giảm đi hoặc không có khả năng gắn kết với (các) thụ thể ức chế. Do đó, vùng Fc của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có thể bao gồm một vài hoặc tất cả miền CH2 và/hoặc một vài hoặc tất cả miền CH3 của vùng Fc toàn vẹn, hoặc có thể bao gồm CH2 biến thể và/hoặc trình tự CH3 biến thể (mà có thể bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều đột biến cài xen và/hoặc một hoặc nhiều đột

biến khuyết đoạn đối với các miền CH2 hoặc CH3 của vùng Fc toàn vẹn). Các vùng Fc này có thể bao gồm các đoạn polypeptit không phải là Fc, hoặc có thể bao gồm các đoạn vùng Fc toàn vẹn không có trong tự nhiên, hoặc có thể bao gồm các định hướng không có trong tự nhiên của các miền CH2 và/hoặc CH3 (như, ví dụ, hai miền CH2 hoặc hai miền CH3, hoặc theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, miền CH3 được liên kết với miền CH2, v.v.).

Các cải biến vùng Fc được xác định là làm thay đổi chức năng hiệu ứng là đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các cải biến làm gia tăng khả năng gắn kết với các thụ thể hoạt động (ví dụ, FcγRIIA (CD16A) và giảm thiểu khả năng gắn kết với các thụ thể ức chế (ví dụ, FcγRIIB (CD32B) (xem, ví dụ, *"Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro and Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors,"* Cancer Res. 57(18):8882-8890, (2007) của Stavenhagen, J.B. và các đồng tác giả). Các biến thể được lấy làm ví dụ của các vùng Fc của IgG1 của người với khả năng gắn kếtgiảm đối với CD32B và/hoặc khả năng gắn kết tăng đối với CD16A có chứa các thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I hoặc P296L. Các thay thế axit amin này có thể có mặt trong vùng Fc của IgG1 của người theo tổ hợp bất kỳ hoặc tổ hợp phụ bất kỳ. Theo một phương án, biến thể vùng Fc của IgG1 của người có chứa thay thế F243L, R292P và Y300L. Theo một phương án khác, biến thể vùng Fc của IgG1 của người có chứa các thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I và P296L.

Cụ thể là, ưu tiên các vùng Fc của chuỗi polypeptit của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế thể hiện khả năng gắn kết giảm (hoặc về cơ bản hầu như không có) đối với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1). Các biến thể vùng Fc và các dạng đột biết có khả năng điều tiết khả năng gắn kết thay đổi này được nêu trên đây. Theo phương án cụ thể, các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm vùng Fc của IgG mà thể hiện chức năng hiệu ứng ADCC giảm. Theo phương án được ưu tiên, miền CH2-CH3 của các chuỗi polypeptit thứ nhất và/hoặc thứ ba của các phân tử chứa vùng Fc này bao gồm 1, 2, hoặc 3 thay thế bất kỳ trong số các thay thế: L234A, L235A, N297Q, và N297G. Theo một phương án khác, biến thể vùng Fc của IgG của người có chứa thay thế N297Q, thay thế N297G, các thay

thế L234A và L235A hoặc thay thế D265A, do các đột biến này làm mất khả năng gắn kết FcR. Theo cách khác, miền CH2-CH3 của vùng Fc mà vốn đã thể hiện khả năng gắn kết giảm đi (hoặc về cơ bản hầu như không có) đốivới FcγRIIIA (CD16a) và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm đi (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi vùng Fc của IgG1 kiểu dại (SEQ ID NO:1)) được sử dụng. Theo phương án cụ thể, các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm vùng Fc của IgG2 (SEQ ID NO:2) hoặc vùng Fc của IgG4 (SEQ ID:NO:4). Khi sử dụng vùng Fc của IgG4, sáng chế còn bao gồm việc đưa đột biến làm ổn định, như sự thay thế miền bản lề S228P nêu trên đây (xem, ví dụ, SEQ ID NO:13). Do các thay thế N297G, N297Q, L234A, L235A và D265A làm mất chức năng hiệu ứng, trong các trường hợp trong đó mong muốn có chức năng hiệu ứng, tốt hơn là không sử dụng các thay thế này.

Cụ thể là, ưu tiên các vùng Fc của chuỗi polypeptit của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế thể hiện thời gian bán thải huyết tương tăng (so với thời gian bán thải của Fc kiểu dại tương ứng). Các vùng Fc biến thể và các dạng đột biến thể hiện thời gian bán thải huyết tương kéo dài được nêu trên đây. Theo phương án được ưu tiên, miền CH2-CH3 của các chuỗi polypeptit thứ nhất và/hoặc thứ ba của các phân tử chứa vùng Fc này bao gồm 1, 2, hoặc 3 thay thế bất kỳ trong số các thay thế: M252Y, S254T và T256E. Sáng chế còn bao gồm các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm các vùng Fc biến thể bao gồm:

(A) một hoặc nhiều đột biến mà làm thay đổi chức năng hiệu ứng và/hoặc FcγR; và

(B) một hoặc nhiều đột biến mà kéo dài thời gian bán thải huyết tương.

Trình tự IgG1 được ưu tiên đối với các miền CH2 và CH3 của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm các thay thế L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO:258):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Trình tự IgG4 được ưu tiên đối với các miền CH2 và CH3 của các phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế bao gồm các thay thế M252Y/S254T/T256E (SEQ ID NO:259):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT L**Y**I**T**R**E**PEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Đối với các kháng thể thể đôi và các phân tử gắn kết hoá trị ba mà chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của chúng là không tương đồng, sẽ mong muốn làm giảm hoặc ngăn chặn quá trình homodime hoá diễn ra giữa các miền CH2-CH3 của hai chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc giữa các miền CH2-CH3 của hai chuỗi polypeptit thứ ba. Các miền CH2 và/hoặc CH3 của chuỗi polypeptit này không nhất thiết tương đồng về trình tự, và có lợi là được cải biến để hỗ trợ tạo phức giữa hai chuỗi polypeptit. Ví dụ, thay thế axit amin (tốt hơn là thay thế bằng axit amin bao gồm mạch bên cồng kềnh tạo thành "nốt phồng", ví dụ, tryptophan) có thể được đưa vào miền CH2 hoặc CH3 sao cho sự cản trở không gian sẽ ngăn không cho tương tác với miền bị đột biến tương tự và sẽ bắt buộc miền bị đột biến này ghép cặp với miền mà đột biến bổ trợ, hoặc đột biến phù hợp đã được thao tác di truyền vào trong miền này, nghĩa là, "lỗ" (ví dụ, thay thế bằng glyxin). Bộ các đột biến này có thể được thao tác di truyền ở cặp polypeptit bất kỳ bao gồm các miền CH2-CH3 tạo thành vùng Fc. Các phương pháp tạo protein bằng kỹ thuật di truyền ưu tiên heterodime hoá hơn homodime hoá là đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể là đối với việc thao tác di truyền các phân tử tương tự globulin miễn dịch, và được bao hàm trong bản mô tả này (xem ví dụ, *"'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,"* Protein Engr. 9:617-621, (1996) của Ridgway và các đồng tác giả; *"Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,"* J. Mol. Biol. 270: 26-35, (1997) của Atwell và các đồng tác giả; và *"A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression and Tumor Cell Lysis,"* J. Immunol. Methods 296:95-101, (2005) của Xie và các đồng tác giả; được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ). Tốt hơn là, "nốt phồng" được thao tác di truyền vào các miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và "lỗ" được thao tác di truyền vào các miền CH2-CH3 của chuỗi

polypeptit thứ ba của kháng thể thể đôi bao gồm ba chuỗi polypeptit. Do đó, "nốt phồng" sẽ hỗ trợ ngăn không cho chuỗi polypeptit thứ nhất homodime hoá thông qua các miền CH2 và/hoặc CH3 của nó. Vì chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là có chứa thay thế "lỗ", nên chuỗi này sẽ heterodime hoá với chuỗi polypeptit thứ nhất cũng như homodime với chính nó. Có thể sử dụng cách thức này cho kháng thể thể đôi và các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm ba, bốn hoặc năm chuỗi được nêu chi tiết trên đây, trong đó "nốt phồng" được thao tác di truyền vào các miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất và "lỗ" được thao tác di truyền vào các miền CH2-CH3 của chuỗi polypeptit thứ ba.

Nốt phồng được ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến vùng Fc của IgG để có chứa cải biến T366W. Lỗ được ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến vùng Fc của IgG để có chứa cải biến T366S, L368A và Y407V. Để hỗ trợ việc tinh chế homodime chuỗi polypeptit thứ ba mang lỗ từ phân tử chứa vùng Fc heterodime đặc hiệu kép cuối cùng, vị trí gắn kết protein A của các miền CH2 và CH3 mang lỗ của chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là được đột biến bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 435 (H435R). Do đó, homodime chuỗi polypeptit thứ ba mang lỗ sẽ không gắn kết với protein A, trong khi đó heterodime đặc hiệu kép sẽ vẫn giữ được khả năng gắn kết với protein A của nó thông qua vị trí gắn kết protein A trên chuỗi polypeptit thứ nhất. Theo một phương án khác, chuỗi polypeptit thứ ba mang lỗ có thể kết hợp các thay thế axit amin ở các vị trí 434 và 435 (N434A/N435K).

Trình tự axit amin IgG1 được ưu tiên đối với các miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế sẽ có trình tự "mang-nốt phồng" (SEQ ID NO:6):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**W**CLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Trình tự axit amin IgG1 được ưu tiên đối với các miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ hai của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có hai chuỗi polypeptit (hoặc chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử chứa vùng Fc có ba, bốn, hoặc năm chuỗi polypeptit) sẽ có trình tự "mang lỗ" (SEQ ID NO:7):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**S**C**A**VK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFL**V**SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHN**R**YTQKS LSLSPG**X**

trong đó, X là lysin (K) hoặc không có.

Lưu ý, các miền CH2-CH3 của SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7 bao gồm thay thế ở vị trí 234 bằng alanin và 235 bằng alanin, và do đó tạo thành vùng Fc thể hiện khả năng gắn kết giảm đi (hoặc về cơ bản hầu như không có) với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi vùng Fc kiểu dại (SEQ ID NO:1). Sáng chế cũng bao gồm các miền CH2-CH3, mà bao gồm các thay thế khác và/hoặc bổ sung mà cải biến chức năng hiệu ứng và/hoặc hoạt tính gắn kết FγR của vùng Fc. Sáng chế cũng bao gồm các miền CH2-CH3 này, còn bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin kéo dài thời gian bán thải. Cụ thể là, sáng chế bao gồm các miền CH2-CH3 mang lỗ và mang nốt phồng mà còn bao gồm M252Y/S254T/T256E.

Ưu tiên là chuỗi polypeptit thứ nhất có trình tự CH2-CH3 "mang-nốt phồng", như trình tự của SEQ ID NO:6. Tuy nhiên, thừa nhận là, có thể sử dụng miền CH2-CH3 "mang lỗ" (ví dụ, SEQ ID NO:7) trong chuỗi polypeptit thứ nhất, trong trường hợp này, miền CH2-CH3 "mang nốt phồng" (ví dụ, SEQ ID NO:6) sẽ được sử dụng trong chuỗi polypeptit thứ hai của phân tử chứa vùng Fc theo sáng chế có hai chuỗi polypeptit (hoặc trong chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử chứa vùng Fc có ba, bốn, hoặc năm chuỗi polypeptit).

Như đề cập chi tiết ở trên, sáng chế bao gồm các phân tử chứa vùng Fc (ví dụ, các kháng thể và kháng thể thể đôi chứa vùng Fc) có các miền CH2 và CH3 kiểu dại, hoặc có các miền CH2 và CH3 bao gồm các tổ hợp của các thay thế nêu trên đây. Trình tự axit amin được lấy làm ví dụ của miền CH2-CH3 của IgG1 bao gồm các biến thể này là (SEQ ID NO:260):

APEX_1X_2GGPSV FLFPPKPKDT LX_3IX_4RX_5PEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

LPPSREEMTK NQVSLX$_6$CX$_7$VK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLX$_8$SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHX$_9$X$_{10}$YTQKS LSLSPGX$_{11}$trong đó:

(a) X_1 và X_2 đều là L (kiểu dại), hoặc đều là A (khả năng gắn kết FcγR giảm);

(b) X_3, X_4, và X_5 tương ứng là M, S và T (kiểu dại), hoặc là Y, T và E (thời gian bán thải kéo dài),

(c) X_6, X_7, và X_8 tương ứng là: T, L và Y (kiểu dại), hoặc là W, L và Y (nốt phồng), hoặc S, A và V (lỗ);

(d) X_9 và X_{10} tương ứng là N và H (kiểu dại), hoặc là N và R (không gắn kết protein A), hoặc A và K (không gắn kết protein A); và

(e) X_{11} là K hoặc không có.

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết PD-1 bao gồm các miền CH2 và/hoặc CH3 đã được thao tác di truyền để ưu tiên heterodime hoá hơn là homodime hoá bằng cách sử dụng các đột biến đã biết trong lĩnh vực này, như các đột biến được đề cập trong các Công bố đơn PCT số WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

VIII. Các phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Sáng chế cụ thể là đề cập đến các phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép, v.v.) bao gồm mảnh gắn kết epitop của kháng thể kháng PD-1, và tốt hơn là một trong số các kháng thể kháng PD-1 của người mới được đề xuất trong bản mô tả này, và mảnh gắn kết epitop của kháng thể kháng LAG-3 của người, tốt hơn là một trong số các kháng thể kháng LAG-3 của người mới được đề xuất trong bản mô tả này. Các phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 được ưu tiên theo sáng chế có các mảnh gắn kết epitop của các kháng thể mà tạo cho chúng khả năng gắn kết phối hợp với hai epitop khác nhau: epitop của PD-1 và epitop của LAG-3, để giảm bớt các hoạt tính ức chế của các phân tử này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự giảm bớt này dùng để chỉ việc giảm ở mức ít nhất là 20%, giảm ở mức ít nhất là 50%, giảm ở mức ít nhất là 80%, hoặc giảm ở mức ít nhất là 90% hoạt tính ức chế PD-1 và/hoặc LAG-3 có thể phát hiện, hoặc loại bỏ hoàn toàn

hoạt tính ức chế PD-1 và/hoặc LAG-3 có thể phát hiện. Việc lựa chọn các mảnh gắn kết epitop (ví dụ, các miền VL và VH) của kháng thể kháng PD-1 và kháng thể-LAG-3 của người được phối hợp sao cho các chuỗi polypeptit mà tạo thành các phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 này lắp ghép để tạo thành ít nhất là một vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động mà đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (nghĩa là, PD-1 hoặc LAG-3) và ít nhất là một vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động mà đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai (nghĩa là, PD-1 hoặc LAG-3, tuỳ thuộc vào nhận dạng của kháng nguyên thứ nhất).

Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 theo sáng chế là kháng thể thể đôi đặc hiệu kép, mà tốt hơn là bao gồm hai, ba, bốn hoặc năm chuỗi polypeptit như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 theo sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép, mà tốt hơn là bao gồm hai, ba, hoặc bốn chuỗi polypeptit như được mô tả trong bản mô tả này (xem, ví dụ, WO 2007/024715; WO2007/110205; WO 2009/080251; WO 2009/080254; WO 2009/089004; WO 2011/069104; WO 2011/117329; WO 2011/131746; WO 2011/133886; WO 2011/143545; WO 2012/023053; WO 2013/060867, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ).

A. Các kháng thể kháng LAG-3 của người

Các kháng thể được lấy làm ví dụ mà đặc hiệu miễn dịch đối với LAG-3 của người được đề xuất dưới đây. Các kháng thể mong muốn bổ sung có thể được tạo ra bằng cách phân lập các tế bào lai bài tiết kháng thể được kích thích bằng cách sử dụng LAG-3 hoặc mảnh peptit của nó, hoặc bằng cách sàng lọc các thư viện kháng thể tái tổ hợp để gắn kết với LAG-3 hoặc mảnh peptit của nó. LAG-3 của người (bao gồm trình tự tín hiệu 28 gốc axit amin (được thể hiện gạch chân) và protein trưởng thành 497 gốc axit amin) có trình tự axit amin (SEQ ID NO:38):

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
VLSVGPGGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLQEQ QLNATVTLAI

ITVTPKSFGS PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

1. LAG-3 mAb A

Kháng thể kháng-LAG-3 của người BMS-986016 (25F7; Medarex/BMS), được ký hiệu trong bản mô tả này là "LAG-3 mAb A," và các biến thể của nó đã được mô tả (xem, ví dụ, WO 2014/008218). Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của LAG-3 mAb A có trình tự axit amin (SEQ ID NO:39) (các CDR được thể hiện gạch chân):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS **DYYWN**WIRQP PGKGLEWIG**E**
INHNGNTNSN **PSLKS**RVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAF**GYS**
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb A có trình tự axit amin (SEQ ID NO:40) (các CDR được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASQSIS** **SYLA**WYQQKP GQAPRLLIY**D**
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC**QQ** **RSNWPLT**FGQ
GTNLEIK

Các kháng thể của chuột kháng LAG-3 của người bổ sung có các đặc tính gắn kết độc đáo gần đây đã được xác định (xem, Đơn sáng chế Mỹ số 62/172,277). Các phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 được ưu tiên theo sáng chế bao gồm các mảnh gắn kết epitop của kháng thể kháng LAG-3 của người LAG-3 mAb 1 hoặc LAG-3 mAb 6, các kháng thể, mà gắn kết epitop mới và không cạnh tranh với BMS-986016 để gắn kết LAG-3. Đặc biệt ưu tiên là các phân tử gắn kết đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 theo sáng chế có các miền VH và/hoặc VL được làm giống như của người của LAG-3 mAb 1 hoặc LAG-3 mAb 6.

2. LAG-1 mAb 1

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:41) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR **NYGMN**WVKQA PGKVLKWMG**W**
INTYTGESTY **ADDFEG**RFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCAR**ES**
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS

CDR_H1 của LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO:42**): **RNYGMN**

CDR_H2 của LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO43**): **WINTYTGESTYADDFEG**

CDR_H3 của LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO:44**): **ESLYDYYSMDY**

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:45) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQRPGQSPE RLIY**LVSELD S**GVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**WQGTHFP YT**FGGGTKLE IK

CDR_L1 của LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO:46**): **KSSQSLLHSDGKTYLN**

CDR_L2 của LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO:47**): **LVSELDS**

CDR_L3 của LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO:48**): **WQGTHFPYT**

Hai miền VH được làm giống như của người được lấy làm ví dụ của LAG-3 mAb 1 được ký hiệu trong bản mô tả này là "hLAG-3 mAb 1 VH1," và "hLAG-3 mAb 1 VH2," và bốn miền VL được làm giống như của người được lấy làm ví dụ của LAG-3 mAb 1 là "hLAG-3 mAb 1 VL1," "hLAG-3 mAb 1 VL2," "hLAG-3 mAb 1 VL3," và "hLAG-3 mAb 1 VL4," được đề xuất dưới đây. Miền bất kỳ trong số các miền VL được làm giống như của người có thể được ghép cặp với miền bất kỳ trong số các miền VH được làm giống như của người để tạo ra miền gắn kết-LAG-3. Do đó, kháng thể bất kỳ bao gồm một miền trong số các miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi chung là "hLAG-3 mAb 1," và các tổ hợp cụ thể của các miền VH/VL được làm giống như của người được gọi bằng cách dẫn chiếu đến các miền VH/VL cụ thể, ví dụ kháng thể được làm giống như của người bao gồm hLAG-3 mAb 1 VH1 và hLAG-3 mAb 1 VL2 được gọi cụ thể là "hLAG-3 mAb 1(1,2)."

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 1 VH1 (SEQ ID NO:49) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYGMN**WVRQA PGQGLEWMG**W INTYTGESTY ADDFEG**RFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCAR**ES LYDYYSMDY**W GQGTTVTVSS

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 1 VH2 (SEQ ID NO:50) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYGMN**WVRQA PGQGLEWMG**W**
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCAR**ES**
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO:51) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQKPGQSPE
RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCW**QGTHFP**
YTFGGGTKVE IK

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL2 (SEQ ID NO:52) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQRPGQSPE
RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP**
YTFGGGTKVE IK

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO:53) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDGKTYLN**W LLQKPGQPPE
RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP**
YTFGGGTKVE IK

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL4 (SEQ ID NO:54) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISC**KSSQSLL HSDAKTYLN**W LLQKPGQPPE
RLIY**LVSELD S**GVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYC**WQGTHFP**
YTFGGGTKVE IK

CDR_L1 của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL4 bao gồm thay thế axit amin glyxin bằng alanin và có trình tự axit amin: **KSSQSLLHSDAKTYLN** (SEQ ID NO:55), alanin thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền LAG-3 mAb 1 CDR_L1 nêu trên đây.

3. LAG-3 mAb 6

Trình tự axit amin của miền VH của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:56) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT **DYNMD**WVKQS HGESLEWIG**D**
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAR**EA**
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

CDR$_H$1 của LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO:57**): **DYNMD**

CDR$_H$2 của LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO:58**): **DINPDNGVTIYNQKFEG**

CDR$_H$3 của LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO:59**): **EADYFYFDY**

Trình tự axit amin của miền VL của LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:60) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR được thể hiện gạch chân):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITC**KASQDVS SVVA**WYQQKP GQSPKLLIF**S**
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ **HYSTPWT**FGG
GTKLEIK

CDR$_L$1 của LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO:61**): **KASQDVSSVVA**

CDR$_L$2 của LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO:62**): **SASYRYT**

CDR$_L$3 của LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO:63**): **HYSTPWT**

Hai miền VH được làm giống như của người được lấy làm ví dụ của LAG-3 mAb 6 được ký hiệu trong bản mô tả này là "hLAG-3 mAb 6 VH1," và "hLAG-3 mAb 6 VH2," và hai miền VL được làm giống như của người được lấy làm ví dụ của LAG-3 mAb 6 là "hLAG-3 mAb 1 VL1," và "hLAG-3 mAb 1 VL2," được đề xuất dưới đây. Miền bất kỳ trong số các miền VL được làm giống như của người có thể được ghép cặp với miền bất kỳ trong số các miền VH được làm giống như của người để tạo ra miền gắn kết LAG-3. Do đó, kháng thể bất kỳ bao gồm một trong số các miền VL được làm giống như của người được ghép cặp với miền VH được làm giống như của người được gọi chung là "hLAG-3 mAb 6," và các tổ hợp cụ thể của các miền VH/VL được làm giống như của người được gọi bằng cách dẫn chiếu đến các miền VH/VL cụ thể, ví dụ kháng thể được làm giống như của người bao gồm hLAG-3 mAb 6 VH1 và hLAG-3 mAb 6 VL2 được gọi cụ thể là "hLAG-3 mAb 6(1.2)."

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 6 VH1 (SEQ ID NO:294) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR$_H$ được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYNMD**WVRQA PGQGLEWMG**D**
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAR**EA**
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

Trình tự axit amin của miền VH của hLAG-3 mAb 6 VH2 (SEQ ID NO:295) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **DYNMD**WVRQA PGKGLEWVS**D**
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**EA**
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL1 (SEQ ID NO:296) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQDVS SVVA**WYQQKP GKAPKLLIY**S**
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ **HYSTPWT**FGG
GTKLEIK

Trình tự axit amin của miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL2 (SEQ ID NO:297) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASQDVS SVVA**WYQQKP GKAPKLLIY**S**
ASYRYTGVPD RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ **HYSTPWT**FGG
GTKLEIK

CDR_L1 của miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL1 và VL2 bao gồm thay thế axit amin lysin bằng arginin và có trình tự axit amin: RASQDVSSVVA (SEQ ID NO:298), arginin thay thế được thể hiện gạch chân). Thay thế tương tự được dự định là có thể đưa vào miền bất kỳ trong số các miền LAG-3 mAb 6 CDR_L1 nêu dưới đây.

B. Kháng thể thể đôi chứa vùng Fc bốn chuỗi được lấy làm ví dụ có các cuộn E/K

Kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép PD-1 X LAG-3 chứa vùng Fc được lấy làm ví dụ bao gồm các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K (ký hiệu là "DART A," "DART B," "DART C," và "DART I") được tạo ra. Cấu trúc của kháng thể thể đôi chứa vùng Fc này được mô tả chi tiết dưới đây. Kháng thể thể đôi PD-1 x LAG-3 được lấy làm ví dụ này là nhằm để minh hoạ, mà không theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế.

1. DART A

DART A là kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, vùng Fc của

IgG4 biến thể được thao tác di truyền cho thời gian bán thải kéo dài, và các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K có chứa xystein. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART A bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) có chứa-xystein (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); miền bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO:13); miền CH2-CH3 của IgG4 biến thể bao gồm các thay thế M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:259); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART A là biến thể của SEQ ID NO:267:

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDX_1KTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP
KPKDTLX_2IX_3R X_4PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP
PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL

Gtrong đó X_1, X_2, X_3 và X_4 được lựa chọn độc lập, và trong đó X_1 là A hoặc G; X_2 là Y hoặc M; X_3 là T hoặc S; và X_4 là E hoặc T.

Các trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART A là SEQ ID NO:267, trong đó X_1 là A; X_2 là Y; X_3 là T; và X_4 là E.

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART A bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); peptit

liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn K) có chứa-xystein (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:24); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART A là (SEQ ID NO:268):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAC
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

2. DART B

DART B là tương đồng với DART A, ngoại trừ chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART B chứa miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO:53), mà bao gồm thay thế axit amin trong CDR_L1. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART B bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (SEQ ID NO:53); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) có chứa xystein (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); miền bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO:13); biến thể của miền CH2-CH3 của IgG4 bao gồm các thay thế M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:259); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART B là SEQ ID NO:267, trong đó X_1 là G; X_2 là Y; X_3 là T; và X_4 là E.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART B là SEQ ID NO:268.

3. DART C

DART C là tương đồng với DART B, ngoại trừ chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART B bao gồm miền CH2-CH3 của IgG4 kiểu dại thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:4). Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART C bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (SEQ ID NO:53); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) có chứa xystein (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); miền bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO:13); miền CH2-CH3 của IgG4 thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:4); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART C là SEQ ID NO:267, trong đó X_1 là G; X_2 là M; X_3 là S; và X_4 là T.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART C là SEQ ID NO:268.

4. DART I

DART I là kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, vùng Fc của IgG4 biến thể được thao tác di truyền cho thời gian bán thải kéo dài, và các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K có chứa xystein. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART I bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VL1) (SEQ ID NO:296); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) có chứa xystein (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); miền bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO:13); miền CH2-CH3 của IgG4 biến thể bao gồm các

thay thế M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:259); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART I là (SEQ ID NO:290):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTLV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART I bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (SEQ ID NO:294); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn K) có chứa xystein (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:24)); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART I là (SEQ ID NO:291):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSGGC GGGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

C. Kháng thể thể đôi chứa vùng Fc bốn chuỗi được lấy làm ví dụ mang các miền CL/CH1

Bốn kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc PD-1 X LAG-3 được lấy làm ví dụ bao gồm các miền CL/CH1 ký hiệu là "DART D," "DART E," "DART J" và "DART 1" được tạo ra. Cấu trúc của các kháng thể thể đôi chứa vùng Fc này được mô tả chi tiết dưới đây. Kháng thể thể đôi PD-1 x LAG-3 được lấy làm ví dụ này là nhằm để minh hoạ, mà không theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế.

1. DART D

DART D là kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, các miền CL/CH1, và vùng Fc của IgG4 biến thể được thao tác di truyền cho thời gian bán thải kéo dài. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART D bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CH1 của IgG4 (SEQ ID NO:254); vùng bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO: 13); biến thể của miền CH2-CH3 của IgG4 bao gồm các thay thế M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:259); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART D là (SEQ ID NO:269):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF

NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART D bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CL Kappa (SEQ ID NO:8); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART D là (SEQ ID NO:270):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW
LLQKPGQPPE RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA
PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL
GGGSGRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR
EAKVQWKVDN ALQSGNSQES VTEQDSKDST YSLSSTLTLS
KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC

2. DART E

DART E là một kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc khác có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, các miền CL/CH1, và vùng Fc của IgG4 biến thể được thao tác di truyền cho thời gian bán thải kéo dài. Vị trí của các vị trí gắn kết PD-1 và LAG-3 của DART E là đảo ngược so với DART D.

Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART E bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); peptit

liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CH1 của IgG4 (SEQ ID NO:254); vùng bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO: 13); biến thể của miền CH2-CH3 của IgG4 bao gồm các thay thế M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:259); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART E là (SEQ ID NO:271):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART E bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CL Kappa (SEQ ID NO:8), và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART E là (SEQ ID NO:272):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF
QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS

SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ
VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN YGMNWVRQAP
GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL
GGGSGRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR
EAKVQWKVDN ALQSGNSQES VTEQDSKDST YSLSSTLTLS
KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC

3. DART J

DART J là kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, các miền CL/CH1, và vùng Fc của IgG4 biến thể được thao tác di truyền cho thời gian bán thải kéo dài. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART J bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VL1) (SEQ ID NO:296); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CH1 của IgG4 (SEQ ID NO:254); vùng bản lề IgG4 được làm ổn định (SEQ ID NO: 13); biến thể của miền CH2-CH3 của IgG4 bao gồm các thay thế M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:259); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART J là (SEQ ID NO:292):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTLV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP
LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART J bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (SEQ ID NO:294); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CL Kappa (SEQ ID NO:8); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART J là (SEQ ID NO:293):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSLGG GSGRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

4. DART 1

DART 1 là kháng thể thể đôi bốn chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, các miền CL/CH1, và vùng Fc của IgG1 biến thể được thao tác di truyền cho khả năng gắn kết FcγR giảm đi. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART 1 bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb A VL) (SEQ ID NO:65); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} LAG-3 mAb A VH1) (SEQ ID NO:39); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO: 32); biến thể của miền

CH2-CH3 của IgG1 bao gồm các thay thế L234A/L235A và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:5); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART 1 là (SEQ ID NO:284):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
WVRQAPGKGL EWVAVIWYDG SKRYYADSVK GRFTISRDNS KNTLFLQMNS
LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSLG GGSGASTKGP SVFPLAPSSK
STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS
SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE
AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
NHYTQKSLSL SPG

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART 1 bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} LAG-3 mAb A VL) (SEQ ID NO:40); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb A VH) (SEQ ID NO:64); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); miền CL Kappa (SEQ ID NO:8); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART 1 là (SEQ ID NO:285):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSLTCAVY GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRSV
TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGTL VTVSSLGGGS GRTVAAPSVF

IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

D. Kháng thể thể đôi chứa vùng Fc năm chuỗi được lấy làm ví dụ

Hai kháng thể thể đôi năm chuỗi, đặc hiệu kép PD-1 X LAG-3 chứa vùng Fc bao gồm các miền CL/CH1 và các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K được ký hiệu là "DART F," và "DART G" được tạo ra. Cấu trúc của các kháng thể thể đôi chứa vùng Fc này được mô tả chi tiết dưới đây. Kháng thể thể đôi PD-1 x LAG-3 được lấy làm ví dụ này nhằm để minh hoạ, mà không theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế.

1. DART F

DART F là kháng thể thể đôi năm chuỗi, đặc hiệu kép, chứa vùng Fc có ba vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, các miền CL/CH1, vùng Fc của IgG1 mang nốt phồng/lỗ biến thể được thao tác di truyền cho khả năng gắn kết FcγR giảm và thời gian bán thải kéo dài, và các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K. Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART F bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO:32); miền CH2-CH3 của IgG1 mang lỗ bao gồm các thay thế L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:260, trong đó X_1 là A, X_2 là A, X_3 là Y, X_4 là T, X_5 là E, X_6 là S, X_7 là A, X_8 là V, X_9 là A, X_{10} là K, và không có X_{11}); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART F là (SEQ ID NO:273):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV

YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của DART F bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153), miền CL Kappa (SEQ ID NO:8), và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của DART F là (SEQ ID NO:274):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Chuỗi polypeptit thứ ba của DART F bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO:32); miền CH2-CH3 của IgG1 mang nốt phồng bao gồm các thay thế L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:260, trong đó X_1 là A, X_2 là A, X_3 là Y, X_4 là T, X_5 là E, X_6 là W, X_7 là L, X_8 là Y, X_9 là N, X_{10} là H, và không có X_{11}); peptit liên kết can thiệp (GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262)); miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ ba của DART F là (SEQ ID NO:275):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH

YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
GSGGGSGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI SCKSSQSLLH SDAKTYLNWL
LQKPGQPPER LIYLVSELDS GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDVGVY
YCWQGTHFPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT
VDKSTSTAYM ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

Chuỗi polypeptit thứ tư của DART F bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ tư của DART F là (SEQ ID NO:276):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

2. DART G

DART G là kháng thể thể đôi năm chuỗi, đặc hiệu kép, chứa vùng Fc có hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, hai vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, các miền

CL/CH1, vùng Fc của IgG1 mang nốt phồng/lỗ biến thể được thao tác di truyền cho khả năng gắn kết FcγR giảm và thời gian bán thải kéo dài, và các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K. Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART G bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO:32); miền CH2-CH3 của IgG1 mang lỗ bao gồm các thay thế L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:260, trong đó X_1 là A, X_2 là A, X_3 là Y, X_4 là T, X_5 là E, X_6 là S, X_7 là A, X_8 là V, X_9 là A, X_{10} là K, và X_{11} không có); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART G là (SEQ ID NO:277):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG

Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của DART G bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54), miền CL Kappa (SEQ ID NO:8), và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của DART G là (SEQ ID NO:278):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK

VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

Chuỗi polypeptit thứ ba của DART G bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO:32); miền CH2-CH3 của IgG1 mang nốt phồng bao gồm các thay thế L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E và thiếu gốc đầu tận cùng C (SEQ ID NO:260, trong đó X_1 là A, X_2 là A, X_3 là Y, X_4 là T, X_5 là E, X_6 là W, X_7 là L, X_8 là Y, X_9 là N, X_{10} là H, và không có X_{11}); peptit liên kết can thiệp (GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262)); miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ ba của DART G là (SEQ ID NO:279):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG
GGSGGGSGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF
QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY
FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT
VDKSTSTAYM ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

Chuỗi polypeptit thứ tư của DART G bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn

kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ tư của DART G là (SEQ ID NO:280):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

E. Kháng thể thể đôi chứa vùng Fc ba chuỗi được lấy làm ví dụ có các cuộn E/K

Sáng chế còn đề xuất kháng thể thể đôi ba chuỗi, đặc hiệu kép PD-1 X LAG-3 chứa vùng Fc bao gồm các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K. Kháng thể thể đôi ba chuỗi, đặc hiệu kép PD-1 X LAG-3 chứa vùng Fc được lấy làm ví dụ bao gồm các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K được ký hiệu là "DART H" được tạo ra. Cấu trúc của kháng thể thể đôi chứa vùng Fc này được mô tả chi tiết dưới đây. Kháng thể thể đôi PD-1 x LAG-3 được lấy làm ví dụ này nhằm để minh hoạ, mà không theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế.

DART H là kháng thể thể đôi ba chuỗi, đặc hiệu kép chứa vùng Fc, có một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, vùng Fc của IgG1 mang nốt phồng/lỗ biến thể được thao tác di truyền cho khả năng gắn kết FcγR giảm, và các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K.

Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART H bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); peptit liên

kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); liên kết can thiệp (Vùng đệm-Liên kết 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:263)); miền CH2-CH3 của IgG1 mang nốt phồng bao gồm các thay thế L234A/L235A và có gốc lysin đầu tận cùng C (SEQ ID NO:6); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART H là (SEQ ID NO:281):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGK

Chuỗi polypeptit thứ hai của DART H bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); peptit liên kết can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); peptit liên kết can thiệp có chứa xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); miền thúc đẩy heterodime (cuộn K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai của DART H là (SEQ ID NO:282):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT

SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

Chuỗi polypeptit thứ ba của DART H bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; vùng bản lề (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31); miền CH2-CH3 của IgG1 mang lỗ bao gồm các thay thế L234A/L235A và có gốc lysin đầu tận cùng C (SEQ ID NO:7); và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ ba của DART H là (SEQ ID NO:283):

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

F. Kháng thể đặc hiệu kép được lấy làm ví dụ

Kháng thể bốn chuỗi đặc hiệu kép PD-1 X LAG-3 được lấy làm ví dụ được gọi là "BSAB A" được tạo ra. Cấu trúc của kháng thể đặc hiệu kép này được mô tả chi tiết dưới đây. Kháng thể đặc hiệu kép PD-1 X LAG-3 được lấy làm ví dụ này là nhằm để minh hoạ, mà không theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế.

BSAB A là kháng thể đặc hiệu kép có một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với PD-1, một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với LAG-3, vùng Fc của IgG1 biến thể được thao tác di truyền để làm giảm khả năng gắn kết FcγR và để hỗ trợ việc tạo phức giữa hai polypeptit chuỗi nặng khác nhau (ví dụ, ví dụ, WO 2011/143545).

Chuỗi polypeptit thứ nhất của BSAB A bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 biến thể bao gồm các thay thế D221E/P228E (được đánh số theo chỉ số EU như trong Kabat và được gạch chân trong SEQ ID NO:286, dưới đây); miền CH2-CH3 của IgG1 biến thể bao gồm các thay thế L234A/L235A/L368E (được gạch chân trong SEQ ID NO:286, dưới đây) và thiếu gốc đầu tận cùng C; và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của BSAB A là (SEQ ID NO:286):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SC**E**KTHTCP**E** CPAPE**AA**GGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTC**E** VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

Chuỗi polypeptit thứ hai của BSAB bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); miền CL Kappa (SEQ ID NO:8), và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai của BSAB là (SEQ ID NO:287):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Chuỗi polypeptit thứ ba của BSAB A bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO:10); vùng bản lề của IgG1 biến thể bao gồm các thay thế D221R/P228R (được gạch chân trong SEQ ID NO:288, dưới đây); miền CH2-CH3 của IgG1 biến thể bao gồm các thay thế L234A/L235A/L409R (được gạch chân trong SEQ ID NO:288, dưới đây) và thiếu gốc đầu tận cùng C; và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ ba của BSAB A là (SEQ ID NO:288):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES

LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

Chuỗi polypeptit thứ tư của BSAB A bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: đầu tận cùng N; miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); miền CL Kappa (SEQ ID NO:8), và đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ tư của BSAB A là (SEQ ID NO:289):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

IX. Các kháng thể tham chiếu

A. Các kháng thể kháng PD-1 của người tham chiếu

Để đánh giá và xác định đặc tính các phân tử gắn kết kháng PD-1 của người mới theo sáng chế, sử dụng các kháng thể tham chiếu sau đây: nivolumab (còn được gọi là 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, và được Bristol-Myers Squibb bán dưới tên OPDIVO®), kháng thể IgG4 của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "PD-1 mAb A;" và pembrolizumab (trước đây được gọi là lambrolizumab, còn được gọi là MK-3475, SCH-900475, và được Merck bán dưới tên KEYTRUDA®) kháng thể IgG4 được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "PD-1 mAb B."

1. Nivolumab ("PD-1 mAb A")

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của PD-1 mAb A có trình tự axit amin (SEQ ID NO:64) (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS **NSGMH**WVRQA PGKGLEWVA**V**
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCAT**ND**
DYWGQGTLVT VSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb A có trình tự axit amin (SEQ ID NO:65) (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASQSVS** **SYLA**WYQQKP GQAPRLLIY**D**
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC**QQ** **SSNWPRT**FGQ
GTKVEIK

2. Pembrolizumab ("PD-1 mAb B")

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng của PD-1 mAb B có trình tự axit amin (SEQ ID NO:66) (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **NYYMY**WVRQA PGQGLEWMG**G**
INPSNGGTNF **NEKFKN**RVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCAR**RD**
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

Trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb B có trình tự axit amin (SEQ ID NO:67) (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASKGVS** **TSGYSYLH**WY QQKPGQAPRL
LIY**LASYLES** GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC**QHSRDLPL**
TFGGGTKVEIK

X. Các phương pháp sản xuất

Polypeptit kháng PD-1 của người, và các chất chủ vận, đối kháng và điều biến PD-1 khác có thể được tạo ra từ các polynucleotit và/hoặc các trình tự của các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1-15 bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách tổng hợp hoặc tái tổ hợp. Một phương pháp sản xuất các chất chủ vận, đối kháng và điều biến peptit này bao gồm tổng hợp hoá học polypeptit, tiếp đó xử lý trong điều kiện oxy hoá thích hợp để thu được cấu dạng nguyên thuỷ, nghĩa là các liên kết đisulfua đúng. Phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp luận đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, trong tài liệu: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES VÀ METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., tập 12, các trang 1-19, (1990) của Kelley, R. F. và các đồng tác giả; SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, (1984) của Stewart, J.M và các đồng tác giả; cũng xem các bằng sáng chế Mỹ số 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; và 3,862,925).

Các polypeptit theo sáng chế có thể được điều chế thuận tiện bằng cách sử dụng quá trình tổng hợp peptit pha rắn (*"Solid Phase Synthesis,"* Science 232(4748):341-347, (1986) của Merrifield, B.; *"General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135, (1985) của Houghten, R.A.; *"Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century,"* Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10), (2006) của Ganesan, A..

Theo cách khác, các kháng thể toàn vẹn của người có một hoặc nhiều CDR của PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15, hoặc cạnh tranh với PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15, để gắn kết với PD-1 của người hoặc dạng hòa tan của chúng có thể thu được bằng cách sử dụng chuột có bán sẵn mà được thao tác di truyền để biểu hiện các protein globulin miễn dịch đặc hiệu của người. Các động vật chuyển gen được thiết kế để sản sinh đáp ứng miễn dịch mong muốn (ví dụ, các kháng thể toàn vẹn của người) hoặc đáp ứng miễn dịch mạnh hơn cũng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể của người hoặc được làm giống như của người. Các ví dụ về công nghệ này là XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) và HUMAB-MOUSE® và TC MOUSE™ (đều của Medarex, Inc., Princeton, NJ).

Theo cách khác, các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp và biểu hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách trước tiên phân lập các kháng thể được tạo ra từ các động vật chủ, thu được trình tự gen, và sử dụng trình tự gen này để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp ở các tế bào chủ (ví dụ, các tế bào CHO). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự kháng thể ở thực vật {ví dụ, cây thuốc lá) hoặc sữa chuyển gen. Các phương pháp thích hợp để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp ở thực vật hoặc sữa đã được bộc lộ (xem, ví dụ *"Production Of Antibodies and Antibody Fragments In Plants,"* Vaccine 19:2756, (2001) của Peeters và các đồng tác giả; *"Human Antibodies From Transgenic Mice,"* Int. Rev. Immunol 13:65-93, (1995)

của Lonberg, N. và các đồng tác giả; và *"Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies,"* J. Immunol Methods 231:147-157, (1999) của Pollock và các đồng tác giả). Các phương pháp thích hợp để tạo ra các dẫn xuất của các kháng thể, ví dụ, được làm giống như của người, đơn chuỗi, v.v. là đã biết trong lĩnh vực này. Theo cách khác, các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng kỹ thuật bộc lộ thực khuẩn thể (xem, ví dụ các Bằng sáng chế Mỹ số 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; và *"Making Antibodies By Phage Display Technology,"* Annu. Rev. Immunol. 12,433-455, (1994) của Winter, G. và các đồng tác giả).

Các kháng thể hoặc protein quan tâm có thể được xác định trình tự bằng cách phân huỷ Edman, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Thông tin peptit được tạo ra từ phổ khối hoặc phân huỷ Edman có thể được sử dụng để thiết kế các đoạn dò hoặc các đoạn mồi mà được sử dụng để tách dòng protein quan tâm.

Phương pháp thay thế để tách dòng protein quan tâm là bằng cách "quét đãi" có sử dụng PD-1 tinh khiết hoặc các đoạn của nó đối với các tế bào biểu hiện kháng thể hoặc protein quan tâm mà có một hoặc nhiều CDR của PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15, hoặc của kháng thể mà cạnh tranh với PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15, để gắn kết với PD-1 của người. Có thể tiến hành quy trình "quét đãi" bằng cách thu được thư viện cADN từ các mô hoặc tế bào biểu hiện PD-1, biểu hiện quá mức cADN ở loại tế bào thứ hai, và sàng lọc các tế bào đã chuyển nhiễm của loại tế bào thứ hai về khả năng gắn kết đặc hiệu với PD-1 khi có hoặc không có PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15. Các bản mô tả chi tiết các phương pháp được sử dụng để tách dòng các gen động vật có vú mã hoá các protein bề mặt tế bào bằng cách "quét đãi" có thể được tìm thấy trong lĩnh vực này (xem, ví dụ *"Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577, (1987) của Aruffo, A. và các đồng tác giả và *"Selective Cloning*

Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," Endocrinol. 140:5841-5854, (1999)của Stephan, J. và các đồng tác giả).

Các vật truyền có chứa các polynucleotit quan tâm có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách bất kỳ trong số các cách thức thích hợp, bao gồm điện di, chuyển nhiễm có sử dụng canxi clorua, rubiđi clorua, canxi phosphat, DEAE- dextran, hoặc các chất khác; bắn phá bằng vi hạt; chuyễn nhiễm qua lipit; và lây nhiễm (ví dụ, trong trường hợp này vật truyền là tác nhân lây nhiễm như virut vaccinia). Việc lựa chọn đưa các vật truyền hoặc các polynucleotit vào thường sẽ tuỳ thuộc vào các đặc tính của tế bào chủ.

Tế bào chủ bất kỳ có khả năng biểu hiện quá mức các ADN khác loài có thể được sử dụng nhằm mục đích phân lập các gen mã hoá kháng thể, polypeptit hoặc protein quan tâm. Các ví dụ không mang tính giới hạn về các tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở các tế bào COS, HeLa, và CHO. Tốt hơn là, các tế bào chủ biểu hiện các cADN ở mức cao hơn khoảng 5 lần, tốt hơn nữa là 10 lần, thậm chí tốt hơn nữa là 20 lần so với mức kháng thể hoặc protein quan tâm nội sinh tương ứng, nếu có mặt, ở các tế bào chủ. Việc sàng lọc các tế bào chủ về khả năng gắn kết đặc hiệu với PD-1 được thực hiện bởi thử nghiệm miễn dịch hoặc FACS. Tế bào biểu hiện quá mức kháng thể hoặc protein quan tâm có thể được xác định.

Sáng chế bao gồm các polypeptit bao gồm trình tự axit amin của các kháng thể theo sáng chế. Các polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các polypeptit có thể được sản xuất bằng cách phân giải protein hoặc theo cách thuỷ phân các kháng thể khác, bằng các phương pháp tái tổ hợp (nghĩa là, các polypeptit đơn nhất hoặc dung hợp) như nêu trên đây hoặc bằng cách tổng hợp hoá học. Các polypeptit của các kháng thể, đặc biệt là các polypeptit ngắn hơn tối đa khoảng 50 axit amin, được tạo ra một cách thuận tiện bằng cách tổng hợp hoá học. Các phương pháp tổng hợp hoá học là đã biết trong lĩnh vực này và có bán sẵn. Ví dụ, polypeptit kháng PD-1 của người có thể được sản xuất bằng thiết bị tổng hợp polypeptit tự động có sử dụng phương pháp pha rắn.

Sáng chế bao gồm các biến thể của các kháng thể PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14

hoặc PD-1 mAb 15 và các mảnh polypeptit của chúng mà gắn kết với PD-1, bao gồm các kháng thể tương đương về chức năng và các polypeptit dung hợp mà không ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất của các phân tử này cũng như các biến thể có hoạt tính tăng cường hoặc giảm đi. Việc cải biến các polypeptit là thực tiễn thường quy trong lĩnh vực này và không nhất thiết cần mô tả chi tiết trong bản mô tả này. Ví dụ về các polypeptit được cải biến bao gồm các polypeptit với các thay thế bảo toàn của các gốc axit amin, một hoặc nhiều khuyết đoạn hoặc bổ sung axit amin mà không làm thay đổi có hại đáng kể hoạt tính chức năng hoặc sử dụng các chất tương tự hoá học. Các gốc axit amin mà có thể được thay thế bảo toàn cho nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở: glyxin/alanin; serin/threonin; valin/isoloxin/loxin; asparagin/glutamin; axit aspartic/axit glutamic; lysin/arginin; và phenylalanin/tyrosin. Các polypeptit này cũng bao gồm các polypeptit được glycosyl hoá và không được glycosyl hoá, cũng như các polypeptit với các cải biến sau dịch mã khác, như, ví dụ, glycosyl hoá bằng các đường khác nhau, axetyl hoá, và phosphoryl hoá. Tốt hơn là, các thay thế axit amin sẽ bảo toàn, nghĩa là, axit amin được thay thế sẽ có các tính chất hoá học tương tự như axit amin gốc. Các thay thế bảo toàn này là đã biết trong lĩnh vực này, và các ví dụ đã được cung cấp ở trên. Các cải biến axit amin có thể là từ thay đổi hoặc cải biến một hoặc nhiều axit amin để hoàn thành việc thiết kế lại một vùng, như miền biến đổi. Các thay đổi trong miền biến đổi có thể làm thay đổi ái lực gắn kết và/hoặc tính đặc hiệu gắn kết. Các phương pháp cải biến khác bao gồm bước sử dụng các kỹ thuật ghép nối đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp dùng enzym, thay thế oxy hoá và tạo chelat. Các cải biến có thể được sử dụng, ví dụ, để gắn các chất đánh dấu cho thử nghiệm miễn dịch, như gắn các nhóm hoạt tính phóng xạ cho thử nghiệm miễn dịch phóng xạ. Các polypeptit được cải biến được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình đã thiết lập trong lĩnh vực này và có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Sáng chế bao gồm các protein dung hợp bao gồm một hoặc nhiều polypeptit hoặc các kháng thể PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15 theo sáng chế. Theo một phương án, polypeptit dung hợp được đề xuất bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng hoặc cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp có chứa vùng

hằng định của globulin miễn dịch khác loài. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp có chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được sản xuất từ tế bào lai đã nộp lưu công khai. Cho các mục đích của sáng chế, protein dung hợp kháng thể có chứa một hoặc nhiều miền polypeptit mà gắn kết đặc hiệu với PD-1 và một trình tự axit amin khác mà không được gắn vào trong phân tử nguyên thuỷ, ví dụ, trình tự khác loài hoặc trình tự tương đồng từ một vùng khác.

XI. Các ứng dụng của các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế

Sáng chế bao gồm các chế phẩm, bao gồm các dược phẩm, bao gồm các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế (ví dụ, các kháng thể kháng PD-1, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép kháng PD-1, v.v.), các polypeptit thu được từ các phân tử này, các polynucleotit bao gồm các trình tự mã hoá các phân tử hoặc các polypeptit này, và các chất khác như được mô tả trong bản mô tả này.

A. Các ứng dụng trị liệu

Như đề cập ở trên, PD-1 đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều hoà giảm sự tăng sinh, chức năng và cân bằng nội môi tế bào T. Một số phân tử nhất định trong số các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có khả năng ức chế chức năng PD-1, và do đó đảo ngược sự ức chế hệ miễn dịch qua trung gian-PD-1. Do đó, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, và PD-1 mAb 15, các dẫn xuất được làm giống như của người của chúng, và các phân tử bao gồm mảnh gắn kết PD-1 của chúng (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I, và DART-J), v.v.), hoặc cạnh tranh để gắn kết với các kháng thể này, có thể được sử dụng để phong bế sự ức chế hệ miễn dịch qua trung gian-PD-1, và từ đó thúc đẩy quá trình hoạt hóa hệ miễn dịch.

Các phân tử gắn kết PD-1 đặc hiệu kép theo sáng chế gắn kết với PD-1 và một phân tử tham gia vào quá trình điều hoà điểm kiểm tra miễn dịch khác có mặt trên bề mặt tế bào (ví dụ, LAG-3) làm tăng cường hệ miễn dịch bằng cách phong bế sự ức chế hệ miễn dịch qua trung gian PD-1 và các phân tử điểm kiểm tra miễn dịch này. Do đó, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế này là hữu ích để tăng cường đáp ứng miễn dịch (ví dụ, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T) của đối tượng. Cụ thể là, các phân tử

gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ kèm theo hệ miễn dịch bị ức chế ngoài mong muốn, bao gồm bệnh ung thư và các bệnh có liên quan đến sự có mặt của mầm bệnh (ví dụ, nhiễm vi khuẩn, nấm, virut hoặc động vật nguyên sinh).

Các bệnh ung thư mà có thể được điều trị bằng các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm các bệnh ung thư đặc trưng bởi sự có mặt của tế bào ung thư được chọn từ nhóm gồm tế bào của: khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư có liên quan đến AIDS, sacom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tuỷ sống, khối u não di căn, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sacom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sacom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, xương bất thường tạo sợi, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật bàng quang hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào gan, khối u tế bào đảo, sacom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, khối u mỡ lành tính/u mỡ, khối u mỡ ác tính/sacom mỡ, bệnh ung thư gan, u bạch huyết, bệnh ung thư phổi, u nguyên bào tuỷ, u melanin, u màng não, đa u tuyến nội tiết, đa u tuỷ, hội chứng loạn sản tuỷ, u nguyên bào thần kinh, các khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuỵ, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, u hắc tố ác tính màng bồ đào sau, rối loạn huyết học hiếm gặp, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình que, sacom cơ vân, bệnh sacom, bệnh ung thư da, bệnh sacom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vẩy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh sacom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinoma tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư di căn tuyến giáp, và bệnh ung thư tử cung.

Cụ thể là, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư trực tràng, caxinom tế bào gan, u thần kinh đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư vú, đa u tuỷ, bệnh ung thư bàng quang, u nguyên bào thần kinh; bệnh sacom, u bạch huyết không phải Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuỵ và bệnh ung thư trực tràng.

Các bệnh có liên quan đến mầm bệnh mà có thể được điều trị bằng các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm nhiễm virut, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng mãn tính. Các bệnh lây nhiễm mãn tính mà có thể điều trị bằng các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm virut Epstein Barr, virut viêm gan A (HAV); virut viêm gan B (HBV); virut viêm gan C (HCV); virut herpes (ví dụ, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), virut suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virut Vesicular Stomatitis (VSV), *Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter, Gonococci, Helicobacter pylori, Klebsiella, Legionella, Meningococci,* mycobacteria, *Pseudomonas, Pneumonococci,* vi khuẩn ricketsia, *Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci, Tetanus, Aspergillus* (fumigatus, niger, v.v.), *Blastomyces dermatitidis, Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, *etc.*), *Cryptococcus neoformans,* Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis, Borrelia burgdorferi*, ký sinh trùng giun sán (giun móc, sán dây, sán lá, sán dẹp (ví dụ *Schistosomia*), *Giardia lambia, trichinella, Dientamoeba Fragilis, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi,* và *Leishmania donovani.*

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể kết hợp với các chất chống ung thư khác, cụ thể là, các phân tử gắn kết đặc hiệu kháng nguyên ung thư (ví dụ, các kháng thể, kháng thể thể đôi). Các liệu pháp chống ung thư mà có thể kết hợp với các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm các phân tử mà gắn kết đặc hiệu một hoặc nhiều kháng nguyên ung thư bao gồm: 19.9 như tìm thấy trong các muxin ung thư đại tràng, ung thư dạ dày; 4.2; A33 (kháng nguyên caxinoma trực tràng; *Nucl Med Biol. Nov*;33(8):991-998, 2006, của Almqvist, Y.); ADAM-9 (Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2006/0172350; Công bố đơn PCT số WO 06/084075); AH6 như tìm thấy trong bệnh ung thư dạ dày; ALCAM (Công bố đơn PCT số WO 03/093443); APO-1 (kháng nguyên lympho bào của người ác tính) (*"Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis,"* Science 245:301-304, (1989) của Trauth và các đồng tác giả); B1 (*Cancer Res.* 66(1):6-9), 2006, của Egloff, A.M. và các đồng tác giả; B7-H3 (*"The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,"* Genome Biol. 6:223.1-223.7, (2005) của Collins, M. và các đồng tác giả). *"B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production,"* Nature Immunol. 2:269–274, (2001) của Chapoval, A. và các đồng tác giả; *"Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes,"* J.

Immunol. 168:6294-6297, (2002) của Sun, M. và các đồng tác giả); BAGE (*Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84, 2002 của Bodey, B.); beta-catenin (J Pathol. 201(2):250-9, 2003 của Prange W. và các đồng tác giả); ALe^b/Le^y nhóm máu như tìm thấy trong ađenocaxinoma ruột già; kháng nguyên-38.13, C14 u bạch huyết Burkitt như tìm thấy trong ađenocaxinoma ruột già; CA125 (kháng nguyên caxinoma buồng trứng) (*Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3:274-81, 2005 của Bast, R.C. Jr. và các đồng tác giả; *"Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants,"* Cancer Res. 51(2):468-475, (1991) của Yu và các đồng tác giả); Carboxypeptidaza M (Công bố Sáng chế Mỹ số 2006/0166291); CD5 (Semin Oncol. 33(2):167-73, 2006 của Calin, G.A. và các đồng tác giả; CD19 (*"Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro and Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest,"* Blood 83:1329-1336, (1994) của Ghetie và các đồng tác giả; *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48, 1998 của Troussard, X. và các đồng tác giả); CD20 *("Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20,"* Blood 83:435-445, (1994) của Reff và các đồng tác giả; Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36, 2006 của Thomas, D.A. và các đồng tác giả); CD22 (AAPS J. 18;8(3):E532-51, 2006 của Kreitman, R.J.); CD23 (*Curr Top Microbiol Immunol.* 5;294:91-107, 2005 của Rosati, S. và các đồng tác giả); CD25 (*Hematol Cell Ther*. 40(4):139-48, 1998 của Troussard, X. và các đồng tác giả); CD27 (*Haematologica* 91(9):1234-40, 2006 của Bataille, R.); CD28 (*Haematologica* 91(9):1234-40, 2006 của Bataille, R.); CD33 *("Modeling và Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia,"* J. Nucl. Med. 34:422-430, (1993) của Sgouros và các đồng tác giả); CD36 (*Lab Hematol.* 11(1):31-7, 2005 của Ge, Y.); CD40/CD154 (*Ann N Y Acad Sci.* 1062:51-60, 2005 của Messmer, D. và các đồng tác giả); CD45 (*Curr Oncol Rep.* 7(5):339-46, 2005 của Jurcic, J.G.); CD56 (*Haematologica* 91(9):1234-40, 2006 của Bataille, R.); CD46 (Bằng sáng chế Mỹ số 7,148,038; Công bố đơn PCT số WO 03/032814); CD52 (*"Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients,"* Ann Hematol. 93(10):1725-1733, (2014) của Eketorp, S.S. và các đồng tác giả; *"New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy,"* J. Hematol. Oncol. 7:58, (2014) của Suresh, T. và các đồng tác giả; *"Targeted Therapy With Monoclonal*

Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia," Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706, (2013) của Hoelzer, D.); CD56 (*Haematologica* 91(9):1234-40, 2006 của Bataille, R.); CD79a/CD79b (*Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48, 1998 của Troussard, X. và các đồng tác giả; Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106, 2001 của Chu, P.G. và các đồng tác giả); CD103 (*Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48, 1998 của Troussard, X. và các đồng tác giả); CD317 *("Interferon-A Enhances CD317 Expression and The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models,"* Cancer Science 99(12):2461-2466, (2008) của Kawai, S. và các đồng tác giả; *"HM1,24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1,24 Antibody,"* Cancer Immunology, Immunotherapy 58(6):967-976, (2009) của Wang, W. và các đồng tác giả; "Chimeric and Humanized Anti-HM1,24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer," 63(1):23-31, (2009) của Wang, W. và các đồng tác giả; *"Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation and Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells,"* PLoS ONE 8(6)e67191, (2013), các trang 1-10, của Sayeed, A. và các đồng tác giả); CDK4 (*Cell Cycle* 5(18):2110-4, 2006 của Lee, Y.M. và các đồng tác giả); CEA (kháng nguyên phôi ung thư; *"Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine,"* J. Clin. Invest. 96(1):334-42, (1995) của Foon và các đồng tác giả); *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46, 2006 của Mathelin, C.; *Rev Invest Clin.* 57(6):814-9, 2005 của Tellez-Avila, F.I. và các đồng tác giả); CEACAM9/CEACAM6 *("A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity,"* PLoS One 6(6):e21146, (2011) các trang 1-11, của Zheng, C. và các đồng tác giả); CO17-1A (*"Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A and GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced,"* Int. J. Cancer 53:751-758, (1993) của Ragnhammar và các đồng tác giả); CO-43 (nhóm máu Le^b); CO-514 (nhóm máu Le^a) như tìm thấy trong ađenocaxinoma; CTA-1; CTLA-4 (*Curr Opin Immunol.* 18(2):206-13, 2006 của Peggs, K.S. và các đồng tác giả); Cytokeratin 8 (Công bố đơn PCT số WO 03/024191); D1.1; $D_1$56-22; DR5 (*"TRAIL Receptor Signaling and Therapeutics,"* Expert Opin. Ther. Targets 14(10):1091-1108, (2010) của Abdulghani, J. và các đồng tác giả; *"Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family,"* Biomed.

Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3):173-180, (2009) của Andera, L.; *"Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy,"* Clin, Cancer 13(8):2313-2317, (2007) của Carlo-Stella, C. và các đồng tác giả; *"Following the TRAIL to Apoptosis,"* Immunologic Res. 35(3):249-262, (2006) của Chaudhari, B.R. và các đồng tác giả); xê-ri E_1 (nhóm máu B) như tìm thấy trong bệnh ung thư tuỵ; EGFR (Thụ thể Yếu tố Tăng trưởng Biểu mô; *Bull Cancer.* 90 Spec No:S228-32, 2003 của Adenis, A. và các đồng tác giả); các thụ thể Ephrin (và cụ thể là EphA2 (Sáng chế Mỹ số 7,569,672; Công bố đơn PCT số WO 06/084226); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; *Oncogene* 21(57):8732-8740, 2002 của Zhou, H. và các đồng tác giả; Int J Oncol. 24(5):1325-1338, 2004 của Rimon, E. và các đồng tác giả); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; *Int J Cancer.* 118(1):123-128, 2006 của Akcakanat, A. và các đồng tác giả); GD2/GD3/GM2 (Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-1025, 2005 của Livingston, P.O. và các đồng tác giả); gangliosit GD2 (G_{D2}; *"Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen,"* J.Immunol., 151, 3390-3398, (1993) của Saleh và các đồng tác giả); gangliosit GD3 (G_{D3}; *"A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities,"* Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380, (1993) của Shitara và các đồng tác giả); gangliosit GM2 (G_{M2}; *"Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside,"* J. Clin. Oncol. 12:1036-1044, (1994) của Livingston và các đồng tác giả); gangliosit GM3 (G_{M3}; "*Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers,"* Cancer Res. 53:5244-5250, (1993) của Hoon và các đồng tác giả); GICA 19-9 (*"Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, and Pancreatic Carcinoma,"* J. Clin. Immunol. 2:135-140, (1982) của Herlyn và các đồng tác giả); gp100 (*J Immunother.* 29(6):616-27, 2006 của Lotem, M. và các đồng tác giả); Gp37 (kháng nguyên tế bào T bệnh bạch cầu của người; *"Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation and Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, và Ab3),"* J. Immunol. 141:1398-1403, (1988) của Bhattacharya-Chatterjee và các đồng tác giả); gp75 (kháng nguyên u melanin; *"The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product,"* J. Exp. Med. 171(4):1375-1380, (1990) của Vijayasardahl và các đồng

tác giả); gpA33 ("*The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein and A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 94(2):469-474, (1997) của Heath, J.K. và các đồng tác giả; *"Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium,"* Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686, (1997) của Ritter, G. và các đồng tác giả; *"EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia,"* J. Clin. Pathol. 59(3):260-263, (2006) của Wong, N.A. và các đồng tác giả); kháng nguyên HER2 (HER2/neu, $p185^{HER2}$; Semin Oncol. 33(4):386-91, 2006 của Kumar, Pal S và các đồng tác giả); HMFG (kháng nguyên cầu chất béo sữa của người; WO1995015171); virut papilom-E6 của người/virut papilom-E7 của người (*Adv Virus Res.* 66:125-59, 2006 của DiMaio, D. và các đồng tác giả; HMW-MAA (kháng nguyên u melanin phân tử lượng cao; *"Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary and Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 and Its Possible Prognostic Significance,"* Cancer 59:55-63, (1987) của Natali và các đồng tác giả; *"Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibody Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibody,"* J. Clin. Invest. 86:2136-2144, (1990) của Mittelman và các đồng tác giả); kháng nguyên I (kháng nguyên biệt hoá; *"Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins and Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens,"* Nature 314:53-57, (1985) của Feizi); IL13Rα2 (Công bố đơn PCT số WO 2008/146911; "*Glioma IL13Rα2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression and Poor Patient Prognosis,"* PLoS One. 18;8(10):e77769, (2013) của Brown, C.E. và các đồng tác giả; *"High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, and Poor Prognosis,"* Cancer Res. 72(11):2780-2790, (2012) của Barderas, R. và các đồng tác giả; *"IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Rα2,"* J. Immunol. 187(1):561-569, (2011) của Kasaian, M.T. và các đồng tác giả; *"Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ralpha2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas,"* Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621, (2010) của Bozinov, O. và các đồng tác giả; *"A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis,"* Cancer Res. 69(22):8678-8685,

(2009) của Fujisawa, T. và các đồng tác giả); Integrin β6 (Công bố đơn PCT số WO 03/087340); JAM-3 (Công bố đơn PCT số WO 06/084078); KID3 (Công bố đơn PCT số WO 05/028498); KID31 (Công bố đơn PCT số WO 06/076584); kháng nguyên pan-carcinoma KS 1/4 ("*Isolation and Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,*" J. Immunol. 142:3662-3667, (1989) của Perez và các đồng tác giả; *"Bi-specific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes,"* Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216, (1991) của Möller và các đồng tác giả; *Cancer Treat Res.* 123:157-80, 2005 của Ragupathi, G.); L6 và L20 (kháng nguyên caxinoma phổi của người; "*Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma,*" Cancer Res. 46:3917-3923, (1986) của Hellström và các đồng tác giả); LEA; LUCA-2 (Công bố bằng sáng chế Mỹ số 2006/0172349; Công bố đơn PCT số WO 06/083852); M1:22:25:8; M18; M39; MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (*Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84, 2002 của Bodey, B.); MART (*Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82, 2005 của Kounalakis, N. và các đồng tác giả; mesothelin (*"Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers,"* Proc Natl Acad Sci USA 93:136–40, 1996 của Chang K, và Pastan I.), MUC-1 (Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46, 2006 của Mathelin, C.); MUM-1 (*J Cell Physiol.* 182(3):323-31, 2000 của Castelli, C. và các đồng tác giả); Myl; N-axetylglucosaminyltransferaza (*Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34, 1999 của Dennis, J.W.); neoglycoprotein; NS-10 như tìm thấy trong các ađenocaxinoma; OFA-1; OFA-2; Oncostatin M (Oncostatin Receptor Beta; Bằng sáng chế Mỹ số 7,572,896; Công bố đơn PCT số WO 06/084092); p15 (*Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77, 2006 của Gil, J. và các đồng tác giả); p97 (kháng nguyên liên quan đến u melanin; *"Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97,"* J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454, (1989) của Estin và các đồng tác giả); PEM (muxin biểu mô đa hình; *"Cell Membrane-Associated Mucins and Their Adhesion-Modulating Property,"* Trends in Biochem. Sci. 17:359-363, (1992) của Hilkens và các đồng tác giả); PEMA (kháng nguyên muxin biểu mô đa hình); PIPA (Bằng sáng chế Mỹ số 7,405,061; Công bố đơn PCT số WO 04/043239); PSA (kháng nguyên đặc hiệu tiền liệt tuyến; *"cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes,"* Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910,

(1989) của Henttu và các đồng tác giả; "*Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen,*" Cancer Res. 53:227-230, (1993) của Israeli và các đồng tác giả; *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11, 2005 của Cracco, C.M. và các đồng tác giả); PSMA (kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt; *Cancer Treat Res.* 123:157-180, 2005 của Ragupathi, G); phosphat axit tuyến tiền liệt (*"Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone,"* Nucl. Acids Res. 18(16):4928, (1990) của Tailor và các đồng tác giả); R_{24} như tìm thấy trong u melanin; ROR1 (Bằng sáng chế Mỹ số 5,843,749); các sphingolipid; SSEA-1; SSEA-3; SSEA-4; sTn (Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91, 2001 của Holmberg, L.A.); peptit thu được từ thụ thể tế bào T từ u bạch huyết tế bào T ở da (xem *"Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy,"* Cancer J Sci Am. 4:62-71, (1998) của Edelson); T_5A_7 tìm thấy trong các tế bào dạng tuỷ; TAG-72 (*"Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv and Comparison With Other Immunoglobulin Forms,"* Cancer Res. 52:3402-3408, (1992) của Yokota và các đồng tác giả); TL5 (nhóm máu A); thụ thể TNF (thụ thể TNF-α, thụ thể TNF-ß; thụ thể TNF-γ (*Oncologist.* 11(4):397-408, 2006 của van Horssen, R. và các đồng tác giả; *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64, 2000 của Gardnerova, M. và các đồng tác giả); TRA-1-85 (nhóm máu H); thụ thể Transferrin (Bằng sáng chế Mỹ số 7,572,895; Công bố đơn PCT số WO 05/121179); 5T4 (TPBG, glycoprotein dưỡng mạc; *"The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin,"* Int. J. Oncol. 32(1):221-234, (2008) của Boghaert, E.R. và các đồng tác giả; *"Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin,"* Curr. Oncol. Rep. 16:370, (2014) p.p 1-6, của Eisen, T. và các đồng tác giả); TSTA (kháng nguyên cấy ghép đặc hiệukhối u) như các kháng nguyên khối u do cảm ứng virut bao gồm các virut khối u ADN kháng nguyên T và các kháng nguyên vỏ của virut khối u ARN, kháng nguyên ung thư phôialpha-fetoprotein như CEA của kháng nguyên ung thư phôi khối u ruột kết, bàng quang (*"Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas,"* Cancer. Res. 45:2210-2188, (1985) của Hellström và các đồng tác giả); VEGF *("Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls and Helpful Tricks In A Review For Clinicians,"* Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95(3):272-281, (2015) của Pietrantonio, F. và các đồng tác giả; *"Current Management Of Ovarian*

Cancer," Minerva Med. 106(3):151-156, (2015) của Grabowski, J.P.; *"Bevacizumab and Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, and Ongoing Controversies,"* Cancer 121(7):997-1007, (2015) của Field, K.M.; *"Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014,"* J. Gynecol. Oncol. 26(2):156-167, (2015) của Suh, D.H. và các đồng tác giả; *"Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer,"* Tumour Biol. 36(3):1323-1327, (2015) của Liu, K.J. và các đồng tác giả; *"Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer,"* Clin. Interv. Aging 10:127-133, (2015) của Di Bartolomeo, M. và các đồng tác giả); thụ thể VEGF (Oncologist. 11(9):992-998, 2006 của O'Dwyer. P.J.); VEP8; VEP9; VIM-D5; và Y hapten, Le^y như tìm thấy trong các tế bào caxinoma phôi.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết kháng PD-1 theo sáng chế được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phân tử mà gắn kết đặc hiệu với 5T4, B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, VEGF-A, và/hoặc VEGFR2.

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể kết hợp với chất gây miễn dịch như vacxin khối u. Các vacxin này có thể bao gồm các kháng nguyên khối u đã tinh chế (bao gồm các protein tái tổ hợp, các peptit, và các phân tử hydrat cacbon), các tế bào khối u cùng loài hoặc khác loài. Một số chiến lược vacxin khối u đã được mô tả (xem ví dụ, *"Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies,"* Adv. Cancer Res. 95, 115-145, (2006) của Palena, C., và các đồng tác giả; *"Cancer immunotherapy comes of age,"* Nature 480, 480–489, (2011) của Mellman, I., và các đồng tác giả; *"The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides,"* Oncol. Rep. 20, 245–252, (2008) của Zhang, X. M. và các đồng tác giả; *"Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines,"* J. Clin. Oncol. 20, 2624–2632, (2002) của Disis, M. L. và các đồng tác giả; *"Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study."* Int. J. Cancer 131, E670–E680, (2012) của Vermeij, R. và các đồng tác giả). Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể kết hợp với các phác đồ hoá trị liệu. Trong các trường hợp này, có thể giảm liều dùng của

chất hoá trị liệu sử dụng (Cancer Research 58: 5301-5304, (1998) của Mokyr và các đồng tác giả).

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể kết hợp với các phân tử kích thích miễn dịch khác như các kháng thể hoạt hóa đáp ứng miễn dịch ở vật chủ để tạo ra các mức hoạt hóa tế bào T gia tăng. Cụ thể là, các kháng thể kháng PD-1, các kháng thể kháng PD-L1 và/hoặc các kháng thể kháng CTLA-4 đã chứng tỏ là hoạt hóa hệ miễn dịch (xem, ví dụ, *"Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells and Enhances CD28-Dependent Proliferation,"* Eur. J. Immunol 35:3545-3560, (2005) của del Rio, M-L. và các đồng tác giả; *"Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection,"* Nature 439, 682–687, của (2006) Barber, D. L. và các đồng tác giả; *"Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System and Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade,"* Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293–12297, (2002) của Iwai, Y. và các đồng tác giả; *"Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade,"* Science 271, 1734-1736, (1996) của Leach, D. R., và các đồng tác giả). Các phân tử kích thích miễn dịch bổ sung mà có thể kết hợp với các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế bao gồm các kháng thể đối với các phân tử trên bề mặt của các tế bào tua mà hoạt hóa chức năng tế bào tua (DC) và trình diện kháng nguyên, các kháng thể kháng CD40 có khả năng thay thế cho hoạt tính tế bào T hỗ trợ, và hoạt hóa các kháng thể thành các phân tử đồng kích thích tế bào T như PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB, và ICOS (xem, ví dụ *"Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 và Anti-CTLA-4 Antibodies,"* Immunobiology 201:527-40, (2000) của Ito và các đồng tác giả; Bằng sáng chế Mỹ số 5,811,097; *"Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity,"* Immunol 164:2160-2169, (2000) của Weinberg và các đồng tác giả; *"Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors,"* Nature Medicine 3: 682-685, (1997) của Melero và các đồng tác giả; *"ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally and Functionally Related To CD28,"* Nature 397, (1999) của Hutloff và các đồng tác giả: 263-266; và *"The TNFRs OX40, 4-1BB, và CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy,"* Curr Opin Immunol. 2013 Apr; 25(2): 10,1016/j.coi.2013.01,004, (2013) của Moran, A.E. và các đồng tác giả), và/hoặc các thụ thể kháng nguyên khảm kích thích (các **CAR**) chứa miền gắn kết kháng nguyên

nhằm kháng lại kháng nguyên của bệnh được dung hợp với một hoặc nhiều miền tín hiệu nội bào từ các thụ thể protein đồng kích thích khác nhau (ví dụ, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, v.v.) mà có vai trò kích thích tế bào T khi gắn kết kháng nguyên (xem, ví dụ *"Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor,"* Br. J. Haematol. 161:389-401, (2013) của Tettamanti, S. và các đồng tác giả; *"Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia and Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells,"* Blood 123(15): 2343-2354, (2014) của Gill, S. và các đồng tác giả; *"T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions and Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia,"* Blood 122:3138-3148, (2013) của Mardiros, A. và các đồng tác giả; *"Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo,"* Leukemia doi:10,1038/leu.2014.62, (2014) của Pizzitola, I. và các đồng tác giả).

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể kết hợp với các thụ thể kháng nguyên khảm ức chế (các iCAR) để làm chệch đích các đáp ứng trị liệu miễn dịch. Các iCAR miền gắn kết kháng nguyên nhằm kháng lại kháng nguyên của bệnh được dung hợp với một hoặc nhiều miền tín hiệu nội bào từ các thụ thể protein ức chế khác nhau (ví dụ, CTLA-4, PD-1, v.v.) có vai trò hạn chế các đáp ứng tế bào T khi gắn kết kháng nguyên (xem, ví dụ *"PD-1– and CTLA-4–Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses,"* Sci. Tranl. Med. 5:215ra172 doi:10,1126/ scitranslmed.3006597, (2013) của Fedorov V.D..

Cụ thể là, các phân tử gắn kết kháng PD-1 theo sáng chế được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng CD137, kháng thể kháng CTLA-4, kháng thể kháng OX40, kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng TIGIT, kháng thể kháng TIM-3 và/hoặc vacxin ung thư.

B. Ứng dụng chẩn đoán và chẩn đoán trị liệu

Một số phân tử gắn kết PD-1 nhất định theo sáng chế thể hiện rất ít hoặc không thể hiện khả năng phong bế gắn kết giữa PD-1 và phối tử PD-1L. Do đó, các kháng thể PD-1 mAb 2 và PD-1 mAb 4, dẫn xuất được làm giống như của người của chúng, và các phân tử bao gồm mảnh gắn kết PD-1 của chúng (ví dụ, kháng thể thể đôi đặc hiệu

kép, v.v.) hoặc các phân tử cạnh tranh để gắn kết với các kháng thể này có thể được đánh dấu để phát hiện (ví dụ, bằng các nhóm có hoạt tính phóng xạ, enzym, huỳnh quang, phát quang hoá học, thuận từ, nghịch từ, hoặc các nhóm đánh dấu khác) và được sử dụng để phát hiện PD-1 trong các mẫu hoặc trong chụp ảnh PD-1 trên các tế bào. Do các phân tử này không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của PD-1, các phân tử này cụ thể là hữu ích trong các phương pháp xác định mức độ, vị trí và thay đổi biểu hiện PD-1 ở các đối tượng (ví dụ, các đối tượng đang điều trị bệnh ung thư kết hợp với biểu hiện hoặc nhắm đích PD-1).

XII. Các dược phẩm

Các chế phẩm theo sáng chế bao gồm các chế phẩm thuốc nguyên liệu hữu ích trong sản xuất các dược phẩm (ví dụ, các chế phẩm chưa tinh khiết hoặc không vô khuẩn) và các dược phẩm (nghĩa là, các chế phẩm mà thích hợp để sử dụng cho đối tượng hoặc bệnh nhân) mà có thể được sử dụng trong việc bào chế các dạng phân liều đơn vị. Các chế phẩm này bao gồm lượng hữu hiệu phòng bệnh hoặc trị liệu của các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế, hoặc kết hợp các chất này và chất mang dược dụng. Tốt hơn là, các chế phẩm theo sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu phòng bệnh hoặc trị liệu của các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế và chất mang dược dụng. Sáng chế cụ thể bao gồm các dược phẩm này trong đó phân tử gắn kết PD-1 là: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, hoặc PD-1 mAb 15; PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15 được làm giống như của người; mảnh gắn kết PD-1 của kháng thể bất kỳ này; hoặc trong đó phân tử gắn kết PD-1 là kháng thể thể đôi PD-1 đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3). Đặc biệt là bao gồm các phân tử mà bao gồm 3 CDR_L và 3 CDR_H của kháng thể PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15; PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1

mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15 được làm giống như của người.

Sáng chế cũng bao gồm các dược phẩm mà còn bao gồm kháng thể trị liệu thứ hai (ví dụ, kháng thể đơn dòng đặc hiệu khối u) mà đặc hiệu đối với kháng nguyên ung thư cụ thể, và chất mang dược dụng.

Theo phương án cụ thể, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là được cấp phép bởi cơ quan quản lý Liên bang hoặc chính quyền bang hoặc có trong Dược Điển Mỹ hoặc các dược điển được công nhận nói chung khác, để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người. Thuật ngữ "chất mang" chỉ chất pha loãng, chất phụ trợ, (ví dụ, chất phụ trợ Freund (toàn vẹn và không toàn vẹn), tá dược, hoặc chất dẫn mà các trị liệu được sử dụng cùng với các chất này. Các chất mang dược dụng này có thể là chất lỏng vô khuẩn, như nước và các dầu, bao gồm dầu có nguồn gốc dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu nành, dầu khoáng, dầu vừng và dầu tương tự. Nước là chất mang được ưu tiên khi dược phẩm này được sử dụng qua đường tĩnh mạch. Các dung dịch nước muối và các dung dịch dextroza trong nước và glyxerol cũng có thể được sử dụng làm các chất mang lỏng, cụ thể là cho các dung dịch tiêm. Các tá dược dược dụng thích hợp bao gồm tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, gelatin, mạch nha, gạo, bột mì, đá phấn, silica gel, natri stearat, glyxerol monostearat, bột talc, natri clorua, sữa tách kem đã làm khô, glyxerol, propylen, nước, etanol và tá dược tương tự. Chế phẩm này, nếu muốn, cũng có thể có chứa các lượng nhỏ cách chất thấm ướt hoặc nhũ hoá, hoặc các chất đệm pH. Các chế phẩm này có thể có dạng dung dịch, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, bột, chế phẩm giải phóng kéo dài và chế phẩm tương tự.

Nói chung, các thành phần của các chế phẩm theo sáng chế được cung cấp dưới dạng riêng rẽ hoặc phối trộn với nhau trong dạng phân liều đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột đông khô hoặc cô đặc không có nước trong bao bì đóng kín như là ống thuốc tiêm hoặc dạng túi nhỏ chỉ rõ lượng hoạt chất. Khi chế phẩm này được sử dụng bằng cách tiêm truyền, chế phẩm có thể được phân phát cùng với chai dịch truyền có chứa nước hoặc nước muối loại dược dụng vô khuẩn. Khi chế phẩm này được sử dụng bằng cách tiêm, có thể cung cấp ống thuốc tiêm nước muối hoặc nước vô khuẩn để tiêm sao cho các thành phần có thể phối trộn trước khi sử dụng.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới các dạng trung tính hoặc muối. Các muối dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở các muối được tạo thành với các anion như là các muối thu được từ axit clohyđric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, v.v., và các muối được tạo thành với các cation như các muối thu được từ natri, kali, amoni, canxi, hydroxit sắt, isopropylamin, trietylamin, 2-etylamino etanol, histidin, procain, v.v.

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit hoặc hộp dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật đựng chứa phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế (và tốt hơn nữa là, kháng thể PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15; PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15 được làm giống như của người; mảnh gắn kết PD-1 của kháng thể bất kỳ này; hoặc trong đó phân tử gắn kết PD-1 là kháng thể thể đôi PD-1 đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3)). Đặc biệt là bao gồm các phân tử bao gồm 3 CDR_L và 3 CDR_H của PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 hoặc PD-1 mAb 15, đơn độc hoặc với chất mang dược dụng. Ngoài ra, một hoặc nhiều chất phòng bệnh hoặc trị liệu khác hữu ích để điều trị bệnh cũng có thể được bao gồm trong hộp hoặc bộ kit dược phẩm này. Sáng chế cũng đề xuất hộp hoặc bộ kit dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật đựng được đóng gói một hoặc nhiều thành phần của các dược phẩm theo sáng chế. Được tuỳ ý kết hợp với (các) vật đựng này có thể thông báo theo mẫu quy định của cơ quan chính phủ quản lý việc sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán các dược phẩm hoặc sinh phẩm, thông báo này là cấp phép lưu hành của cơ quan quản lý sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán để sử dụng cho người.

Sáng chế đề xuất các bộ kit có thể sử dụng trong các phương pháp nêu trên. Bộ kit có thể bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế. Bộ kit này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều chất phòng bệnh và/hoặc trị liệu khác hữu ích để điều trị bệnh ung thư, trong một hoặc nhiều vật đựng; và/hoặc bộ kit này còn bao

gồm một hoặc nhiều kháng thể độc tính tế bào mà gắn kết một hoặc nhiều kháng nguyên ung thư kèm theo bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, chất phòng bệnh và/hoặc trị liệu khác này là chất hoá trị liệu. Theo các phương án khác, chất phòng bệnh và/hoặc trị liệu chất hoá trị liệu sinh học hoặc hormon.

XIII. Các phương pháp sử dụng

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp để điều trị, điều trị dự phòng, và cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng có kèm theo một bệnh, rối loạn bệnh hoặc bệnh nhiễm khuẩn bằng cách sử dụng cho một đối tượng lượng hữu hiệu của protein dung hợp hoặc phân tử được tiếp hợp theo sáng chế, hoặc dược phẩm bao gồm protein dung hợp hoặc phân tử được tiếp hợp theo sáng chế. Theo một khía cạnh được ưu tiên, các chế phẩm này về cơ bản được tinh chế (nghĩa là, về cơ bản không có các chất mà hạn chế tác dụng của nó hoặc gây các tác dụng phụ không mong muốn). Theo phương án cụ thể, đối tượng này là động vật, tốt hơn là động vật có vú, như động vật không phải động vật linh trưởng (ví dụ, loài bò, loài ngựa, loài mèo, loài chó, loài gặm nhấm, v.v.) hoặc động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ, như khỉ cynomolgus, người, v.v.). Theo phương án được ưu tiên, đối tượng này là người.

Nhiều loại hệ chuyển vận là đã biết và có thể được sử dụng để dùng các chế phẩm theo sáng chế, ví dụ, đóng nang trong các liposom, các vi hạt, các vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện kháng thể hoặc protein dung hợp, nhập nội bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,"* J. Biol. Chem. 262:4429-4432, (1987) của Wu và các đồng tác giả), tạo cấu trúc axit nucleic như một phần của retrovirut hoặc vật truyền khác, v.v.

Các phương pháp sử dụng phân tử theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng qua đường ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong da, trong bắp cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), trên màng cứng, và qua niêm mạc (ví dụ, các đường dùng trong mũi và qua đường miệng). Theo phương án cụ thể, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế được sử dụng qua đường trong bắp cơ, trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Các chế phẩm có thể được sử dụng qua đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm truyền hoặc tiêm liều cao, bằng cách hấp thu qua màng biểu mô hoặc niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v) và có thể được sử dụng

cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng qua đường phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng máy xông hoặc máy phun mù, và được chế tạo với chất tạo sol khí. Xem, ví dụ, các Bằng sáng chế Mỹ số 6,019,968; 5,985, 320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; và 4,880,078; và các Công bố đơn PCT số WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; và WO 99/66903, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế được đóng gói trong bao bì hàn kín như ống thuốc tiêm hoặc dạng túi nhỏ chỉ rõ lượng của phân tử này. Theo một phương án, các phân tử này được cung cấp dưới dạng bột đông khô nhanh đã tiệt khuẩn hoặc dạng cô đặc không có nước trong bao bì hàn kín và có thể được hoàn nguyên lại, ví dụ, bằng nước hoặc nước muối đến nồng độ sử dụng thích hợp cho một đối tượng. Tốt hơn là, các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế được cung cấp dưới dạng bột đông khô nhanh vô khuẩn trong bao bì hàn kín.

Các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế đã được làm đông khô nên được bảo quản trong khoảng nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong bao bì gốc của chúng và các phân tử này phải được sử dụng trong vòng 12 giờ, tốt hơn là trong vòng 6 giờ, trong vòng 5 giờ, trong vòng 3 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ sau khi đã được hoàn nguyên lại. Theo một phương án khác, các phân tử này được cung cấp dưới dạng lỏng trong bao bì hàn kín chỉ rõ lượng và nồng độ của phân tử, protein dung hợp, hoặc phân tử được tiếp hợp này. Tốt hơn là, các phân tử gắn kết PD-1 khi được cung cấp ở dạng lỏng, được cung cấp trong bao bì hàn kín.

Lượng chế phẩm theo sáng chế mà hữu hiệu trong điều trị, phòng ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng kèm theo một rối loạn bệnh có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng chuẩn. Liều dùng chính xác sẽ sử dụng trong chế phẩm sẽ tuỳ thuộc vào đường dùng, và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh này, và phải được quyết định theo suy xét của bác sỹ hành nghề và tình trạng của từng bệnh nhân. Có thể ngoại suy các liều dùng hữu hiệu từ các đường cong liều dùng-đáp ứng thu được từ các hệ thử nghiệm mô hình in vitro hoặc ở động vật.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lượng hữu hiệu" của dược phẩm, theo một phương án, là lượng đủ để có kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm, không giới

hạn ở, các kết quả lâm sàng, như làm thuyên giảm các triệu chứng do bệnh, giảm nhẹ triệu chứng nhiễm khuẩn (ví dụ, tải lượng virut, sốt, đau, nhiễm khuẩn huyết, v.v.) hoặc triệu chứng của bệnh ung thư (ví dụ, tăng sinh tế bào ung thư, có mặt khối u, di căn khối u, v.v.), nhờ đó làm tăng chất lượng cuộc sống của các đối tượng mắc bệnh này, giảm liều dùng của các thuốc khác cần thiết để điều trị bệnh này, tăng cường tác dụng của một thuốc khác thông qua sự nhắm đích và/hoặc nhập nội, làm chậm tiến triển của bệnh này, và/hoặc kéo dài thời gian sống của các cá thể.

Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều lần. Đối với các mục đích của sáng chế, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm là lượng đủ để làm giảm sự tăng sinh (hoặc tác động của) sự có mặt virut và làm giảm và/hoặc làm chậm phát triển bệnh do virut, trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm có thể hoặc không thể đạt được khi kết hợp với một thuốc, hợp chất hoặc dược phẩm khác. Do đó, "lượng hữu hiệu" có thể được xem xét trong tình huống sử dụng một hoặc nhiều chất hoá trị liệu, và đơn chất có thể được coi là được cho dùng ở lượng hữu hiệu nếu kết hợp với một hoặc nhiều chất khác, có thể hoặc đạt được kết quả mong muốn. Trong khi nhu cầu của cá thể là khác nhau, việc xác định các khoảng tối ưu của lượng hữu hiệu của mỗi thành phần là thuộc chuyên môn của lĩnh vực này.

Đối với các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế, liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân tốt hơn là được xác định theo trọng lượng cơ thể của đối tượng nhận này. Đối với các phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế, liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân thông thường ít nhất là khoảng 0,01 μg/kg, ít nhất là khoảng 0,05 μg/kg, ít nhất là khoảng 0,1 μg/kg, ít nhất là khoảng 0,2 μg/kg, ít nhất là khoảng 0,5 μg/kg, ít nhất là khoảng 1 μg/kg, ít nhất là khoảng 2 μg/kg, ít nhất là khoảng 5 μg/kg, ít nhất là khoảng 10 μg/kg, ít nhất là khoảng 20 μg/kg, ít nhất là khoảng 50 μg/kg, ít nhất là khoảng 0,1 mg/kg, ít nhất là khoảng 1 mg/kg, ít nhất là khoảng 3 mg/kg, ít nhất là khoảng 5 mg/kg, ít nhất là khoảng 10 mg/kg, ít nhất là khoảng 30 mg/kg, ít nhất là khoảng 50 mg/kg, ít nhất là khoảng 75 mg/kg, ít nhất là khoảng 100 mg/kg, ít nhất là khoảng 125 mg/kg, ít nhất là khoảng 150 mg/kg trọng lượng cơ thể của đối tượng này hoặc cao hơn.

Liều lượng và tần suất sử dụng phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể giảm đi hoặc thay đổi bằng cách tăng cường cho phân tử này hấp thu và thâm nhập vào mô bằng các cải biến, như, ví dụ, quá trình lipit hoá.

Liều lượng của phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân có thể được tính toán để sử dụng như liệu pháp đơn chất. Theo cách khác, phân tử này có thể được sử dụng kết hợp với các chế phẩm trị liệu khác và liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân là thấp hơn khi phân tử được sử dụng như liệu pháp đơn chất.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng tại chỗ lên vùng cần điều trị; có thể đạt được bằng cách, ví dụ, và không giới hạn ở, tiêm truyền tại chỗ, bằng cách tiêm, hoặc thông qua vật cấy, vật cấy này là bằng chất liệu rỗng xốp, không rỗng xốp hoặc gelatin, bao gồm các màng, như các màng Silastic, hoặc các sợi. Tốt hơn là, khi sử dụng phân tử theo sáng chế, lưu ý sử dụng các chất liệu mà phân tử này không hấp thu.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được chuyển vận trong bọng nang, cụ thể là liposom (Xem *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533, (1990) của Langer); trong LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE VÀ CANCER, Lopez-Berestein và Fidler (biên tập), Liss, New York, pp. 353-365 (1989), của Treat và các đồng tác giả; Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327).

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được chuyển vận trong hệ giải phóng có kiểm soát hoặc hệ giải phóng kéo dài. Kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để sản xuất chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm một hoặc nhiều phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế. Xem, ví dụ, Bằng sáng chế Mỹ số 4,526,938; Công bố đơn PCT số WO 91/05548; Công bố đơn PCT số WO 96/20698; *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, (1996) của Ning và các đồng tác giả; *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, (1995) của Song và các đồng tác giả; *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, (1997) của Cleek và các đồng tác giả; và *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, (1997) Lam và các đồng tác giả, mỗi tài liệu

này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng trong hệ giải phóng có kiểm soát (Xem tài liệu của Langer, nêu trên; *"Implantable Pumps,"* CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240, (1987) của Sefton; *"Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,"* Surgery 88:507-516, (1980) của Buchwald và các đồng tác giả; và *"A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,"* N. Engl. J. Med. 321:574-579, (1989) của Saudek và các đồng tác giả). Theo một phương án khác, nguyên liệu polyme có thể được sử dụng để đạt được sự giải phóng có kiểm soát của các phân tử (xem ví dụ, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer và Wise (biên tập), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen và Ball (biên tập), Wiley, New York (1984); *"Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate,"* Science 228:190-192 (1985) của Levy và các đồng tác giả; *"Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization,"* Ann. Neurol. 25:351-356, (1989) của During và các đồng tác giả; *"Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits,"* J. Neurosurg. 7(1):105-112), (1989) của Howard và các đồng tác giả; Bằng sáng chế Mỹ số 5,679,377; Bằng sáng chế Mỹ số 5,916,597; Bằng sáng chế Mỹ số 5,912,015; Bằng sáng chế Mỹ số 5,989,463; Bằng sáng chế Mỹ số 5,128,326; Công bố đơn PCT số WO 99/15154; và Công bố đơn PCT số WO 99/20253). Ví dụ về các polyme được sử dụng trong các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm, nhưng không giới hạn ở, poly(2-hydroxy etyl metacrylat), poly(metyl metacrylat), poly(axit acrylic), poly(etylen-co-vinyl axetat), poly(axit metacrylic), polyglycolit (PLG), polyanhydrit, poly(N-vinylpyrolidon), poly(vinyl alcohol), polyacrylamit, poly(etylen glycol), polylactit (PLA), poly(lactit-co-glycolit) (PLGA), và polyorthoeste. Hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở gần đích trị liệu (ví dụ, phổi), do đó chỉ cần đến một phần của liều dùng toàn thân (xem, ví dụ, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, nêu trên, tập 2, các trang 115-138 (1984) của Goodson). Các chế phẩm polyme hữu ích để làm chế phẩm cấy giải phóng có kiểm soát có thể được sử dụng theo Dunn và các đồng tác giả (Xem Bằng sáng chế Mỹ số 5,945,155). Phương pháp cụ thể này là dựa trên tác dụng trị liệu của việc giải phóng có kiểm soát in situ chất có hoạt tính sinh học từ hệ

polyme. Có thể cấy ở vị trí bất kỳ trong cơ thể của bệnh nhân cần điều trị trị liệu. Hệ chuyển vận kéo dài không phải polyme có thể được sử dụng, trong đó chế phẩm cấy không phải polyme trong cơ thể của đối tượng được sử dụng dưới dạng hệ thống chuyển vận thuốc. Khi cấy vào cơ thể, dung môi hữu cơ của chế phẩm cấy sẽ tiêu tan, khuếch tán hoặc rò rỉ từ chế phẩm này vào dịch mô xung quanh, và vật liệu không phải polyme sẽ từ từ đông tụ hoặc kết tủa để tạo thành chất nền rỗng li ti, dạng rắn (xem Bằng sáng chế Mỹ số 5,888,533).

Các hệ giải phóng có kiểm soát được tổng kết bởi Langer (1990, "*New Methods Of Drug Delivery,*" Science 249:1527-1533). Kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để sản xuất các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm một hoặc nhiều chất trị liệu theo sáng chế. Xem, ví dụ, Bằng sáng chế Mỹ số 4,526,938; Công bố đơn PCT số WO 91/05548 và WO 96/20698; *"Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, (1996) của Ning và các đồng tác giả; *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397 (1995) của Song và các đồng tác giả; *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 (1997) của Cleek và các đồng tác giả; và *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, (1997) của Lam và các đồng tác giả, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Trong trường hợp chế phẩm theo sáng chế là axit nucleic mã hoá phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế, axit nucleic này có thể được sử dụng in vivo để thúc đẩy sự biểu hiện của phân tử gắn kết PD-1 đã mã hoá của nó, bằng cách cấu tạo axit nucleic này như là một phần của vật truyền biểu hiện axit nucleic thích hợp và sử dụng nó sao cho nó trở thành nội bào, ví dụ, bằng cách sử dụng vật truyền retrovirut (xem Bằng sáng chế Mỹ số 4,980,286), hoặc bằng cách tiêm trực tiếp, hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật bắn phá bằng vi hạt (ví dụ, súng bắn gen; Biolistic, Dupont), hoặc bao phủ bằng các lipit hoặc các thụ thể bề mặt tế bào hoặc các tác nhân chuyển nhiễm, hoặc bằng cách sử dụng nó ở dạng liên kết với các peptit tương tự homeobox mà đã biết là đi vào nhân tế bào (xem

ví dụ, *"Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis,"* Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868, (1991) của Joliot và các đồng tác giả), v.v. Theo cách khác, axit nucleic có thể được đưa vào bên trong tế bào và được hợp nhất vào ADN của tế bào chủ để biểu hiện bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

Việc điều trị cho đối tượng bằng lượng hữu hiệu trị bệnh hoặc phòng bệnh của phân tử gắn kết PD-1 theo sáng chế có thể bao gồm điều trị một lần hoặc, tốt hơn là, có thể bao gồm nhiều lần điều trị. Trong một ví dụ được ưu tiên, đối tượng được điều trị bằng kháng thể thể đôi một lần/tuần trong khoảng từ 1 đến 10 tuần, tốt hơn là trong khoảng từ 2 đến 8 tuần, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 3 đến 7 tuần, và tốt hơn nữa là trong khoảng 4, 5, hoặc 6 tuần. Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một lần/ngày, hai lần/ngày hoặc ba lần/ngày. Theo cách khác, các dược phẩm có thể được sử dụng một lần/tuần, hai lần/tuần, hai tuần một lần, một lần/tháng, sáu tuần một lần, hai tháng một lần, hai lần/năm hoặc một lần/năm. Cũng nên hiểu là liều lượng hữu hiệu của các phân tử được sử dụng để điều trị có thể gia tăng hoặc giảm đi trong một đợt điều trị cụ thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây minh hoạ các phương pháp khác nhau cho các chế phẩm trong các phương pháp chẩn đoán hoặc điều trị theo sáng chế. Các ví dụ này là nhằm để minh hoạ, mà không theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Xác định đặc tính các kháng thể kháng PD-1 của người đơn dòng

15 kháng thể đơn dòng của chuột được phân lập là có khả năng gắn kết đặc hiệu cả PD-1 của khỉ cynomolgus và PD-1 của người, và được ký hiệu là "PD-1 mAb 1," "PD-1 mAb 2," "PD-1 mAb 3," "PD-1 mAb 4," "PD-1 mAb 5," "PD-1 mAb 6," "PD-1 mAb 7," "PD-1 mAb 8," "PD-1 mAb 9," "PD-1 mAb 10," "PD-1 mAb 11," "PD-1 mAb 12," "PD-1 mAb 13," "PD-1 mAb 14," và "PD-1 mAb 15." Các CDR của các kháng thể này được xác định là khác nhau và được đề cập ở trên. Khả năng gắn kết với miền ngoại bào của PD-1 của khỉ cynomologus và của người được đánh giá như sau, các đĩa 96-giếng maxisorb đáy phẳng được phủ bằng PD-1 của khỉ cynomolgus hoặc PD-1 của người hoà tan (miền ngoại bào của PD-1 của người được dung hợp với đuôi His (shPD-

1 His) hoặc với vùng Fc của người (shPD-1 hFc), hoặc miền ngoại bào của PD-1 của khỉ cynomolgus được dung hợp với vùng Fc của người (scyno-PD1 Fc)), mỗi miền ở nồng độ 0,5 hoặc 1 µg/mL, rửa các đĩa và ủ với một trong số các kháng thể kháng PD-1 đã phân lập PD-1 mAb từ 1 đến 15. Đối với các nghiên cứu này, các kháng thể kháng PD-1 được sử dụng ở nồng độ 3, 1,0, 0,3333, 0,1111, 0,0370, 0,0123, hoặc 0,0041 µg/mL (các dung dịch pha loãng theo bậc ba lần). Lượng kháng thể gắn kết với PD-1 cố định (của người hoặc của khỉ cynomolgus) được đánh giá bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp của dê kháng IgG-HRP của chuột. Tất cả các mẫu được phân tích trên thiết bị đọc đĩa (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Các đường cong gắn kết đại diện đối với PD-1 của khỉ cynomolgus hoà tan và PD-1 của người hoà tan được thể hiện tương ứng trong Fig.7A-Fig.7D và Fig.8A-Fig.8C.

Các kết quả của thử nghiệm gắn kết này (Fig.7A-Fig.7D và Fig.8A-Fig.8C) chứng tỏ là tất cả các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb từ 1 đến 15 gắn kết với cả PD-1 của khỉ cynomolgus hoà tan và PD-1 của người hoà tan.

Để xác định đặc tính thêm các kháng thể kháng PD-1 của chuột, khả năng phong bế gắn kết của PD-L1 của người để hoà tan với PD-1 của người hoà tan của chúng được đánh giá trong hai thử nghiệm khác nhau. Trong một thử nghiệm, xét nghiệm khả năng của các kháng thể để phong bế gắn kết của PD-1 của người với PD-L1 được cố định trên bề mặt. Đối với thử nghiệm này, mỗi kháng thể trong số các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb từ 1 đến 15, hoặc kháng thể kháng PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A) được trộn với protein dung hợp shPD-1 His, (ở 2,5 µg/mL) và được ủ riêng rẽ với PD-L1 của người hoà tan được đánh dấu bằng biotin (miền ngoại bào của PD-L1 được dung hợp với Fc (sPD-L1)) của người ở nồng độ 1 µg/mL được cố định trên đĩa được phủ streptavidin. Đối với các nghiên cứu này, các kháng thể kháng PD-1 được sử dụng ở nồng độ 10, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, hoặc 0,1563 µg/mL (các dung dịch pha loãng theo bậc hai lần). Lượng shPD-1 His gắn kết với sPD-L1 đã cố định được đánh giá thông qua đuôi His bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng đuôi His-HRP. Tất cả các mẫu được phân tích trên thiết bị đọc đĩa (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.9A-Fig.9D.

Các kết quả của các thử nghiệm ức chế này (Fig.9A-Fig.9D) chứng tỏ rằng các kháng thể kháng PD 1: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1

mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, và PD-1 mAb 15, có thể phong bế gắn kết của PD-L1 của người hoà tan với PD-1 của người để hoà tan PD-1 của người ở các mức độ khác nhau trong khi PD-1 mAb 2 và PD-1 mAb 4 thể hiện từ rất ít cho đến không có hoạt tính phong bế theo cách thức thử nghiệm này.

Trong thử nghiệm thứ hai, xét nghiệm khả năng của các kháng thể kháng PD-1 của chuột PD-1 mAb từ 1 đến 15 để phong bế gắn kết của phối tử PD-1 (nghĩa là, PD-L1 của người hoặc PD-L2 của người) với PD-1 được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào NSO. Đối với thử nghiệm này, mỗi kháng thể trong số các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb từ 1 đến 15, hoặc kháng thể kháng PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A hoặc PD-1 mAb B) được trộn riêng rẽ với PD-L1 của người hoà tan được biotin hoá (protein dung hợp shPD-L1) hoặc PD-L2 của người hoà tan được biotin hoá protein dung hợp muIgFc (shPD-L2; Ancell Cat# 573-030), mỗi kháng thể ở 0,1 µg/thử nghiệm, và ủ với các tế bào NSO biểu hiện PD-1 của người (khoảng 250.000 tế bào/giếng) trong dịch đệm phong bế (FACS + 10% albumin huyết thanh của người). Đối với các nghiên cứu này, các kháng thể kháng PD-1 được sử dụng ở nồng độ 4,0, 1,0, 2,5 $x10^{-1}$, 6,25 x 10^{-2}, 1,56 x 10^{-2}, 3,90 x 10^{-3}, 9,76 x 10^{-4}, 2,4 x 10^{-4}, 0,6 x 10^{-4} µg/thử nghiệm (dung dịch pha loãng theo bậc bốn lần). Lượng của shPD-L1 (hoặc shPD-L2) gắn kết với bề mặt của các tế bào NSO được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp Streptavidin được tiếp hợp PE bằng cách phân tích FACS. Các giá trị IC50 để ức chế gắn kết PD-1/PD-L1 được xác định và giá trị trung bình mẫu ($\bar{x}$) của ít nhất hai thử nghiệm được đề cập (trừ khi có chỉ dẫn khác) trong bảng 6.

Bảng 6

Kháng thể kháng PD-1	IC50 (µg/thử nghiệm)		Kháng thể kháng PD-1	IC50 (µg/thử nghiệm)
PD-1 mAb A	0,0044		PD-1 mAb 8	0,6611 ‡
PD-1 mAb B	0,0064		PD-1 mAb 9	0,0154
PD-1 mAb 1	0,0048		PD-1 mAb 10	0,0057
PD-1 mAb 2	0,0110		PD-1 mAb 11	0,0259 ‡
PD-1 mAb 3	0,0361 ‡		PD-1 mAb 12	0,0238 ‡
PD-1 mAb 4	0,0156 ‡		PD-1 mAb 13	0,0117
PD-1 mAb 5	0,0039		PD-1 mAb 14	0,0149 ‡
PD-1 mAb 6	0,0051		PD-1 mAb 15	0,0060
PD-1 mAb 7	0,0024			

‡ Các kết quả từ thử nghiệm duy nhất

Các kết quả của các thử nghiệm ức chế shPD-L1 (Bảng 6) chứng tỏ rằng các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, và PD-1 mAb 15, có thể phong bế gắn kết của PD-L1 của người với PD-1 của người được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào NSO. Cụ thể là, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 10, và PD-1 mAb 15 phong bế gắn kết shPD-L1 tốt như hoặc tốt hơn các kháng thể PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B), trong khi PD-1 mAb 8 gần như không bế theo cách thức thử nghiệm này. PD-1 mAb 2 và PD-1 mAb 4 đều có thể phong bế gắn kết PD-1/PD-L1 theo cách thức thử nghiệm này.

Tương tự, các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, và PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, có thể phong bế gắn kết của PD-L2 của người với PD-1 của người được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào NSO, trong khi PD-1 mAb 8 gần như không bế theo cách thức thử nghiệm này. Cụ thể là, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, và PD-1 mAb 10 phong bế gắn kết shPD-L2 tốt như, hoặc tốt hơn các kháng thể PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B). Các kháng thể PD-1 PD-1 mAb 11 và PD-1 mAb 15 không được thử nghiệm trong thử nghiệm này. Các kết quả cho một vài các kháng thể kháng PD-1 được làm giống như của người bao gồm hPD-1 mAb 15 được đề xuất dưới đây.

Ví dụ 2

Quá trình làm giống như của người và xác định đặc tính thêm

Các miền biến đổi của các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 được làm giống như của người, trong đó các epitop kháng nguyên được xác định, các kháng thể còn được khử miễn dịch để tạo ra các miền biến đổi được làm giống như của người cuối cùng. Quá trình làm giống như của người PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, và PD-1 mAb 15 tạo ra một miền VH được làm giống như của người và một miền VL được làm giống như của người đối với mỗi kháng thể được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 1 VH1," và "hPD-1 mAb 1 VL1;" "hPD-1 mAb 2 VH1," và "hPD-1 mAb 2 VL1;" và "hPD-1 mAb 15 VH1," và "hPD-1 mAb 15 VL1." Quá trình làm giống như của người PD-1 mAb 7 tạo ra 2 miền VH được

làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 7 VH1," và "hPD-1 mAb 7 VH2," và ba miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 1 VL1," "hPD-1 mAb 7 VL2," và "hPD-1 mAb 7 VL3." Quá trình làm giống như của người PD-1 mAb 9 tạo ra hai miền VH được làm giống như của người, được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 9 VH1," và "hPD-1 mAb 9 VH2," và hai miền VL được làm giống như của người được ký hiệu trong bản mô tả này là "hPD-1 mAb 9 VL1" và "hPD-1 mAb 1 VL2." Trong trường hợp nhiều miền biến đổi được làm giống như của người được tạo ra, các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm giống như của người của một kháng thể kháng PD-1 cụ thể (ví dụ, PD-1 mAb 7) có thể được sử dụng theo tổ hợp bất kỳ và các tổ hợp cụ thể của các chuỗi được làm giống như của người được gọi bằng cách dẫn chiếu đến các miền VH/VL cụ thể, ví dụ kháng thể được làm giống như của người bao gồm hPD-1 mAb 7 VH1 và hPD-1 mAb 7 VL2 được gọi cụ thể là "hPD-1 mAb 7(1.2)." Các kháng thể được làm giống như của người có độ dài đầy đủ được tạo ra với vùng hằng định của IgG1 của người bao gồm các thay thế L234A/L235A (IgG1 (AA)) hoặc với vùng hằng định của IgG4 bao gồm thay thế S228P (IgG4 (P)).

Các chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người IgG1 có độ dài đầy đủ được tạo cấu trúc như sau: đầu tận cùng C của miền VH được làm giống như của người được dung hợp với đầu tận cùng N của vùng hằng định IgG1 của người có miền CH2-CH3 biến thể (bao gồm các thay thế L234A/L235A (AA)) và thiếu gốc lysin đầu tận cùng C (SEQ ID NO:255):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPE**AA**GG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

Trong SEQ ID NO:255, các gốc axit amin từ 1 đến 98 tương ứng với miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO: 10), các gốc axit amin từ 99 đến 113 tương ứng với vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO: 32) và các gốc axit amin từ 114 đến 329 tương ứng với miền

CH2-CH3 của IgG1 bao gồm các thay thế L234A/L235A (được gạch chân) (SEQ ID NO:5) nhưng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được làm giống như của người được lấy làm ví dụ ((hPD-1 mAb 7(1.2)) có vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 bao gồm đột biến L234A/L235A và thiếu gốc lysin đầu tận cùng C là (SEQ ID NO:265):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPE**AA**GGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

Trong SEQ ID NO: 265, các gốc axit amin từ 1 đến 119 tương ứng với miền VH của hPD-1 mAb 7 VH1 (SEQ ID NO: 147), các gốc axit amin từ 120 đến 217 tương ứng với miền CH1 của IgG1 (SEQ ID NO: 10), các gốc từ 218 đến 232 tương ứng với vùng bản lề của IgG1 (SEQ ID NO: 32) và các gốc từ 233 đến 448 tương ứng với miền CH2-CH3 của IgG1 bao gồm các thay thế L234A/L235A (được gạch chân) (SEQ ID NO:5) nhưng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.

Các chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người IgG4 độ dài đầy đủ được tạo cấu trúc như sau: đầu tận cùng C của miền VH được làm giống như của người được dung hợp với đầu tận cùng N của vùng hằng định IgG4 của người có vùng bản lề được làm ổn định (bao gồm thay thế S228P) và thiếu gốc lysin đầu tận cùng C (SEQ ID NO:256):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCP**P**CP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

Trong SEQ ID NO:256, các gốc axit amin từ 1 đến 98 tương ứng với miền CH1 của IgG4 (SEQ ID NO:254), các gốc axit amin tử 99 đến 110 tương ứng với vùng bản lề IgG4 được làm ổn định bao gồm các thay thế S228P (được gạch chân) (SEQ ID NO: 13) và các gốc axit amin từ 111 đến 326 tương ứng với miền CH2-CH3 của IgG4 (SEQ ID NO:4) nhưng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người đươc lấy làm ví dụ ((hPD-1 mAb 7(1.2)) có vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 chứa vùng bản lề được làm ổn định có đột biến S228P và thiếu gốc lysin đầu tận cùng C là (SEQ ID NO:266):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTKTY
TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCP**P**CPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

Trong SEQ ID NO:266, các gốc axit amin từ 1 đến 119 tương ứng với miền VH của hPD-1 mAb 7 VH1 (SEQ ID NO:147), các gốc axit amin từ 120 đến 217 tương ứng với miền CH1 của IgG4 (SEQ ID NO:254), các gốc axit amin từ 218 đến 229 tương ứng với miền bản lề IgG4 được làm ổn định bao gồm các thay thế S228P (được gạch chân) (SEQ ID NO:13) và các gốc axit amin từ 230 đến 445 tương ứng với miền CH2-CH3 của IgG4 (SEQ ID NO:4) nhưng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.

Các chuỗi nhẹ kháng thể được làm giống như của người độ dài đầy đủ được tạo cấu trúc như sau: đầu tận cùng C của miền VL được làm giống như của người được dung hợp với đầu tận cùng N của vùng kappa chuỗi nhẹ của người (SEQ ID NO:8). Chuỗi nhẹ này được ghép cặp với các chuỗi nặng IgG1 (AA) và IgG4 (P).

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể PD-1 được làm giống như của người ví dụ (hPD-1 mAb 7(1.2)) có vùng hằng định kappa là (SEQ ID NO:264):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Trong SEQ ID NO:264, các gốc axit amin từ 1 đến 111 tương ứng với miền VL của hPD-1 mAb 7 VL2 (SEQ ID NO:153), và các gốc axit amin từ 112 đến 218 tương ứng với vùng hằng định kappa chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 8).

Các kháng thể kháng PD-1 có các vùng hằng định khác, ví dụ các vùng Fc được thao tác di truyền, được tạo sẵn bằng cách kết hợp các vùng hằng định khác nhau và/hoặc bằng cách đưa vào một hoặc nhiều thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn axit amin. Ví dụ, trong trường hợp mong muốn có kháng thể đặc hiệu kép, các miền CH2-CH3 mang nốt phồng và mang lỗ được sử dụng để tạo thuận lợi cho quá trình heterodime hoá. Các kháng thể kháng PD-1 khảm bao gồm các miền biến đổi của chuột và các vùng hằng định của người được tạo ra như nêu trên đây.

Các kháng thể được làm giống như của người (IgG1 (AA) và/hoặc IgG4 (P)) được thử nghiệm về khả năng gắn kết và hoạt tính phong bế như mô tả ở trên. Khả năng gắn kết với PD-1 của người (shPD-1 His, và shPD-1 hFc) và PD-1 của khỉ cynomolgus (shPD-L1 hFc) của các kháng thể được làm giống như của người là tương đương với khả năng gắn kết của kháng thể của chuột tương ứng. Ngoài ra, các kháng thể được làm giống như của người vẫn giữ được khả năng phong bế gắn kết của PD-L1 của người với PD-1 của người trong thử nghiệm ELISA.

Động học gắn kết của các kháng thể của chuột PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 15, các kháng thể được làm giống như của người hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), hPD-1 mAb 15, và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B được khảo sát bằng cách sử dụng phân tích Biacore. Các kháng thể kháng PD-1 được bắt giữ trên Protein A cố định và ủ với PD-1 của người hoà tan được gắn đuôi-His (shPD-1-His) hoặc thể dung hợp Fc của người PD-1 của khỉ cynomolgus hoà tan (scyno PD-1 hFc) được phân cắt để loại bỏ đoạn Fc, và động học gắn kết được xác định bằng cách phân tích Biacore. Trong các nghiên cứu bổ sung, các kháng thể kháng PD-1 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), PD-1 mAb A

IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), và PD-1 mAb B IgG4 (P), được bắt giữ trên Fc của dê kháng-người $F(ab)_2$ cố định và động học gắn kết được xác định bằng cách phân tích Biacore như nêu trên đây. ka, kd và KD tính được từ các nghiên cứu này được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7

Kháng thể kháng PD-1	Của người[a]			Của khỉ cynomolgus[b]		
	k_a ($x10^4$)	k_d ($x10^{-4}$)	KD (nM)	k_a ($x10^4$)	k_d ($x10^{-4}$)	KD (nM)
Bắt giữ protein A						
PD-1 mAb A	60	18	3	14	9,6	6,9
PD-1 mAb B	140	35	2,5	37	12	3,2
PD-1 mAb 7	21	2,8	1,3	17	6	3,5
hPD-1 mAb 7(1.2)	110	4,3	0,39	37	6,4	1,7
PD-1 mAb 9	4,3	4,2	9,8	2,2	16	72,7
hPD-1 mAb 9(1.1)	1,8	6,5	36,1	1,5	11	73,3
PD-1 mAb 15	4,5	1,3	2,9	2,7	11	40,7
hPD-1 mAb 15	2,4	3,2	13,3	2,3	18	78,3
PD-1 mAb 2	5,5	5,6	10,2	4,2	6,0	14,3
hPD-1 mAb 2	3,2	1,6	5,0	2,3	3,9	17
Bắt giữ Fc kháng người của dê $F(ab)_2$						
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	13	8,4	6,5	8,1	4,5	5,6
PD-1 mAb A IgG4 (P)	13	7,9	6,1	8,4	5,0	6,0
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	25	28	11,2	20	6,4	3,2
PD-1 mAb B IgG4 (P)	26	25	9,6	20	7,9	4,0
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	25	3,8	1,5	16	7,8	4,9
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	27	4,1	1,5	17	7,8	4,6
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	5,6	6,1	10,9	5,6	5,2	9,3
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	6,1	5,8	9,5	4,9	7,4	15,1

[a]PD-1 của người hoà tan được gắn đuôi His (shPD-1 His)

[b]PD-1 của khỉ cynomolgus hoà tan (scyno PD-1 hFc) được phân cắt

Các kết quả chứng tỏ rằng PD-1 mAb 7 và hPD-1 mAb 7(1.2) được làm giống như của người thể hiện động học gắn kết tốt hơn so với các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B. PD-1 mAb 2, và hPD-1 mAb 2 thể hiện động học gắn kết gấp khoảng hai lần các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu trong khi PD-1 mAb 9, hPD-1 mAb 9(1.1), PD-1 mAb 15, và hPD-1 mAb 15 thể hiện động học gắn kết gấp khoảng từ 2 đến 6 lần các kháng thể tham chiếu kháng PD-1.

Tính đặc hiệu mô của kháng thể kháng PD-1 của người PD-1 mAb 7 được khảo sát. Mô bình thường được cho tiếp xúc PD-1 mAb 7 hoặc với isotyp đối chứng (0,313 µg/mL) và quan sát mức độ nhuộm màu. Bloxall được sử dụng cho phong bế enzym nội sinh để giảm nhuộm màu muxin không đặc hiệu trong mô đại tràng. Như thể hiện trong Fig.10A, các phiến i-xii, PD-1 mAb 7 và isotyp đối chứng đều không đánh dấu các tế bào của mô đại tràng, gan, phổi, tuỵ, thận và tim. Ngoài ra, PD-1 mAb 7 và isotyp đối chứng không nhuộm màu da bình thường (Fig.10B, các phiến i-ii). Trái lại, PD-1 mAb 7 đã xác định là đánh dấu mạnh các lympho bào có mặt trong mô amiđan bình thường và các tế bào NSO được chuyển nhiễm PDCD1 biểu hiện PD-1 (Fig.10B, các phiến iii và v), trong khi isotyp đối chứng không đánh dấu cả hai loại (Fig.10B, các phiến iv và vi). Các kết quả được trình bày trên Fig.10A-Fig.10B do đó cho thấy là PD-1 mAb 7 có khả năng gắn kết đặc hiệu với các lympho bào và tế bào biểu hiện PD-1.

Xét nghiệm các profin bão hoà gắn kết của hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B. Tóm lại là, từng kháng thể trong số các kháng thể kháng PD-1, PD-1 mAb từ 1 đến 15, hoặc các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A và PD-1 mAb B) được trộn với các tế bào NSO biểu hiện PD-1 của người (khoảng 250.000 tế bào/giếng) trong dịch đệm phong bế (FACS + 10% albumin huyết thanh của người). Đối với các nghiên cứu này, các kháng thể kháng PD-1 được sử dụng ở nồng độ 50, 12,5, 3,13, 2,0 $x10^{-1}$, 4,9 x 10^{-2}, 1,2 x 10^{-2}, 3,0 x 10^{-3}, 1,9 x 10^{-4}, 7,6 x 10^{-4}, 4,75 x 10^{-5}, hoặc 1,19 x 10^{-5} µg/thử nghiệm (dung dịch pha loãng theo bậc bốn lần). Lượng kháng thể gắn kết với bề mặt của các tế bào NSO được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp của dê kháng APC của người bằng cách phân tích FACS. Các đường cong bão hoà điển hình được thể hiện

trong Fig.11. Các giá trị EC50 và EC90 được xác định và giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) từ bốn thử nghiệm riêng rẽ được đề xuất trong bảng 8.

Bảng 8				
	Gắn kết bão hoà			
	EC50 (µg/thử nghiệm)		EC90 (µg/thử nghiệm)	
Kháng thể kháng PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0,1991	0,1309	1,4528	0,8040
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0,1581	0,1161	1,5464	1,7690
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0,1347	0,0681	1,3917	0,9573
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0,1398	0,0951	1,1619	1,2681
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0,4431	0,1997	2,4374	1,2637
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0,1069	0,0500	0,9102	0,5476
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0,1872	0,1553	0,6810	0,3226
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0,1376	0,0926	0,6609	0,3437
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	0,3123	0,2291	1,6486	0,9117
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0,5128	0,2228	3,0563	0,9437
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0,2927	0,1333	2,0640	0,6096

Các nghiên cứu bão hoà gắn kết chứng tỏ rằng các phiên bản được làm giống như của người của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 có profin thuận lợi để gắn kết với bề mặt tế bào PD-1. Cụ thể là, PD-1 mAb 7 được làm giống như của người (hPD-1 mAb 7(1.1), và hPD-1 mAb 7(1.2) có vùng Fc của IgG1 (AA) hoặc IgG4 (P)) có giá trị EC90 thấp nhất trong số tất cả các kháng thể đã xét nghiệm.

Để xác định đặc tính thêm các kháng thể kháng PD-1 được làm giống như của người hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), và hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), xét nghiệm khả năng phong bế gắn kết của PD-L1 của người (shPD-L1) và PD-L2 của người (shPD-L2) với PD-1 được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào NSO. Tiến hành các thử nghiệm này về cơ bản như nêu trên đây. Các đường cong điển hình về quá trình ức chế sPD-L1 và sPD-L2 gắn kết với PD-1 được biểu hiện trên các tế bào NSO tương ứng được thể hiện trên Fig.12A và Fig.12B. Các giá trị IC50 và IC90 được xác định và giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) từ ba thử nghiệm riêng rẽ được đề xuất trong bảng 9.

Bảng 9								
	sPD-L1				sPD-L2			
	IC50 (µg/thử nghiệm)		IC90 (µg/thử nghiệm)		IC50 (µg/thử nghiệm)		IC90 (µg/thử nghiệm)	
Kháng thể kháng PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0,0203	0,0089	0,2985	0,3279	0,0414	0,0124	0,1601	0,066
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0,0156	0,0096	0,0776	0,0208	0,0280	0,0070	0,1594	0,1153
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0,0148	0,0008	0,1034	0,0100	0,0280	0,0059	0,1190	0,060
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0,0143	0,0013	0,0798	0,0239	0,0280	0,0055	0,0924	0,0065
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0,0578	0,0124	0,2480	0,050	0,1294	0,0143	0,3813	0,0656
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0,0166	0,0032	0,0674	0,0041	0,0283	0,0147	0,0886	0,0166
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0,0118	0,0027	0,0678	0,0031	0,0212	0,0031	0,0672	0,0043
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0,0103	0,0023	0,0520	0,0033	0,0213	0,0019	0,0616	0,0063
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	0,0593	0,0036	0,3238	0,0508	0,4002	0,5000	0,4573	0,1805
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0,0460	0,0118	0,2461	0,0513	0,1105	0,0146	0,2914	0,0526
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0,0440	0,0092	0,2068	0,035	0,0945	0,0022	0,3093	0,0588

Các nghiên cứu ức chế gắn kết phối tử chứng tỏ rằng các phiên bản được làm giống như của người của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 có thể ức chế khả năng gắn kết của sPD-L1 và sPD-L2 với PD-1 trên bề mặt tế bào. Cụ thể là, PD-1 mAb 7 được làm giống như của người (hPD-1 mAb 7(1.1), và hPD-1 mAb 7(1.2)) có giá trị IC90 thấp nhất trong số tất cả các kháng thể đã xét nghiệm.

Ví dụ 3

Phong toả điểm kiểm tra PD-1/PD-L1 bằng các kháng thể kháng PD-1 của người được làm giống như của người

Khả năng của hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), và các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B đối kháng trục PD-1/PD-L1 (nghĩa là, phong bế tương tác PD-1/PD-L1 và ngăn ngừa quá trình điều hoà giảm đáp ứng của tế bào T) được xét nghiệm trong thử nghiệm chất báo cáo luciferaza Jurkat-luc-NFAT / CHO-PD-L1. Tóm lại là, các tế bào CHO biểu hiện PD-L1 (CHO/PD-L1) được dàn ở mật độ 40.000/giếng trong 100 µL môi trường nuôi cấy (RPMI + 10% FBS + 100 µg/mL Hygromyxin B + 100 µg/mL G418) và được ủ qua đêm. Ngày tiếp theo, loại bỏ môi trường này và các tế bào MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat (Promega) ở mật độ 50.000 tế bào/giếng trong 40 µL đệm thử nghiệm (RPMI + 2% FBS), và các kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb từ 1 đến 15, hoặc các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu (PD-1 mAb A và PD-1 mAb B) (0-25 µg/mL; tám dung dịch pha loãng theo bậc 2,5 lần trong đệm thử nghiệm) được thêm vào mỗi giếng và được ủ trong 6 giờ ở 37°C, ủ tiếp từ 5 đến 10 phút ở nhiệt độ môi trường. 80 µL BioGlo Substrate (Promega) tiếp đó được thêm vào mỗi giếng và ủ đĩa này thêm từ 5 đến 10 phút ở nhiệt độ môi trường, đo phát quang trong thiết bị đọc đĩa Victor. Các đường cong bão hoà đại diện được thể hiện trong Fig.13. Các giá trị EC50 và EC90 được xác định và giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) từ bốn thử nghiệm riêng rẽ được đề xuất trong bảng 10.

Bảng 10

Kháng thể kháng PD-1	Tín hiệu chất báo cáo			
	EC50 (µg/thử nghiệm)		EC90 (µg/thử nghiệm)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0,2549	0,0480	2,4474	1,2228
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0,2049	0,0719	2,5535	1,2139
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0,2119	0,1781	2,2036	2,0118
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0,1142	0,0323	0,9418	0,2863
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0,3539	0,0983	3,8975	2,0054
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0,1080	0,0386	1,1992	0,5103
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0,0944	0,0153	0,6452	0,2615
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0,0965	0,0169	0,6885	,01858
hPD-1 mAb 9 IgG1 (AA)	0,2835	0,0530	2,9968	0,8866
hPD-1 mAb 9 IgG4 (P)	0,3154	0,0872	5,0940	4,0496
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0,2585	0,0592	3,3138	1,0532

Các nghiên cứu tín hiệu chất báo cáo chứng tỏ là các phiên bản được làm giống như của người của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 có thể phong bế trục PD-1/PD-L1 và sẽ ngăn chặn quá trình điều hoà giảm các đáp ứng tế bào T. Cụ thể là, PD-1 mAb 7 được làm giống như của người (hPD-1 mAb 7(1.1), và hPD-1 mAb 7(1.2) có vùng Fc của IgG1 (AA) hoặc IgG4 (P)) có các giá trị EC50/EC90 thấp nhất.

Ví dụ 4

Hoạt tính hoạt động của các kháng thể kháng PD-1 của người

Độc tố ruột của *Staphylococcus aureus* typ B (SEB) là siêu kháng nguyên của vi khuẩn có khả năng hoạt hoá tỷ lệ lớn tế bào T (5-30%) ở người cho đáp ứng-SEB. SEB gắn kết với MHC II bên ngoài rãnh gắn kết peptit này và do đó là phụ thuộc MHC II, nhưng không bị hạn chế và qua trung gian TCR. Sự kích thích SEB của tế bào T dẫn đến tăng sinh tế bào T oligoclonal và sản sinh xytokin (mặc dù có thể nhận thấy có sự biến thiên giữa những người cho và một vài người cho sẽ không đáp ứng). Trong vòng 48 giờ kích thích SEB, các PMBC điều hoà tăng PD-1 và LAG-3 với tăng cường hơn nữa nhận thấy ở ngày 5, sau nuôi cấy thứ cấp trong đĩa 96-giếng kèm theo kích thích SEB. Quá trình điều hoà tăng các protein điểm kiểm tra miễn dịch PD-1 và LAG-3 sau khi kích thích-SEB của các PBMC hạn chế giải phóng xytokin khi kích thích lại. Khả năng của các kháng thể kháng PD-1 đơn độc và kết hợp với các kháng thể kháng LAG-3 tăng cường giải phóng xytokin thông qua ức chế điểm kiểm tra được xét nghiệm.

Tóm lại là, các PBMC được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm gradien mật độ Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất từ máu toàn phần lấy từ người cho khoẻ mạnh khi có sự chấp thuận của họ (Biological Specialty Corporation) và các tế bào T tiếp đó được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit tế bào T của người Dynabeads® Untouched (Life Technologies) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Các PBMC đã tinh chế được nuôi cấy trong môi trường RPMI + 10% FBS đã bất hoạt bằng nhiệt + 1% Penixilin/Streptomyxin trong bình nuôi cấy T-25 trong khoảng từ 2 đến 3 ngày đơn độc hoặc với SEB (Sigma-Aldrich) ở nồng độ 0,1 ng/mL (kích thích đầu tiên). Khi kết thúc lượt kích thích SEB thứ nhất, các PBMC được rửa hai lần bằng PBS và dàn ngay vào các đĩa nuôi cấy mô 96-giếng ở nồng độ trong khoảng từ 1 x 10^5 đến 5 x 10^5 tế bào/giếng chỉ trong môi trường, môi trường kèm

theo mẫu đối chứng hoặc kháng thể kháng PD-1, môi trường kèm theo SEB ở nồng độ 0,1 ng/mL (kích thích lần hai) và không có kháng thể, hoặc môi trường kèm theo SEB và IgG đối chứng hoặc kháng thể kháng PD-1 +/- mAb kháng-LAG-3, và được nuôi cấy thêm khoảng từ 2 đến 3 ngày. Khi kết thúc kích thích lần hai, dịch nổi bề mặt được thu hồi để đo sự bài tiết xytokin bằng cách sử dụng bộ kit DuoSet ELISA cho người đối với IFNγ, TNFα, IL-10, và IL-4 (R&D Systems) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

Xét nghiệm khả năng của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 đơn độc, hoặc kết hợp với kháng thể kháng-LAG-3 duy nhất LAG-3 mAb 1 để tăng cường giải phóng xytokin thông qua ức chế điểm kiểm tra. Các nghiên cứu này cũng bao gồm một hoặc nhiều kháng thể trong số các các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu sau: PD-1 mAb A; PD-1 mAb B; và LAG-3 mAb A, đơn độc hoặc kết hợp. **Fig.14** thể hiện các profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng SEB (0,1 ng/mL) từ người cho đáp ứng đại diện (D:38941), được điều trị bằng: không có kháng thể; kháng thể đối chứng isotyp; PD-1 mAb 7 và/hoặc LAG-3 mAb 7; PD-1 mAb 9 và/hoặc LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 15 và/hoặc LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 2 và/hoặc LAG-3 mAb 1; hoặc các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb B và/hoặc LAG-3 mAb A (các kháng thể được sử dụng ở nồng độ10 µg/mL).

Trong các nghiên cứu bổ sung, xét nghiệm khả năng của các phiên bản được làm giống như của người của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 (bao gồm vùng Fc của IgG1 (AA) của người hoặc của IgG4 (P) của người) cũng như các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B để tăng cường giải phóng xytokin thông qua ức chế điểm kiểm tra. Đối với các nghiên cứu này, các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 0,625, 2,5, và 10 µg/mL. Fig.15A-Fig.15B thể hiện các profin bài tiết IFNγ (Fig.15A) và TNFα (Fig.15B), từ các PBMC được kích thích bằng SEB (0,2 ng/mL) từ người cho đáp ứng đại diện (D:57709), được điều trị bằng: không có kháng thể hoặc một kháng thể trong số các kháng thể sau đây: đối chứng isotyp; hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P); hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P); hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA); hoặc các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), PD-1 mAb B IgG4 (P). IFNγ tổng cộng pg/mg trong các mẫu được điều trị bằng SEB+Ab được xác định cho các mẫu được điều trị bằng các kháng

thể kháng PD-1 ở 0,625, 2,5 và 10 µg/mL và giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) từ ba người cho đáp ứng khác nhau (trừ khi có lưu ý khác) được đề xuất trong bảng 11. Tỷ lệ IFNγ được bài tiết trong mẫu được điều trị bằng các phiên bản được làm giống như của người của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 (bao gồm vùng Fc của IgG1 (AA) của người hoặc của IgG4 (P) của người) so với các kháng thể kháng PD-1 tham chiếu PD-1 mAb A và PD-1 mAb B (nghĩa là, kháng PD-1 được làm giống như của người/PD-1 mAb A, và kháng PD-1 được làm giống như của người /PD-1 mAb B) tương ứng được trình bày trong bảng 12 và Bảng 13.

Bảng 11

	Bài tiết IFNγ (pg/mL)					
µg/mL kháng thể kháng-PD1	0,625 µg/mL		2,5 µg/mL		10 µg/mL	
kháng thể kháng PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	221,18	110,89	341,13	247,93	347,46	144,72
PD-1 mAb A IgG4 (P)	281,36	132,65	495,15	190,57	399,41	117,56
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	366,69	196,64	387,682	215,51	387,32	282,81
PD-1 mAb B IgG4 (P)	348,40	185,96	433,382	163,23	551,68	125,08
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	302,05	185,71	610,70	209,77	414,63	272,65
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	384,57 ‡	323,79 ‡	411,40	398,59	370,06	108,12
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	340,81	207,76	442,598	303,70	655,29	567,91
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	309,82	130,30	468,62	350,15	424,35	288,95
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	360,00	274,28	373,32	160,25	541,83	444,22
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	275,88	135,23	372,73	53,53	496,70	235,37
IgG đối chứng	137,14	76,61	100,65	48,67	138,10	120,81
Không có kháng thể	120,05	73,90	120,05	73,90	109,46	85,18

‡ Các kết quả từ hai người cho đáp ứng

Bảng 12

	Tỷ lệ bài tiết IFNγ (kháng PD-1 mới/PD-1 mAb A)					
µg/mL kháng thể kháng-PD1	0,625 µg/mL		2,5 µg/mL		10 µg/mL	
kháng thể kháng PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1,77	0,92	1,28	0,36	1,07	0,42
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1,23	0,16	0,92	0,27	1,40	0,12
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	1,36	0,37	2,46	1,85	1,17	0,41

hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	1,20‡	0,35‡	0,79	0,54	0,95	0,22
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	1,48	0,19	1,46	0,71	1,70	0,84
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	1,13	0,13	0,91	0,42	1,02	0,46
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1,50	0,39	1,51	1,23	1,48	0,71
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	1,32	0,53	1,48	0,86	1,42	0,12
IgG đối chứng	0,63	0,2	0,33	0,08	0,39	0,24
Không có Kháng thể	0,54	0,12	0,39	0,14	0,31	0,17

‡ Các kết quả từ hai người cho đáp ứng

Bảng 13						
	Tỷ lệ bài tiết IFNγ (kháng PD-1 mới/PD-1 mAb B)					
µg/mL kháng thể kháng-PD1	0,625 µg/mL		2,5 µg/mL		10 µg/mL	
kháng thể kháng PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0,37	0,37	0,82	0,20	1,06	0,48
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0,82	0,12	1,16	0,38	0,72	0,07
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1,0	0,00	1,0	0,00	1,0	0,00
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1,0	0,00	1,0	0,00	1,0	0,00
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0,84	0,22	1,77	0,81	1,11	0,07
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0,91‡	0,26‡	0,83	0,50	0,68	0,17
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	1,04	0,59	1,12	0,29	1,60	0,42
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0,92	0,09	0,99	0,36	0,75	0,39
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1,01	0,48	1,07	0,57	1,34	0,15
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0,78	0,12	1,10	0,38	1,46	0,53
IgG đối chứng	0,39	0,08	0,27	0,08	0,34	0,13
Không có Kháng thể	0,34	0,11	0,31	0,03	0,28	0,08

‡ Các kết quả từ hai người cho đáp ứng

Các kết quả của các nghiên cứu này chứng tỏ rằng các kháng thể PD-1 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, và PD-1 mAb 15 tăng cường sản sinh IFNγ (Fig.14 và Fig.15A, và các Bảng từ 11 đến 13), và TNFα (Fig.15B) đáng kể từ các PBMC được kích thích bằng SEB khi kích thích lại. Ngoài ra, việc kết hợp các kháng thể kháng PD-1 với các kháng thể kháng LAG-3 dẫn đến tăng cường hơn nữa sự giải phóng xytokin (Fig.14) từ các PBMC được kích thích bằng SEB khi kích thích lại. Cụ thể là, sự kết hợp

của PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 hoặc PD-1 mAb 15 với kháng thể kháng LAG-3 duy nhất LAG-3 mAb 1 cho mức tăng cường lớn nhất.

Ví dụ 5

Các nghiên cứu gắn kết các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Một số phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 được tạo ra, bao gồm kháng thể thể đôi chứa vùng Fc bao gồm ba, bốn và năm chuỗi và kháng thể đặc hiệu kép. Bốn kháng thể thể đôi có bốn chuỗi và bao gồm các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K được tạo ra và được ký hiệu là "DART A," "DART B," "DART C, và "DART I." Bốn kháng thể thể đôi có bốn chuỗi và bao gồm các miền CH1/CL được tạo ra và được ký hiệu là "DART D," "DART E," "DART J," và "DART 1." Hai kháng thể thể đôi có năm chuỗi và bao gồm các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K và các miền CH1/CL được tạo ra và được ký hiệu là "DART F," và "DART G." Một kháng thể thể đôi có ba chuỗi và bao gồm các miền thúc đẩy heterodime cuộn E/K được tạo ra và ký hiệu là "DART H." Một kháng thể đặc hiệu kép có bốn chuỗi được tạo ra và ký hiệu là "BSAB A." Cấu trúc và trình tự axit amin của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 này được đề cập ở trên và được tóm tắt trong bảng 14 dưới đây.

Bảng 14

Tên	Các mAb gốc	Fc‡	Số chuỗi	SEQ ID NO:	Các cấu phần khác
DART A	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	267 (X_1=A; X_2=Y; X_3=T; X_4=E) và 268	Các cuộn E/K; xem Fig.3B
DART B	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.3)	IgG4 (YTE)	4	267 (X_1=G; X_2=Y; X_3=T; X_4=E) và 268	Các cuộn E/K; xem Fig.3B
DART C	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.3)	IgG4	4	267 (X_1=G; X_2=M; X_3=S; X_4=T) và 268	Các cuộn E/K; xem Fig.3B
DART D	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	269 và 270	CL/CH1; xem Fig.3C
DART E	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	271 và 272	CL/CH1; xem Fig.3C
DART F	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA/ YTE)	5	273, 274, 275, và 276	CL/CH1 và các cuộn E/K; xem Fig.5

Bảng 14					
Tên	Các mAb gốc	Fc‡	Số chuỗi	SEQ ID NO:	Các cấu phần khác
DART G	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA/ YTE)	5	277, 278, 279, và 280	CL/CH1 và các cuộn E/K; xem Fig.5
DART H	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA)	3	281, 282, và 283	Các cuộn E/K; Xem Fig.4A
DART I	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	290 và 291	Các cuộn E/K; xem Fig.3B
DART J	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	292 và 293	CL/CH1; xem Fig.3C
DART 1	PD-1 mAb A LAG-3 mAb A	IgG1 (AA)	4	284 và 285	CL/CH1; xem Fig.3C
BSAB A	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA)	4	286, 287, 288, và 289	mAb có vùng Fc được thao tác di truyền tích điện

‡ các phân tử kết hợp các vùng Fc của IgG4 cũng kết hợp vùng bản lề IgG4 được làm ổn định.

Các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 bổ sung bao gồm các vị trí gắn kết epitop PD-1 và/hoặc LAG-3 khác có thể được tạo ra dễ dàng bằng cách kết hợp các miền VH và VL khác nhau. Tương tự, các phân tử gắn kết kháng nguyên không phải là LAG-3 có thể được tạo ra bằng cách kết hợp VH và VL có tính đặc hiệu mong muốn.

Các profin bão hoà gắn kết của các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, và DART 1; các kháng thể kháng PD-1: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) và PD-1 mAb A IgG4 (P); và các kháng thể kháng LAG-3: hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA), và LAG-3 mAb A IgG1 (AA) được xét nghiệm về cơ bản như nêu trên đây. Các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 được thử nghiệm cả khả năng gắn kết PD-1 và LAG-3, trong khi các kháng thể kháng PD-1 và kháng LAG-3 chỉ được thử nghiệm về khả năng gắn kết với các kháng nguyên tương ứng của chúng. Đối với các nghiên cứu này, sử dụng các tế bào NSO biểu hiện PD-1 hoặc LAG-3. Sử dụng kháng thể thể đôi và các kháng thể (170,0-0,013 µM hoặc 85,0-0,0021 µM (dung dịch pha loãng theo bậc bốn lần). Các giá trị EC50 và EC90 được xác

định và được trình bày trong các Bảng 15-Bảng16. Giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) được đưa ra trong trường hợp tiến hành hai hoặc nhiều thử nghiệm riêng rẽ.

Bảng 15				
Phân tử	Gắn kết bão hoà PD-1			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1,9297	0,4324	9,6027	0,4801
DART B	1,7640§		12,2700§	
DART D	2,2267	0,4140	10,9313	2,6351
DART E	3,2180	0,5742	23,840	3,2385
DART F	1,4320§		14,5800§	
DART G	1,1488	0,6227	3,4220	2,4600
DART H	4,5310§		22,6600§	
DART I	1,3232	0,4890	7,8135	4,0821
DART 1	2,1329	1,4850	13,8113	9,0256
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	1,2083	0,8112	3,9340	1,8746
PD-1 mAb A IgG4 (P)	2,3470	1,2362	22,7770	15,0690
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	1,0879	0,3958	7,4153	3,0794
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1,6733	0,5464	9,9543	6,6569

§ các kết quả từ một thử nghiệm duy nhất

Bảng 16				
Phân tử	Gắn kết bão hoà LAG-3			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0,8402	0,2231	4,4448	2,4770
DART B	1,0750§		9,8580§	
DART D	0,8985	0,5326	5,7967	4,7329
DART E	0,9250	0,8075	5,6450	5,6809
DART F	5,0090	0,5770	19,3350	4,7447
DART G	0,9396	0,3045	8,5507	4,7448
DART H	2,3840§		9,7810	4,2412
DART I	0,5321	0,0547	4,198	3,2188
DART 1	20,0233	2,1454	115,97	15,2425
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)	1,0057	0,1969	5,1360	4,7904
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0,5968	0,1376	2,0833	0,3244
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA)	0,6069	0,3430	3,6373	2,4762
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0,4523	0,1660	2,0187	0,7035

§ các kết quả từ một thử nghiệm duy nhất

Các nghiên cứu bão hoà gắn kết chứng tỏ rằng các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 giữ được khả năng gắn kết với PD-1 và có các profin gắn kết tương tự như các profin gắn kết của các kháng thể kháng PD-1 gốc. Tương tự, các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 giữ được khả năng gắn kết với LAG-3 và, ngoại trừ DART 1, có các profin gắn kết tương tự như các profin gắn kết của các kháng thể kháng-LAG-3 gốc.

Ví dụ 6

Nghiên cứu sự ức chế các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Khả năng của phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 và BSAB A; và các kháng thể kháng PD-1: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) và PD-1 mAb A IgG4 (P), để phong bế gắn kết của PD-L1 của người (shPD-L1) và PD-L2 của người (shPD-L2) với PD-1 được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào NSO được xét nghiệm về cơ bản như nêu trên đây. Kháng thể thể đôi và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 33,75-0,002 μM hoặc 107,5-0,0001 μM (dịch pha loãng theo bậc bốn lần).

Các giá trị IC50 và IC90 được xác định và được trình bày trong bảng **17**. Giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD **σ**) được đưa ra trong trường hợp tiến hành hai hoặc nhiều thử nghiệm riêng rẽ.

Bảng 17

Phân tử	phong bế gắn kết sPD-L1/PD-1				phong bế gắn kết sPD-L2/PD-1			
	IC50 (μM)		IC90 (μM)		IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0,9645	0,1485	5,6312	1,5247	1,6273	0,4285	6,9335	3,9849
DART B	1,1515	0,0007	4,8615	0,2199	2,1150	0,3154	7,9550	0,0933
DART D	1,5548	0,1692	7,8950	2,5135	3,1255	0,5869	9,2973	5,5426
DART E	1,6533	0,3307	7,8470	1,1642	2,9460	0,7736	6,6135	0,0177
DART F	0,5697	0,1729	2,0360	0,1174	0,8389	0,0846	1,7995	0,2171
DART G	1,6013	0,3581	8,1953	1,5708	2,5540	0,7891	7,4810	0,2333
DART H	3,3950	0,1018	18,640	9,5742	6,2065	3,6847	29,395	3,8679
DART I	0,8363	0,1302	5,3115	0,3125	1,286	0,3125	6,2485	1,3951
DART 1	1,7467	0,3097	5,4533	1,0214	2,8355	1,8250	7,2735	3,9831
BSAB A	2,1590	0,3097	11,075	0,8132	4,8775	0,5438	15,580	1,3294

hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0,5186	0,1668	3,8050	1,2227	1,0425	0,2563	3,4880	0,5459
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0,9209	0,3256	4,3023	0,7069	1,3859	0,3882	5,1675	0,2943
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0,7320	0,2337	3,2048	1,1479	0,9769	0,2893	2,8437	1,4801
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1,0765	0,2393	5,2775	0,9933	1,9510	0,8814	5,0880	1,3831

Các nghiên cứu về sự ức chế gắn kết phối tử chứng tỏ rằng các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 giữ được khả năng ức chế khả năng gắn kết của sPD-L1 và sPD-L2 với PD-1 trên bề mặt tế bào.

Ngoài ra, khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 và BSAB A; và các kháng thể kháng LAG-3: hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA), và LAG-3 mAb A IgG1 (AA), để phong bế gắn kết của LAG-3 của người với MHC lớp II nguyên thuỷ trên bề mặt của các tế bào Daudi được xét nghiệm. Vắn tắt là, mỗi phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 và kháng thể kháng LAG-3 đối chứng được trộn với protein dung hợp LAG-3-Fc của người hoà tan được biotin hoá (shLAG-3), (ở nồng độ 0,5 µg/ml) và được ủ riêng rẽ với các tế bào Daudi dương tính với MHC II (2,5 x 10^6 tế bào). Lượng của LAG-3 gắn kết với bề mặt của các tế bào Daudi được xác định bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp Streptavidin được tiếp hợp PE bằng cách phân tích FACS. Kháng thể thể đôi và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 27,5-0,026 µM (các dung dịch pha loãng theo bậc hai lần) hoặc 107,5-0,0001 µM (dung dịch pha loãng theo bậc bốn lần), hoặc 35-0,002 µM (dung dịch pha loãng theo bậc bốn lần).

Các giá trị IC50 và IC90 được xác định và được trình bày trong bảng 18. Giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) được đưa ra trong trường hợp tiến hành hai hoặc nhiều thử nghiệm riêng rẽ.

Bảng 18				
Phân tử	Phong bế gắn kết shLAG-3/MHC lớp II			
	EC50 (µM)		EC90 (µM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1,3835	1,6465	8,396102	8,3962

DART B	0,4081	0,1104	3,0645	0,3924
DART D	1,1843	1,1398	8,0041	7,3317
DART E	3,2706	2,9177	28,9683	24,1694
DART F	1,5347	1,2674	10,3920	11,2555
DART G	2,0618	3,3552	11,4422	12,4964
DART H	2,8967	4,9817	17,2533	21,1420
DART I	0,4864	0,1549	2,339	1,1780
DART 1	15,9610	14,0883	87,1486	109,533
BSAB A	0,7101	0,0571	7,2470	1,0706
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)	0,4815	0,2176	3,4837	1,7564
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0,7011	0,1900	2,4232	0,3481
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA)	0,3637	0,1409	9,4422	7,9319
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0,5923	0,3407	2,1451	1,1139

Các nghiên cứu về sự ức chế gắn kết phối tử chứng tỏ rằng các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 giữ được khả năng ức chế gắn kết của protein dung hợp shLAG-3-Fc với MHC lớp II trên bề mặt tế bào. Ngoại trừ DART 1, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 có các profin ức chế tương tự như các kháng thể kháng LAG-3 gốc.

Ví dụ 7

Phong toả điểm kiểm tra PD-1/PD-L1 bằng các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 và BSAB A; và các kháng thể kháng PD-1: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) và PD-1 mAb A IgG4 (P), để đối kháng trục PD-1/PD-L1 (nghĩa là, phong bế tương tác PD-1/PD-L1 và ngăn ngừa quá trình điều hoà giảm các đáp ứng tế bào T) được xét nghiệm trong thử nghiệm chất báo cáo luciferaza Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 (bằng cách sử dụng các tế bào CHO/PD-L1 và các tế bào MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat) về cơ bản như nêu dưới đây. Kháng thể thể đôi và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 100-0,0065 μM (dung dịch pha loãng theo bậc bốn lần) hoặc 100-0,0013 μM (dịch pha loãng theo bậc 5 lần).

Các giá trị IC50 và IC90 được xác định và được trình bày trong bảng 19. Giá trị trung bình mẫu (SM) và độ lệch chuẩn (SD σ) được đưa ra trong trường hợp tiến hành hai hoặc nhiều thử nghiệm riêng rẽ.

Bảng 19	
Phân tử	Tín hiệu chất báo cáo

	IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0,8804	0,1949	7,9115	1,3232
DART B	1,079	0,1535	7,5413	3,1483
DART D	1,4044	0,2584	12,0786	3,6616
DART E	1,4060	0,1222	13,7867	1,4981
DART F	0,3404	0,0103	1,8710	0,481
DART G	0,6914	0,0206	4,2090	0,7331
DART H	36,6167	20,8078	968,300	811,8471
DART I	1,3335	0,3641	12,146	6,8787
DART 1	11,8807	3,4905	1048,2000	1508,9992
BSAB A	9,7825	1,0288	113,3350	22,2951
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0,6460	0,3035	6,0736	2,5513
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1,328	0,7439	16,5138	9,7149
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0,5214	0,1541	4,7592	2,1044
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1,4514	1,0049	35,7382	40,9858

Các nghiên cứu tín hiệu chất báo cáo chứng minh rằng đa số các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 giữ được khả năng ức chế gắn kết của sPD-L1 với PD-1 trên bề mặt tế bào. Các cấu trúc kháng thể thể đôi đặc hiệu kép hoá trị bốn PD-1 x LAG-3, DART A, DART B, DART D, DART-E, DART F, DART G và DART I là các chất ức chế mạnh nhất trong thử nghiệm này. Thu được các kết quả tương tự đối với một vài cấu trúc trong số các cấu trúc đặc hiệu kép này đã được xét nghiệm trong thử nghiệm chất báo cáo PD-L2.

Ví dụ 8

Hoạt tính hoạt động của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 tăng cường giải phóng xytokin thông qua sự ức chế điểm kiểm tra được xét nghiệm ở các PBMC được kích thích bằng SEB khi kích thích lại về cơ bản như nêu trên đây trừ khi có lưu ý khác.

Trong các nghiên cứu ban đầu, xét nghiệm khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H; và các kháng thể kháng PD-1 và kháng-LAG: PD-1 mAb A IgG4 (P) và LAG-3 mAb A IgG4 (P), đơn độc hoặc kết hợp để tăng cường giải phóng xytokin thông qua sự ức chế điểm kiểm tra. Trong các thử nghiệm này, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ tổng cộng bằng 3,125, 12,5, hoặc 50 nM, và các PBMC được kích thích bằng 0,2 ng/mL SEB (các nghiên cứu trước đây đã sử dụng ở

nồng độ 0,1 ng/mL). Đối với các nghiên cứu này, trong trường hợp sử dụng kết hợp các kháng thể, mỗi kháng thể được cung cấp ở một nửa nồng độ tổng cộng, (nghĩa là, 1,563, 6,25, hoặc 25 nM). Fig.16A và Fig.16B thể hiện các profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng SEB tương ứng từ hai người cho đáp ứng đại diện, D: 35644 và D: 59697.

Như đã lưu ý, không phải tất cả người cho đều đáp ứng với SEB ở 0,1 hoặc 0,2 ng/mL. Để tăng cường kích thích các PBMC bằng SEB từ một số lượng lớn người cho, SEB được sử dụng ở nồng độ cao là 85 ng/mL, hoặc nồng độ trung bình 0,5 ng/mL trong các nghiên cứu bổ sung. Ở các nồng độ này, sự kích thích bằng SEB mạnh hơn ở nhiều người cho hơn, mặc dù vẫn có thể nhận thấy sự biến thiên giữa các người cho.

Trong một nghiên cứu, khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART B; kháng thể kháng PD-1: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); kháng thể kháng-LAG-3: LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P); và sự kết hợp của: PD-1 mAb A IgG4 (P) và LAG-3 mAb A IgG4 (P), để tăng cường giải phóng xytokin thông qua sự ức chế điểm kiểm tra được xét nghiệm. Trong các thử nghiệm này, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 0,019, 0,078, 0,3125, 1,25, 5, hoặc 20 nM và các PBMC được kích thích bằng 85 ng/mL SEB. Đối với thử nghiệm này, trong trường hợp sử dụng kết hợp các kháng thể, mỗi kháng thể được cung cấp ở nồng độ đã chỉ định và do đó nồng độ kháng thể tổng cộng gấp hai nồng độ đã sử dụng cho mỗi kháng thể (nghĩa là, 0,038, 0,156, 0,625, 2,5, 10, hoặc 40 nM). Fig.17A và Fig.17B thể hiện các profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng SEB tương ứng từ hai đối tượng cho đại diện, D: 55515 và D: 54024.

Trong một nghiên cứu khác, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART C; kháng thể kháng PD-1: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); kháng thể kháng LAG-3: LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P); và sự kết hợp của: PD-1 mAb A IgG4 (P) và LAG-3 mAb A IgG4 (P), để tăng cường giải phóng xytokin thông qua ức chế điểm kiểm tra được xét nghiệm. Trong các thử nghiệm này, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ tổng cộng bằng 0,048, 0,195, 0,78, 3,125, 12,5, hoặc 50 nM và các PBMC được kích thích bằng 0,5 ng/mL SEB. Đối với các nghiên cứu này, trong trường hợp sử dụng kết hợp các kháng thể, mỗi kháng thể được cung cấp ở một nửa nồng độ tổng cộng (nghĩa là, 0,024, 0,098, 0,39, 1,563, 6,25,

hoặc 25 nM). Fig.18A và Fig.18B thể hiện các profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng-SEB tương ứng từ 2 đối tượng cho đại diện, D: 20990 và D: 54947).

Trong một nghiên cứu khác nữa, quá trình giải phóng xytokin IL-2 được xét nghiệm. Cụ thể là, xét nghiệm khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART D, DART H; các kháng thể kháng PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); các kháng thể kháng LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P) và LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P); và sự kết hợp của: PD-1 mAb A IgG4 (P) và LAG-3 mAb A IgG4 (P), và hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P) và LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P), để tăng cường giải phóng IL-2 thông qua ức chế điểm kiểm tra. Trong các thử nghiệm này, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ tổng cộng bằng 3,125, 12,5, hoặc 50 nM và các PBMC được kích thích bằng nồng độ SEB cao 85 ng/mL. Đối với các nghiên cứu này, trong trường hợp sử dụng kết hợp các kháng thể mỗi kháng thể được cung cấp ở một nửa nồng độ tổng cộng (nghĩa là, 1,563, 6,25, hoặc 25 nM). Fig.19 thể hiện profin bài tiết IL-2 từ các PBMC được kích thích bằng SEB từ một đối tượng cho đại diện (D: 54024).

Trong các nghiên cứu bổ sung, khả năng của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3: DART B, và DART I; các kháng thể kháng PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), và hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); các kháng thể kháng-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P), và hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P); và các kết hợp của: PD-1 mAb A IgG4 (P) và LAG-3 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P) và hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P), và hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P) và hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P) để tăng cường giải phóng xytokin thông qua ức chế điểm kiểm tra được xét nghiệm. Trong các thử nghiệm này, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 và các kháng thể được sử dụng ở nồng độ 0,0061, 0,024, 0,09, 0,39, 1,56, 6,25 hoặc 25 nM và các PBMC được kích thích bằng 0,5 ng/mL SEB. Đối với các nghiên cứu này, trong trường hợp sử dụng kết hợp các kháng thể, mỗi kháng thể được cung cấp ở nồng độ được chỉ định và do đó nồng độ kháng thể tổng cộng gấp hai nồng độ đã sử dụng cho mỗi kháng thể (nghĩa là, 0,0122, 0,048, 0,18, 0,78, 3,12, 12,5 hoặc 50 nM). Fig.20 thể hiện các profin bài tiết IFNγ từ các PBMC được kích thích bằng -SEB từ một đối tượng cho đại diện D: 56041).

Khả năng của phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 DART I; sự kết hợp của kháng thể kháng PD-1 PD-1 mAb A IgG4 và kháng thể khángLAG-3 LAG-3 mAb A IgG4 (P); và kháng thể đối chứng âm để tăng cường các đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được xét nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm thu hồi biến độc tố uốn ván. Cụ thể là, đáp ứng bài tiết tăng cường các xytokin đặc hiệu kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng biến độc tố uốn ván làm kháng nguyên thu hồi trong hệ thử nghiệm đồng nuôi cấy. Vắn tắt là, các tế bào T ký ức CD4 (0,5 – 1,0 $X10^5$ tế bào/giếng) được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit phân lập chọn lọc âm tính (Miltenyi Biotec, San Diego, CA và Invitrogen, Carlsbad, CA) từ máu ngoại vi của người và nuôi cấy trong 5 đến 7 ngày với các bạch cầu đơn nhân được chiếu xạ (0,01 - 0,05$X10^5$ tế bào/giếng, 3500 rad) từ cùng người cho khi có mặt hoặc không có mặt 5 µg/mL kháng nguyên biến độc tố uốn ván thu hồi (TTd) và dịch pha loãng (bắt đầu ở 25nM) của DART I, PD-1 mAb A IgG4 + LAG-3 mAb A IgG4(P), hoặc isotyp đối chứng. Trong các đĩa song song, xác định mức tăng sinh thông qua kết hợp thymidin được đánh dấu triti và IL-2 và IFNγ được xác định bằng cách sử dụng ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) ở các ngày từ 5 đến 7. Fig.21A-Fig.D thể hiện các profin bài tiết IFNγ (Fig.21A, 21C) và IL-2 (Fig.21B, 21D) ở ngày 7, từ hai đối tượng cho đại diện (D50702 và D54267).

Các kết quả của các nghiên cứu này chứng tỏ rằng các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 tăng cường đáng kể sự sản sinh IFNγ (Fig.16A-16B, 17A-17B, 18A-18B, 20), và IL-2 (Fig.19) từ các PBMC được kích thích bằng SEB khi kích thích lại. Ngoài ra, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 tăng cường đáng kể sự sản sinh IFNγ (Fig.21A và Fig.21C) từ các tế bào T ký ức CD4 được kích thích bằng biến độc tố uốn ván. Cụ thể là, các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 hoá trị bốn cho mức tăng cường lớn hơn so với kết hợp của các kháng thể kháng PD-1 với các kháng thể kháng-LAG-3.

Ví dụ 9

Dược động học của các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Dược động học của phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 điển hình, DART I và kháng thể kháng PD-1 điển hình, PD-1 mAb A được xét nghiệm ở khỉ Cynomolgus. Vắn tắt là, hai con khỉ cynomolgus (một con cái và một con đực) được tiêm truyền liều DART I (5 mg/kg) hoặc PD-1 mAb A (10 mg/kg) duy nhất và theo dõi nồng độ huyết thanh của các phân tử theo thời gian bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA sandwich.

Vắn tắt là, các đĩa thử nghiệm 96-giếng maxisorb được phủ bằng PD-1 của người hoà tan (shPD-1), phong bế bằng albumin huyết thanh bò, được rửa và ủ với các chất chuẩn độ, các chất chuẩn kiểm soát chất lượng và các mẫu huyết thanh pha loãng. Đánh giá lượng của DART I và PD-1 mAb A được bắt giữ bằng cách bổ sung thêm lần lượt Fc-biotin của dê kháng IgG của người thứ cấp và streptavidin peroxidaza củ cải ngựa (SA-HRP). Phát hiện hoạt tính HRP bằng cách sử dụng cơ chất TMB. Tất cả các mẫu được phân tích trên thiết bị đọc đĩa vi lượng (SpectraMax M2e, Molecular Device, Sunnyvale, CA) và các tín hiệu OD từ các chất chuẩn độ được sử dụng trong mô hình logitic bốntham số bằng cách sử dụng phần mềm SoftMax Pro (Version 5.4, Molecular Devices). Xác định nồng độ của PD-1 mAb A, hoặc DART I từ nội suy các dữ liệu tín hiệu OD của các mẫu bằng phương trình mô tả đường cong chuẩn độ. Ngưỡng định lượng dưới (LLOQ) cho thử nghiệm này được ước tính ở 9,775 ng/mL.

Fig.22 thể hiện nồng độ huyết thanh theo thời gian, các đường thẳng biểu thị giá trị trung bình của khỉ đực (ký hiệu đặc) và khỉ cái (ký hiệu rỗng) được tiêm truyền DART I (vạch liền, hình tam giác) hoặc PD-1 mAb A (vạch đứt quãng, hình tròn). Các dữ liệu này chứng tỏ rằng dược động học của phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3 là tương đương với dược động học của kháng thể kháng PD-1 ở khỉ cynomolgus.

Ví dụ 10

Nghiên cứu độc tính của các kháng thể PD-1 và các phân tử đặc hiệu kép PD-1 x LAG-3

Profin tính an toàn của kháng thể kháng PD1 điển hình, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), và phân tử đặc hiệu kép PD1 x LAG3 điển hình, DART I, được đánh giá trong nghiên cứu liều dùng chưa thực hành tốt phòng kiểm nghiệm (Good Laboratory Practice) ở khỉ cynomolgus.

Trong nghiên cứu này, đánh giá độc tính và động học độc tính có thể có của kháng thể kháng PD-1 (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)), khi được sử dụng bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch nhiều lần. Ngoài ra, độc tính tiềm ẩn và dược động học của phân tử DART PD-1 x LAG-3 (DART I), khi được sử dụng bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch liều duy nhất cũng được đánh giá. Thiết kế nghiên cứu được trình bày trong bảng 20.

Bảng 20

Nhóm số	Chất thử	Mức liều dùng (mg/kg)	Ngày sử dụng	Thể tích liều dùng	Liều dùng (mg/mL)	Số lượng khỉ	
						Giống đực	Giống cái
1	Đối chứng	0	1, 8, 15	5	0	1[a]	1[a]
2A	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1[a]	1[a]
2B	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1[b]	1[b]
3A	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1[a]	1[a]
3B	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1[b]	1[b]
4	DART I	5	1	5	1	1[c]	1[c]

[a] Các nhóm 1, 2A, và 3A bắt đầu sử dụng vào ngày 1 và khám nghiệm tử thi 72 giờ sau liều dùng cuối cùng (liều thứ ba) vào ngày 18.
[b] Các nhóm 2B và 3B bắt đầu sử dụng vào ngày 1 và khám nghiệm tử thi 7 ngày sau liều dùng cuối cùng (liều thứ ba) vào ngày 22.
[c] Nhóm 4 bắt đầu sử dụng vào ngày 1 và theo dõi trong 28 ngày sau khi dùng liều duy nhất (cho đến ngày 29); các con khỉ sau đó được trả lại bầy.

Đánh giá các thông số và điểm cuối sau trong nghiên cứu này: các dấu hiệu lâm sàng, trọng lượng cơ thể, mức tiêu thụ thức ăn, thân nhiệt, các thông số bệnh học lâm sàng (huyết học, đông máu và hoá học lâm sàng), phân tích sinh học và các thông số động học độc tính, phân tích kháng thể kháng thuốc, đếm tế bào dòng chảy, xytokin, đánh giá khám nghiệm tử thi tổng thể, trọng lượng cơ quan, và xét nghiệm mô bệnh học.

Tất cả các con khỉ sống sót cho đến khi giết nhân đạo theo lịch trình vào ngày 18 hoặc 22 hoặc thả lại bầy vào ngày 29. Đối với hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) không thấy có các thay đổi liên quan đến kháng thể thử nghiệm về các dấu hiệu lâm sàng, mức tiêu thụ thức ăn, trọng lượng cơ thể, thân nhiệt, huyết học, đông máu, hoặc các thông số hoá học lâm sàng, hoặc xét nghiệm khám nghiệm tử thi tổng thể. Vào các ngày 18 và 22, sự gia tăng rõ ràng trọng lượng lá lách và có thâm nhiễm lympho bào mô bào từ mức nhẹ đến trung bình phụ thuộc liều dùng ở phần thịt đỏ ở các con dùng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) ở liều dùng 1 hoặc 100 mg/kg. So với các lympho bào xung quanh, các tế bào lympho bào mô bào có tương bào nhạt màu và nhân bất thường. Rõ ràng có hiện tượng gián phân hiếm gặp. Sự thâm nhiễm là chỉ số tương quan khi soi kính hiển vi cho trọng lượng lá lách gia tăng.

Profin nồng độ huyết thanh-thời gian đối với các con đã được dùng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) thể hiện profin kỳ vọng đối với kháng thể ở loài này, với một vài ngoại lệ. Độ dốc của các đường cong sau khi dùng liều thứ ba tụt mạnh hơn sau khi dùng liều thứ nhất ở hai con trong nhóm liều dùng 1 mg/kg và hai con trong nhóm liều dùng 100 mg/kg, cho thấy có thể xuất hiện các kháng thể kháng thuốc (ADA) ở các chu kỳ sau. Phân tích cho thấy là 2/4 con có xuất hiện ADA ở nhóm 1 mg/kg và 1/4 con xuất hiện ADA ở nhóm 100 mg/kg.

Kết luận, việc sử dụng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch một lần/tuần trong 3 tuần (các ngày 1, 8, và 15) là dung nạp tốt ở khỉ cynomolgus ở mức liều 1 và 100 mg/kg. Thâm nhiễm tế bào lympho bào-mô bào ở mức từ nhẹ đến trung bình phụ thuộc liều dùng mô đỏ của lá lách xuất hiện ở liều 1 và 100 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P).

Đối với DART I, không có các thay đổi liên quan đến kháng thể thử nghiệm về các dấu hiệu lâm sàng, mức tiêu thụ thức ăn, trọng lượng cơ thể, thân nhiệt, các thông số huyết học hoặc đông máu. Các thay đổi liên quan đến-DART I về các thông số hoá học lâm sàng bao gồm có tăng thoáng qua, không bất lợi aspartat aminotransferaza (AST) và lactat dehydrogenaza (LDH) vào ngày 2. Thay đổi AST trung bình là gấp 3,2 lần so với con đối chứng được điều trị bằng chất dẫn và gấp 7,8 lần mức trước khi nghiên cứu, với các mức cao hơn khoảng tham chiếu đối chiếu. Thay đổi LDH trung bình gấp 2,5 lần so với con đối chứng được điều trị bằng chất dẫn và 6,9 lần mức trước khi nghiên cứu. Cả hai thông số này trở về mức đường nền vào ngày 8. Kết luận, sử dụng liều duy nhất DART-I bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch là dung nạp tốt ở khỉ cynomolgus ở mức liều 5 mg/kg.

Ví dụ 11

Nghiên cứu dược động học liều duy nhất với các kháng thể kháng PD-1

Nghiên cứu dược động học liều duy nhất với các điểm cuối độc tính đã chọn được tiến hành ở khỉ cynomolgus. Trong các nghiên cứu này, so sánh hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) với hai κ mAb của IgG4 (P) kháng-PD1 khác: PD-1 mAb A IgG4 (P) và PD-1 mAb B IgG4 (P). Mỗi kháng thể được sử dụng ở liều dùng 10 mg/kg bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch trong 1 giờ cho hai con khỉ (1M, 1F) và theo dõi các con khỉ này trong 65 ngày.

Không có các dấu hiệu lâm sàng liên quan đến thuốc thử, các thay đổi về trọng lượng cơ thể, mức tiêu thụ thức ăn, xytokin, hoặc kiểu hình miễn dịch kèm theo việc sử dụng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) hoặc PD-1 mAb A IgG4 (P). Các dữ liệu là tương tự đối với PD-1 mAb B IgG4 (P) trừ việc nhận thấy rằng có sự gia tăng IL-5 sau khi sử dụng PD-1 mAb B IgG4 (P).

Kháng thể kháng PD-1 gắn kết với PD-1 trên bề mặt của tế bào T được xác định bằng cách đếm tế bào dòng chảy sử dụng phương pháp cạnh tranh, trong đó cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) được đánh dấu huỳnh quang gắn kết với các tế bào T khi không có (đối chứng PBS) hoặc có chất cạnh tranh ở lượng dư (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) không được đánh dấu) trong toàn đợt điều trị của các mẫu máu được gom từ các con khỉ cynomolgus được điều trị bằng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG4 (P) hoặc PD-1 mAb B IgG4 (P). Như thể hiện trên Fig.23A- Fig.23C, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) và PD-1 mAb B IgG4 (P) chứng tỏ gắn kết kéo dài với PD-1 trên bề mặt của các tế bào T CD4+ và CD8+ (gắn kết PD-1 duy trì ở mức ≥ 80% trong 28 ngày hoặc lâu hơn) (tương ứng trên Fig.23A và Fig.23C) so với PD-1 mAb A IgG4 (P) (gắn kết PD-1 duy trì ở mức ≥ 80% trong 21 ngày hoặc ít hơn) (Fig.23B). Đối với mỗi kháng thể trong số các kháng thể kháng PD-1, dữ liệu gắn kết PD-1 của tế bào T tương quan với nồng độ trong huyết thanh của chúng.

Ví dụ 12

Các nghiên cứu độc tính học liều dùng lặp lại

Để đánh giá tính an toàn, động học độc tính, và profin dược lý của các phân tử trị liệu theo sáng chế, phân tử được lấy làm ví dụ (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)) được sử dụng cho khỉ cynomolgus và tiến hành nghiên cứu liều dùng Thực hành tốt phòng kiểm nghiệm (Good Laboratory Practice - GLP). Trong nghiên cứu này, 4 nhóm khỉ (10 con/nhóm, 5 con đực, và 5 con cái) được điều trị bằng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) hoặc vật đối chứng, một lần/tuần bằng cách tiêm truyền ở 3 mức liều dùng. Đánh giá các con khỉ về độc tính tiềm ẩn bất kỳ trong giai đoạn dùng thuốc 4 tuần, tiếp đó theo dõi trong giai đoạn không dùng thuốc thêm 10 tuần. Thiết kế thử nghiệm của nghiên cứu này được trình bày trong bảng 21. Các con khỉ được cho dùng thuốc một lần/tuần bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch trong một giờ bằng cách sử dụng bơm truyền đã hiệu chỉnh vào các ngày nghiên cứu 1, 8, 15, và 22. Giết một con đực và một con cái trong mỗi nhóm vào

ngày 25, giết các con còn lại vào ngày nghiên cứu 95. Đánh giá các tác dụng của việc sử dụng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) lên phân nhóm quần thể bạch cầu trong máu, bao gồm sự chiếm giữ các thụ thể PD-1 trên các tế bào lympho-T. Ngoài ra, xác định các profin kháng thể kháng-thuốc (ADA).

Bảng 21

Nhóm	Chất thử [a]	Mức liều dùng (mg/kg)	Thể tích liều dùng (mL/kg)	Liều dùng (mg/mL)	Số lượng khỉ [b]			
					Nghiên cứu chính		Nghiên cứu phục hồi	
					Đực	Cái	Đực	Cái
1	Đối chứng	0	5,88	0	3	3	2	2
2	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	10	5,88	1,7	3	3	2	2
3	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	40	5,88	6,8	3	3	2	2
4	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	150	5,88	25,5	3	3	2	2

[a] Đối chứng và hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) được sử dụng hàng tuần bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch

[b] 6 con khỉ (3 con đực/3 con cái)/nhóm được khám nghiệm tử thi vào ngày 25, trong khi các con khỉ nhóm phục hồi còn lại (2 con đực /2 con cái) được khám nghiệm tử thi vào ngày 95

Tiêm truyền tĩnh mạch (IV) một lần/tuần hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) ở liều 0, 10, 40, và 150 mg/kg ở khỉ cynomolgus dung nạp tốt và tất cả các con khỉ sống cho đến ngày giết nhân đạo theo lịch trình vào các ngày 25 hoặc 95. Không có các thay đổi liên quan đến hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) về các dấu hiệu lâm sàng, mức tiêu thụ thức ăn, trọng lượng cơ thể, khám nghiệm thể chất, nhãn khoa, và thần kinh, điện tâm đồ, thân nhiệt, nhịp thở, huyết áp và nhịp tim, các thông số đông máu, hoá học lâm sàng, và phân tích nước tiểu, trọng lượng cơ quan, hoặc xét nghiệm khám nghiệm tử thi tổng thể.

Các thay đổi liên quan đến hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) về các thông số huyết học bao gồm giảm thoáng qua hiệu giá lympho bào. Hiệu giá lympho bào giảm ở mức trung bình so với mức trước nghiên cứu (ngày 1 trước khi dùng) vào ngày 2 (23 giờ sau khi tiêm truyền) ở con đực và con cái ở ≥ 10 mg/kg, có ý nghĩa thống kê đối với các con đực ở 10 và 40 mg/kg và các con cái ở 40 và 150 mg/kg so với đối chứng. Hiệu giá lympho bào quay trở về mức gần mức trước nghiên cứu vào ngày 8 trước khi dùng,

nhưng giảm nhẹ đối với một số con đực và con cái cá thể ở tất cả các mức liều dùng (bằng từ 0,47 lần đến 0,68 lần mức trước nghiên cứu) vào ngày 9 (23 giờ sau khi tiêm truyền). Hiệu giá lympho bào gia tăng trước khi dùng vào các ngày 15 và 22, nhưng giảm đối với một số con đực và con cái cá thể (bằng từ 0,36 lần đến 0,54 lần mức trước nghiên cứu) vào các ngày 16 và 23 (23 giờ sau khi tiêm truyền).

Về sự phụ thuộc liều dùng, quan sát thấy có sự sụt giảm thoáng qua các quần thể tế bào miễn dịch trong máu, bao gồm bạch cầu toàn phần, tế bào T, tế bào B, và tế bào NK trong 23 giờ sau khi kết thúc tiêm truyền ở các con được điều trị bằng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) so với nhóm đối chứng. Nhận thấy mức thay đổi lớn nhất sau khi sử dụng liều dùng đầu tiên vào ngày 1; nhận thấy thoáng qua các mức thay đổi mức độ thấp hơn sau khi dùng các liều sau đó vào các ngày 8, 15, hoặc 22. Các quần thể tế bào miễn dịch nói chung phục hồi về các giá trị đường nền hoặc gần đường nền 72 giờ sau khi kết thúc tiêm truyền và trong suốt pha phục hồi. Không nhận thấy có thay đổi các bạch cầu đơn nhân trong máu ở các con được điều trị bằng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) so với nhóm đối chứng.

Nhận thấy mức gắn kết tối đa của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) với các tế bào PD-1+/CD4+ và PD-1+/CD8+ trong pha điều trị hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) của nghiên cứu ở tất cả các liều dùng đã thử nghiệm (10, 40 hoặc 150 mg/kg). Khi phục hồi, các con khỉ không phát triển các đáp ứng kháng thể kháng-thuốc (ADA), duy trì các nồng độ của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) trong huyết thành trên 29 µg/mL và duy trì mức gắn kết tối đa của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) với các tế bào PD-1+/CD4+ và PD-1+/CD8+ T trong suốt giai đoạn phục hồi 10 tuần. Ở các con này, không có dấu hiệu điều biến PD-1 trên các tế bào T . Ở các các con phục hồi mà phát triển các đáp ứng ADA, tần suất các tế bào T PD-1+ gắn kết-TMGD012 sụt giảm xuống mức đường nền. Nói chung xuất hiện sụt giảm từ mức gắn kết tối đa của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) trên các tế bào PD-1+/CD4+ và PD-1+/CD8+ của các con dương tính với ADA khi nồng độ hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) biểu kiến trong huyết thanh tụt xuống còn khoảng 25 µg/mL. Tuy nhiên, không rõ là liệu mối quan hệ ngưỡng biểu kiến này có áp dụng cho các con âm tính với ADA hay không, do có xuất hiện ADA ở các con dương tính với ADA có thể góp phần phong bế gắn kết của các kháng thể PD-1 với PD-1.

Có các khác biệt liên quan đến giới tính tối thiểu về đáp ứng dược động học của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), các đáp ứng này là tuyến tính trong khoảng liều dùng đã đánh giá (từ 10 đến 150 mg/kg). Đối với hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) ở liều dùng 10, 40, và 150 mg/kg, C_{max} trung bình kết hợp giới tính là 240 µg/mL (0,240 mg/mL), 1078 µg/mL (1,08 mg/mL), và 3938 µg/mL (3,94 mg/mL) và AUC tương ứng là 47310 h•µg/mL (47,3 giờ•mg/mL), 205723 giờ•µg/mL (206 giờ•mg/mL), và 745681 giờ•µg/mL (746 giờ•mg/mL). Độ thanh thải trung bình theo phân tích không phân khoang (NCA) của chu kỳ thứ nhất của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) trước khi xuất hiện ADA, là 0,21 mL/giờ/kg, thấp hơn đáng kể so với tốc độ lọc cầu thận của khỉ cynomolgus, như kỳ vọng đối với các protein phân tử lượng lớn. Thể tích phân bố ở trạng thái ổn định trung bình theo NCA của chu kỳ thứ nhất của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) là 68 mL/kg, gấp khoảng 1,5 lần so với thể tích huyết thanh, nhưng thấp hơn thể tích nước ngoại bào. Điều này gợi ý là hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) thoát mạch từ khoang lòng mạch vào khoang ngoại bào của mô, nhưng không phải toàn bộ khoang ngoại bào có thể tiếp cận được đối với phân tử này. Giá trị trung bình của thời gian lưu trú trung bình (MRT) theo NCA của chu kỳ thứ nhất của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) là 335 giờ hoặc khoảng 14 ngày. Sự xuất hiện ADA làm giảm nồng độ của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) trong các chu kỳ từ 2 đến 4. Nhận thấy dấu hiệu nồng độ hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) trong huyết thanh giảm đi sau các liều dùng lặp lại của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) ở 7/10, 4/10, và 3/10 con tương ứng trong các nhóm liều dùng 10, 40, và 150 mg/kg. Khẳng định có ADA kháng lại hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) ở 4, 2, và 1 con trong số các con này tương ứng ở các nhóm liều dùng 10, 40, và 150 mg/kg; tất cả các con, trong đó ADA không được khẳng định là thuộc nhóm khám nghiệm tử thi cuối cùng mà nồng độ trong huyết thanh của hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) có thể gây trở ngại cho khả năng phát hiện ADA. Do đó, trong các phân tích động học độc tính (TK) sau đó, khi nồng độ đáy thấp hơn nồng độ đáy trước đó, dữ liệu từ thời điểm này trở đi được kiểm nghiệm. Từ mô hình hoá hai khoang các dữ liệu của toàn bộ các chu trình đối với 3 nhóm liều dùng, trừ các điểm bị ảnh hưởng bởi ADA, các giá trị trung bình của các thông số TK cấp một đối với mô hình hai khoang là 0,22 mL/giờ/kg đối với độ thanh thải, 38,5 mL/kg đối với thể tích phân bố ban đầu (V_1), và 33.8 mL/kg đối với V_2, các thể tích này cho kết quả thể tích phân bố ở trạng thái ổn định trung bình (V_{ss}) là 72,3 mL/kg, và MRT là 329 giờ. Các giá trị này phù hợp với các thông số thu được từ

NCA liều dùng đầu tiên. Khi không xuất hiện ADA, các mô phỏng dự đoán là với liều dùng hàng tuần, sẽ đạt được trạng thái ổn định ở khỉ cynomolgus sau liều dùng thứ năm và chỉ số tích luỹ sẽ là 2,4.

Vào ngày 25, thâm nhiễm tế bào đơn nhân quanh mạch đa tâm tối thiểu có liên quan đến hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) xuất hiện ở hạ bì bề mặt ở vị trí tiêm truyền tĩnh mạch ở các con đực với liều dùng ≥ 40 mg/kg và ở con cái với liều dùng ≥ 10 mg/kg và là phản ứng mong đợi khi tiêm lặp lại protein lạ (kháng thể đơn dòng). Vào ngày 95, không có các thay đổi khi soi kính hiển vi có liên quan đến-hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) được ghi nhận, điều này cho thấy xuất hiện phục hồi thay đổi liên quan đến kháng thể thử nghiệm vào ngày 25.

Tóm lại, các kết quả nghiên cứu này cho thấy sử dụng hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch một lần/tuần (các ngày 1, 8, 15, và 22) là dung nạp tốt trên lâm sàng ở khỉ cynomolgus ở các mức liều dùng 10, 40, hoặc 150 mg/kg. Các tác dụng đã nhận thấy là giới hạn ở sự giảm thoáng qua các lympho bào trong máu và các thay đổi tối thiểu ở vị trí tiêm liên quan đến tiêm protein lạ. Dựa trên các kết quả này, mức liều dùng không nhận thấy có tác dụng bất lợi (NOAEL) được cho là 150 mg/kg (C_{max} trung bình kết hợp giới tính là 3,94 mg/mL và AUC = 746 h•mg/mL).

Tất cả các tài liệu công bố và bằng sáng chế đề cập trong bản mô tả này được viện dẫn ở đây để tham khảo ở mức độ là mỗi tài liệu hoặc đơn sáng chế được chỉ ra cụ thể và mỗi tài liệu là được viện dẫn toàn bộ để tham khảo. Trong khi sáng chế đã được mô tả đề cập đến các phương án cụ thể của sáng chế, nên hiểu là có khả năng có cải biến hơn nữa và đơn sáng chế này nhằm bao gồm các thay đổi, ứng dụng hoặc chuyển thể của sáng chế nói chung theo các nguyên tắc của sáng chế và bao gồm những thay đổi so với bản mô tả này mà đã biết hoặc thuộc thực tiễn thông thường của lĩnh vực của sáng chế và có thể được ứng dụng cho các dấu hiệu cơ bản nêu trong bản mô tả này ở trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng đơn đặc hiệu của người, kháng thể đơn đặc hiệu thể khảm hoặc kháng thể đơn đặc hiệu được làm giống như của người kháng PD-1 bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(A) miền biến đổi chuỗi nặng chứa miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, và miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3, trong đó:

(B) miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3 là các CDR chuỗi nặng của hPD-1 mAb 7(1.2), và có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 và SEQ ID NO:141; và

(C) miền CDR_L1, miền CDR_L2 và miền CDR_L3 là các CDR chuỗi nhẹ của hPD-1 mAb 7(1.2), có các trình tự axit amin tương ứng là SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:145 và SEQ ID NO:146.

2. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đề cập trong SEQ ID NO:147.

3. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đề cập trong SEQ ID NO:153.

4. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đề cập trong SEQ ID NO:147 và miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đề cập trong SEQ ID NO:153.

5. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó:

(A) kháng thể bao gồm vùng Fc là vùng Fc của isotyp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4; và

(B) khi vùng Fc này là vùng Fc của isotyp IgG4, kháng thể chứa miền bản lề của isotyp IgG4 bao gồm đột biến làm ổn định.

6. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng Fc biến thể bao gồm:

(A) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của vùng Fc biến thể này đối với FcγR; trong đó một hoặc nhiều cải biến mà làm giảm ái lực của vùng Fc biến thể đối với FcγR bao gồm các thay thế L234A; L235A; hoặc L234A và L235A, và trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU như trong Kabat; và/hoặc

(B) một hoặc nhiều cải biến axit amin tăng cường thời gian bán thải huyết tương của vùng Fc biến thể, trong đó một hoặc nhiều cải biến mà tăng cường thời gian bán thải huyết tương của vùng Fc biến thể bao gồm các thay thế M252Y; M252Y và S254T; M252Y và T256E; M252Y, S254T và T256E; hoặc K288D và H435K, và trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU như trong Kabat.

7. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng Fc thuộc loại IgG1.

8. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa SEQ ID NO:264 và SEQ ID NO:265.

9. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó:

(a) kháng thể này chứa vùng Fc và miền bản lề;

(b) vùng Fc và miền bản lề thuộc loại IgG4; và

(c) miền bản lề chứa đột biến làm ổn định.

10. Kháng thể đơn đặc hiệu của người kháng PD-1 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa SEQ ID NO:264 và SEQ ID NO:266.

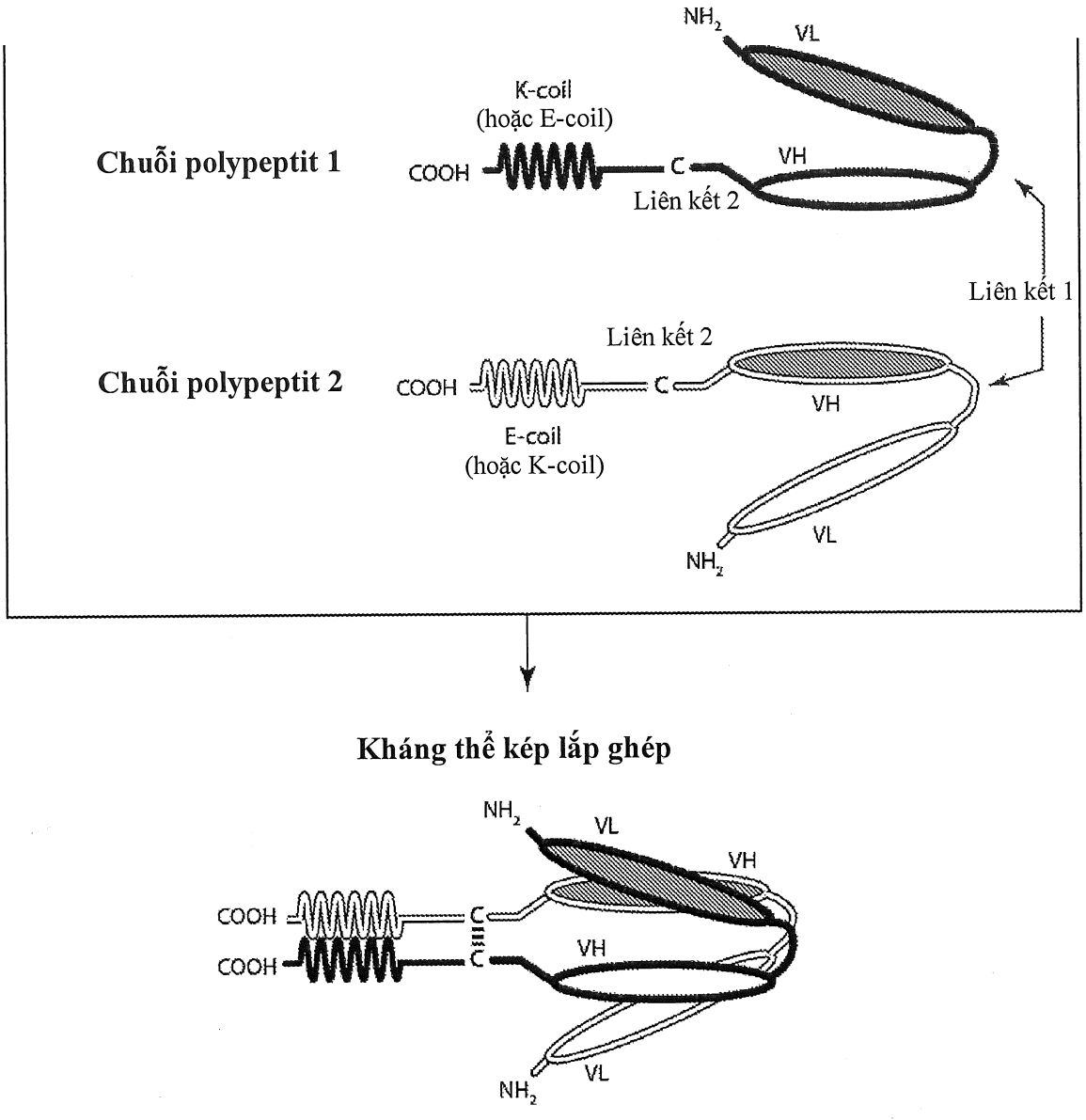

Chuỗi polypeptit 1
K-coil
(hoặc E-coil)
COOH
C
NH2
VL
VH
Liên kết 2
Liên kết 1
Chuỗi polypeptit 2
Liên kết 2
COOH
C
VH
E-coil
(hoặc K-coil)
VL
NH2
Kháng thể kép lắp ghép
NH2
VL
VH
COOH
COOH
C
C
VH
VL
NH2

Fig. 1

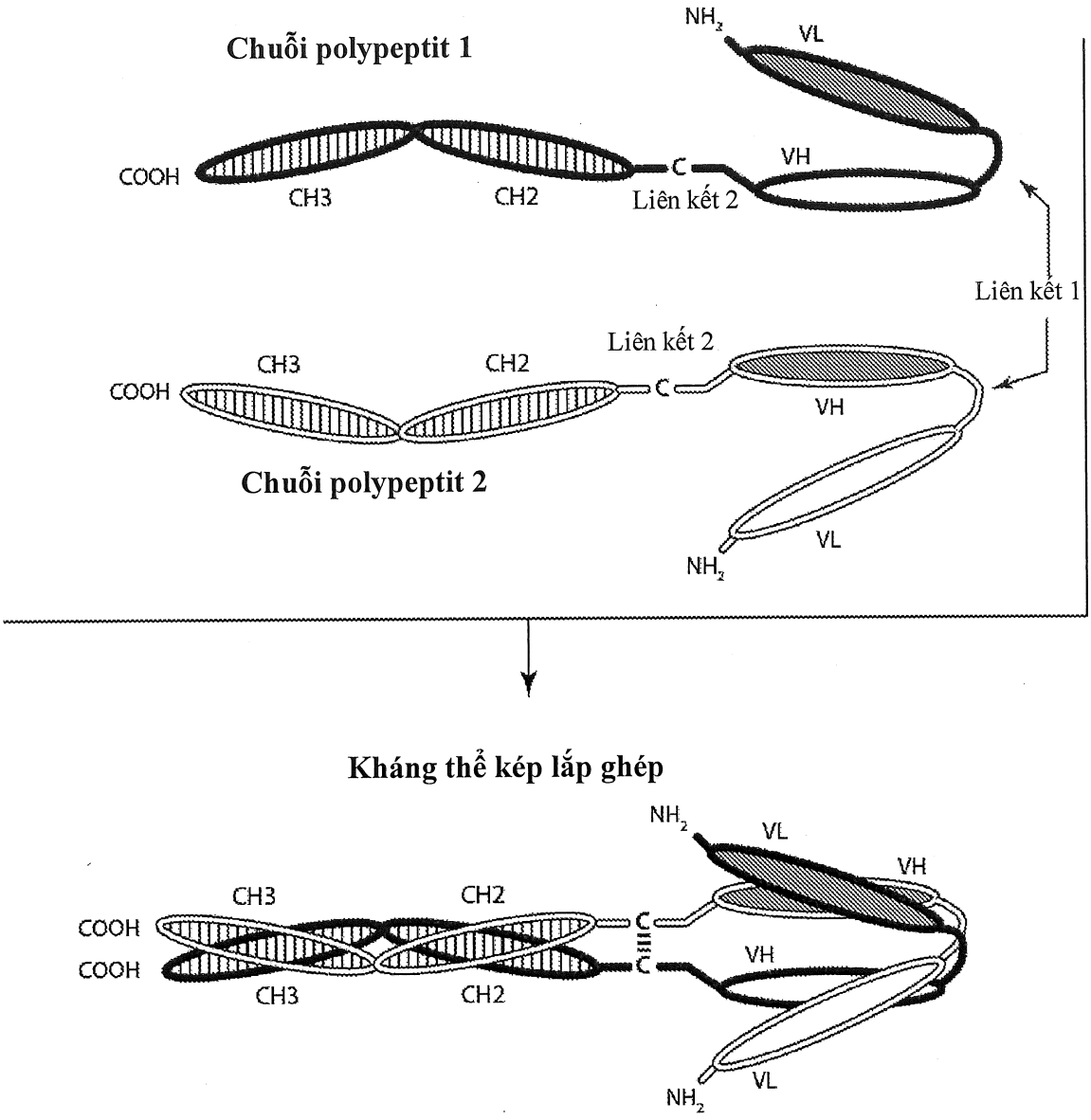

Chuỗi polypeptit 1
NH2
VL
COOH
CH3
CH2
C
Liên kết 2
VH
Liên kết 1
Liên kết 2
CH3
CH2
COOH
C
VH
Chuỗi polypeptit 2
VL
NH2
Kháng thể kép lắp ghép
NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
COOH
C
C
VH
CH3
CH2
VL
NH2

Fig. 2

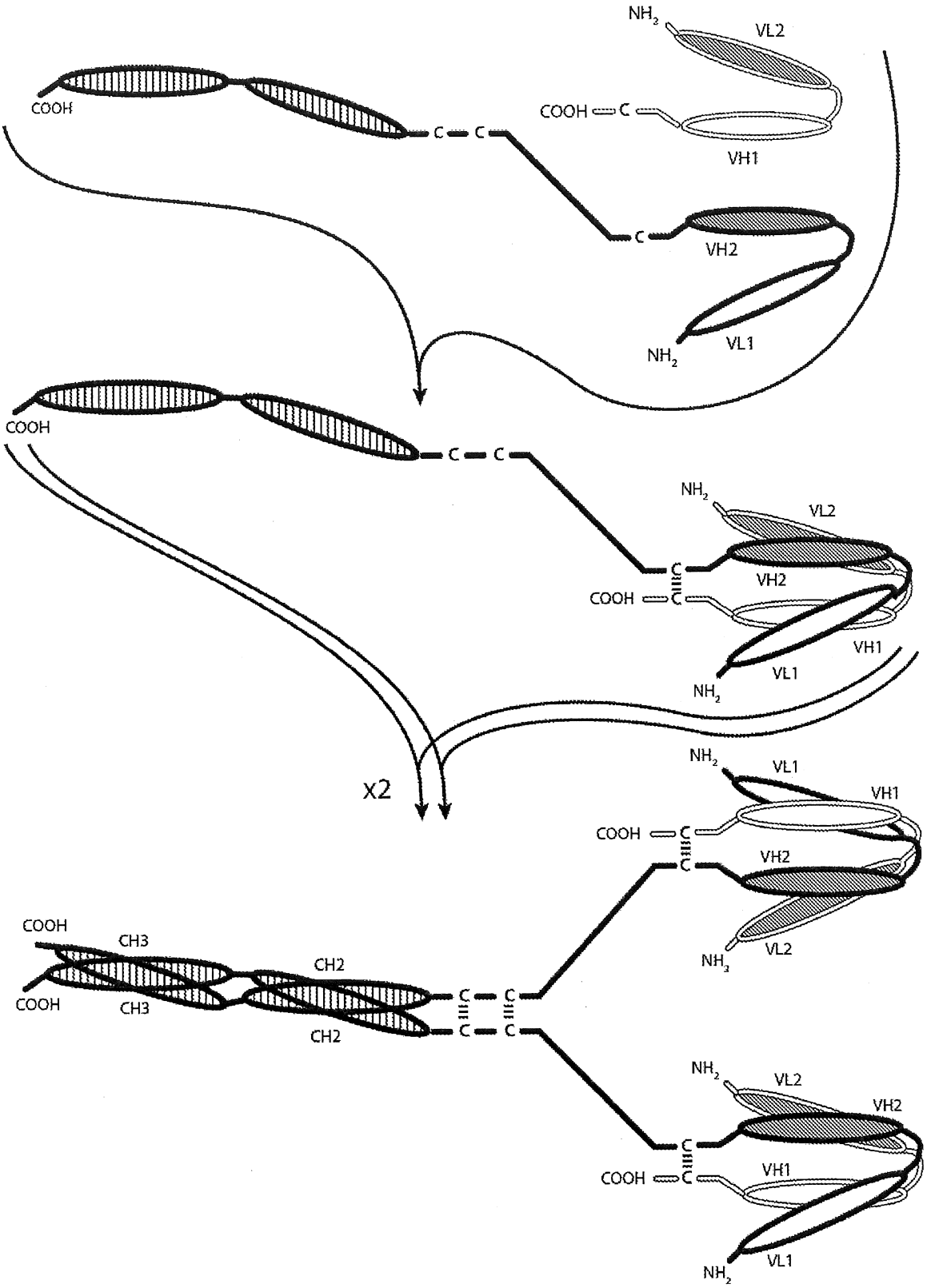

NH2
VL2
COOH
COOH
C
VH1
C
VH2
NH2
VL1
COOH
NH2
VL2
VH2
COOH
VH1
VL1
NH2
X2
NH2
VL1
VH1
COOH
VH2
NH2
VL2
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
NH2
VL2
VH2
COOH
VH1
NH2
VL1

Fig. 3A

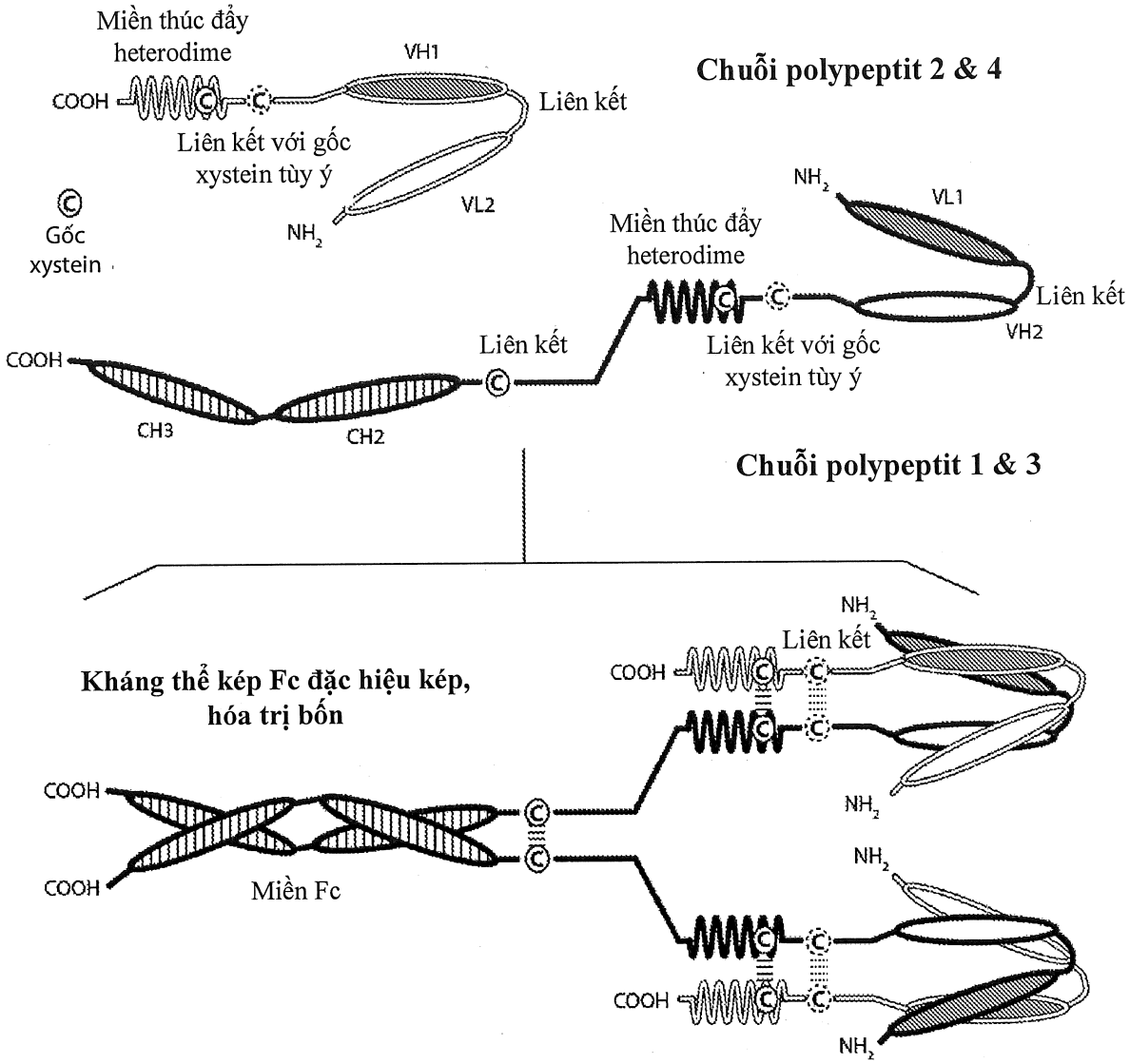

Miền thúc đẩy heterodime
VH1
COOH
Liên kết
Liên kết với gốc xystein tùy ý
VL2
NH2
Gốc xystein
Chuỗi polypeptit 2 & 4
NH2
VL1
Miền thúc đẩy heterodime
Liên kết
VH2
Liên kết với gốc xystein tùy ý
Liên kết
COOH
CH3
CH2
Chuỗi polypeptit 1 & 3
Kháng thể kép Fc đặc hiệu kép, hóa trị bốn
NH2
Liên kết
COOH
COOH
Miền Fc
NH2
NH2
COOH
NH2

Fig. 3B

5/38

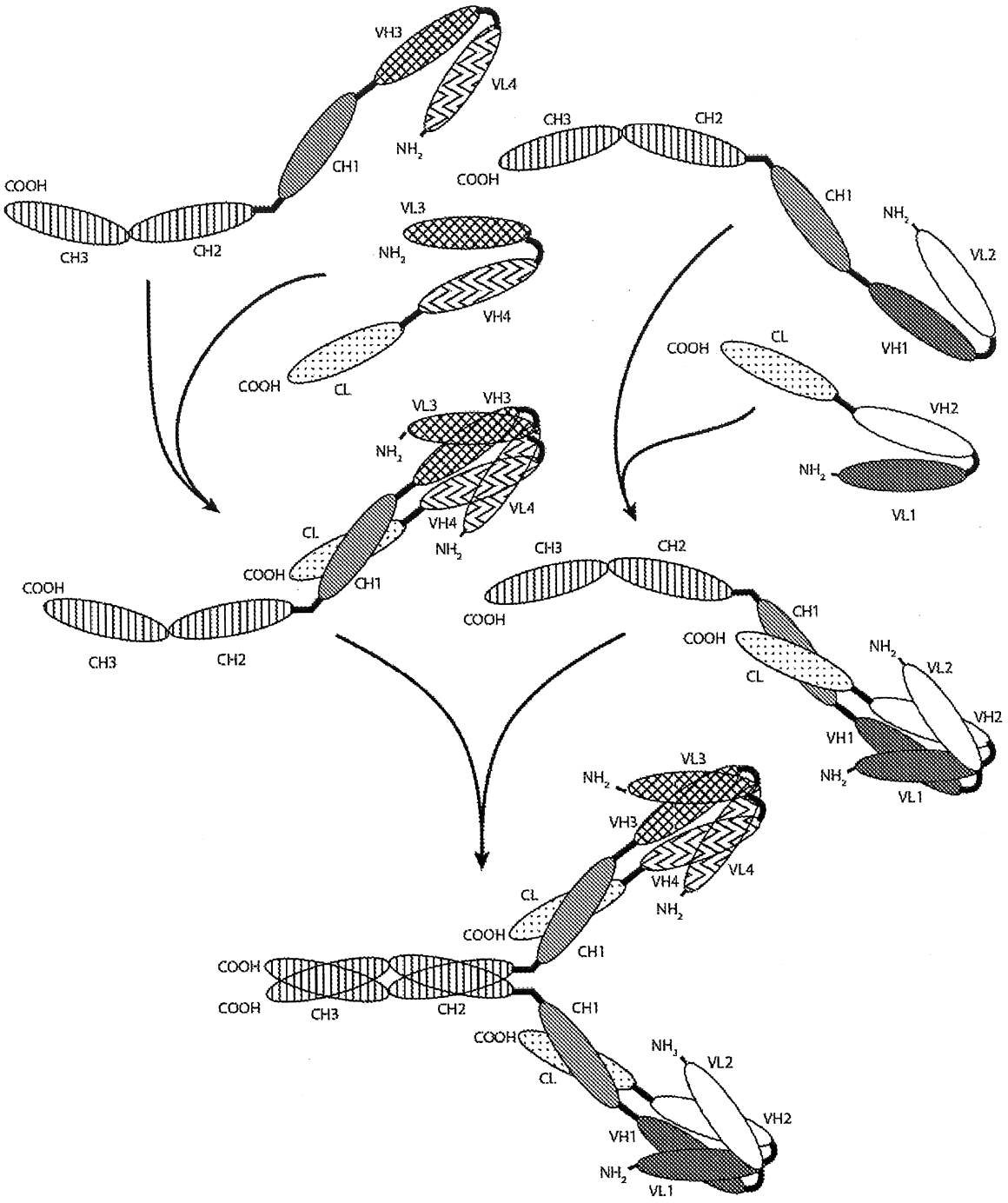

VH3
VL4
NH2
CH1
COOH
CH3
CH2
VL3
NH2
VH4
COOH
CL
CH3
CH2
COOH
CH1
NH2
VL2
VH1
CL
COOH
VH2
NH2
VL1
VL3
VH3
NH2
VH4
VL4
CL
COOH
CH1
COOH
CH3
CH2
CH3
CH2
COOH
CH1
COOH
CL
NH2
VL2
VH2
VH1
NH2
VL1
VL3
NH2
VH3
VH4
VL4
NH2
CL
COOH
CH1
COOH
COOH
CH3
CH2
CH1
COOH
CL
NH2
VL2
VH2
VH1
NH2
VL1

Fig. 3C

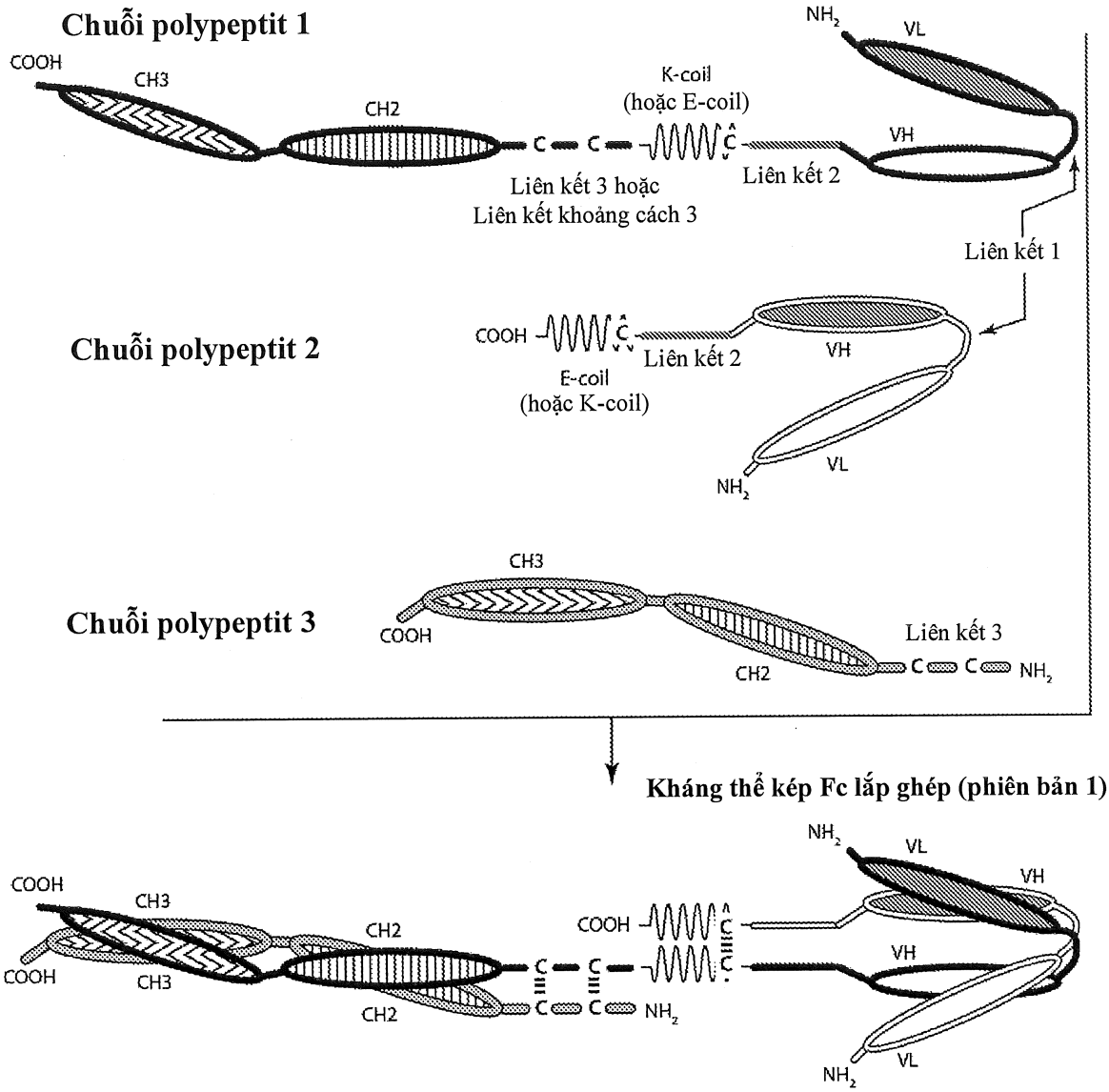

Chuỗi polypeptit 1
COOH
CH3
CH2
K-coil
(hoặc E-coil)
Liên kết 3 hoặc
Liên kết khoảng cách 3
Liên kết 2
NH2
VL
VH
Liên kết 1
Chuỗi polypeptit 2
COOH
E-coil
(hoặc K-coil)
Liên kết 2
VH
VL
NH2
Chuỗi polypeptit 3
CH3
COOH
CH2
Liên kết 3
NH2
Kháng thể kép Fc lắp ghép (phiên bản 1)
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
NH2
VL
VH
VH
VL
NH2

Fig. 4A

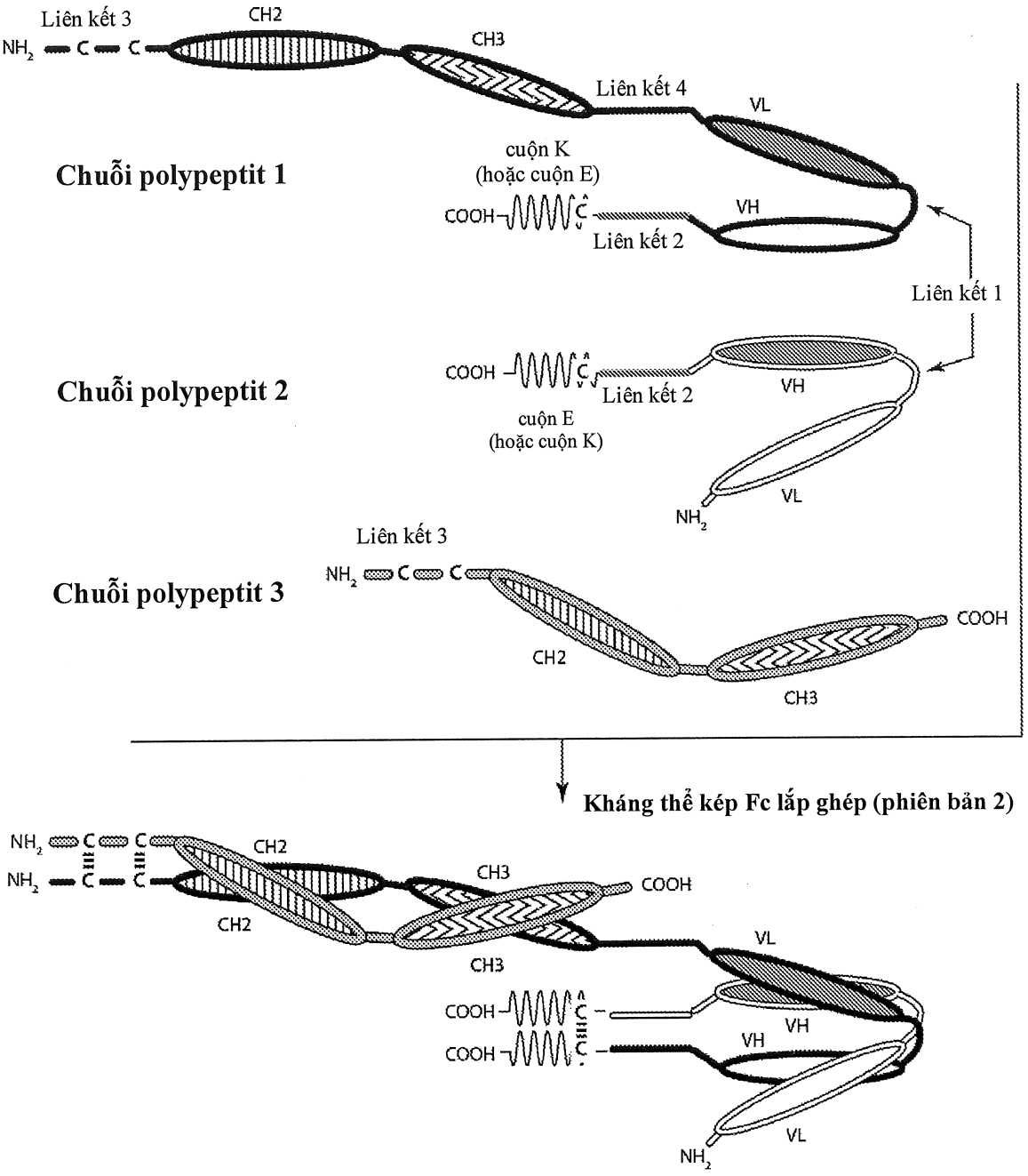

Liên kết 3
CH2
CH3
Liên kết 4
VL
Chuỗi polypeptit 1
cuộn K
(hoặc cuộn E)
COOH
VH
Liên kết 2
Liên kết 1
Chuỗi polypeptit 2
COOH
Liên kết 2
VH
cuộn E
(hoặc cuộn K)
VL
Liên kết 3
Chuỗi polypeptit 3
COOH
CH2
CH3
Kháng thể kép Fc lắp ghép (phiên bản 2)
CH2
CH3
COOH
CH2
VL
CH3
COOH
VH
COOH
VH
VL

Fig. 4B

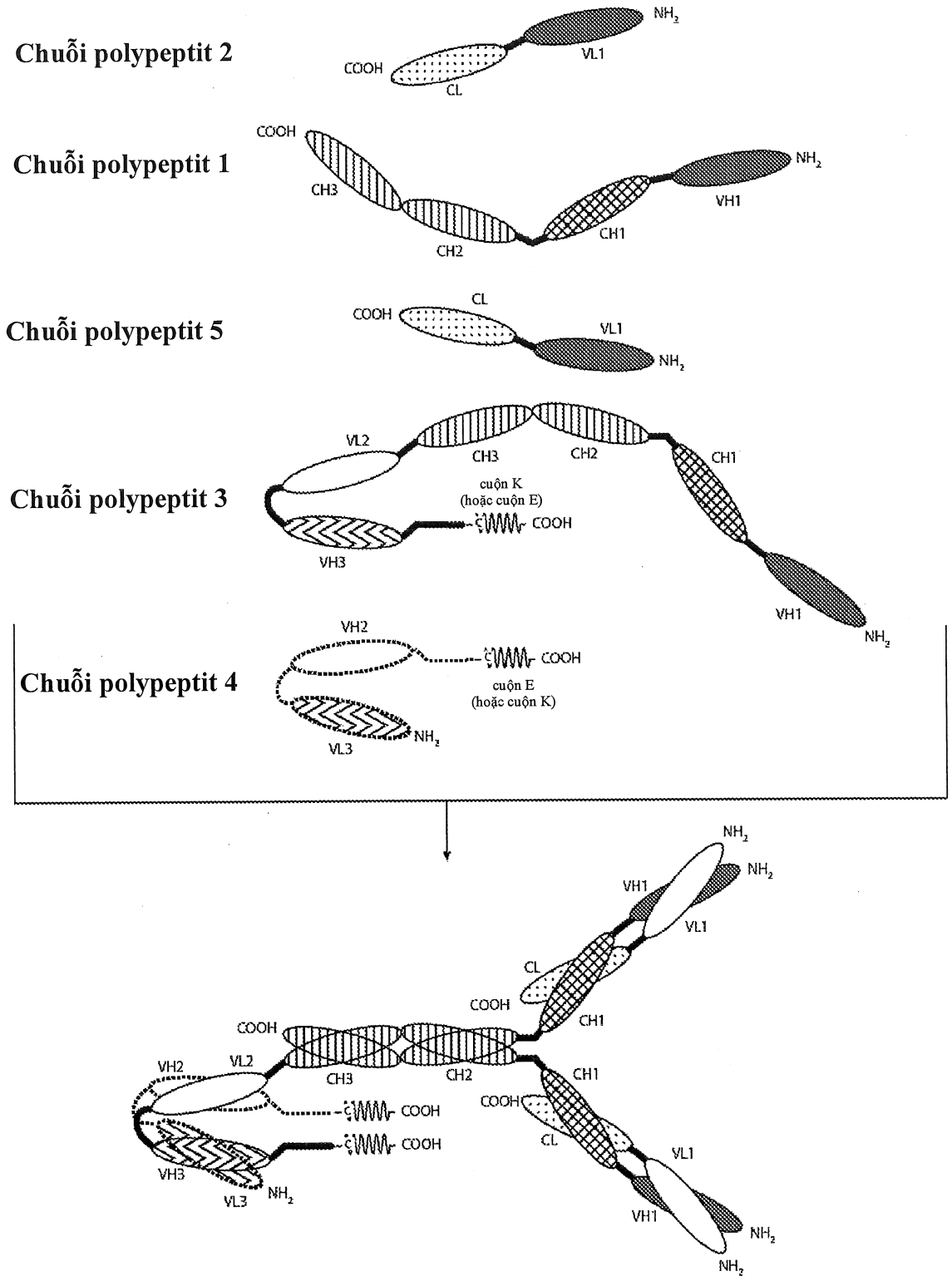

Chuỗi polypeptit 2
NH2
VL1
COOH
CL
Chuỗi polypeptit 1
COOH
CH3
NH2
VH1
CH1
CH2
Chuỗi polypeptit 5
CL
COOH
VL1
NH2
Chuỗi polypeptit 3
VL2
CH3
CH2
CH1
cuộn K
(hoặc cuộn E)
COOH
VH3
VH1
NH2
Chuỗi polypeptit 4
VH2
COOH
cuộn E
(hoặc cuộn K)
VL3
NH2
NH2
NH2
VH1
VL1
CL
COOH
CH1
COOH
VH2
VL2
CH3
CH2
CH1
COOH
COOH
CL
VL1
VH3
NH2
VL3
VH1
NH2
NH2

Fig. 5

9/38

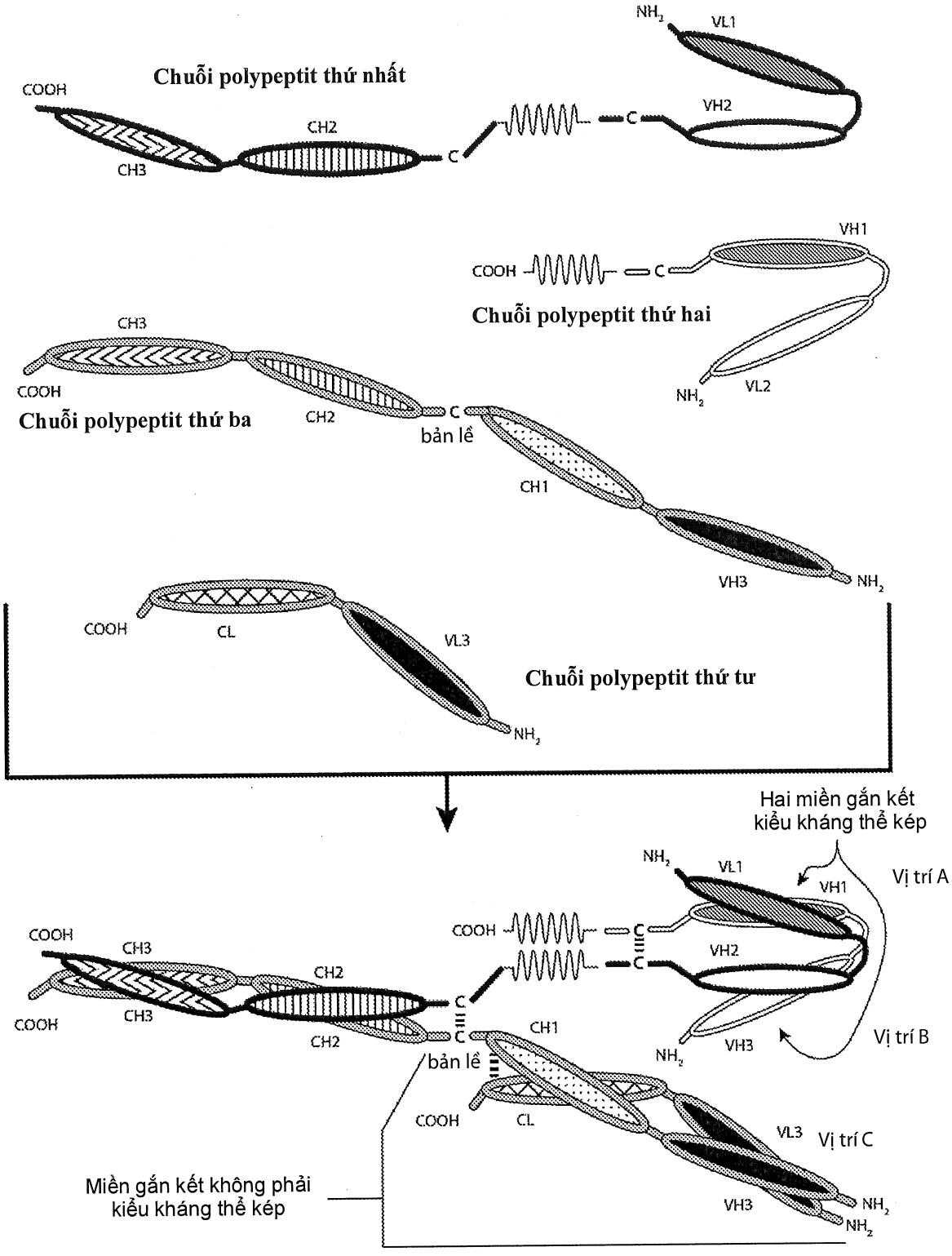

Chuỗi polypeptit thứ nhất
COOH
CH2
CH3
C
NH2
VL1
VH2
Chuỗi polypeptit thứ hai
VH1
COOH
C
NH2
VL2
Chuỗi polypeptit thứ ba
CH3
COOH
CH2
C
bản lề
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Chuỗi polypeptit thứ tư
NH2
Hai miền gắn kết
kiểu kháng thể kép
Vị trí A
Vị trí B
Vị trí C
COOH
CH3
CH3
COOH
CH2
CH2
C
C
C
C
CH1
bản lề
COOH
CL
VL3
VH3
NH2
NH2
Miền gắn kết không phải
kiểu kháng thể kép

Fig. 6A

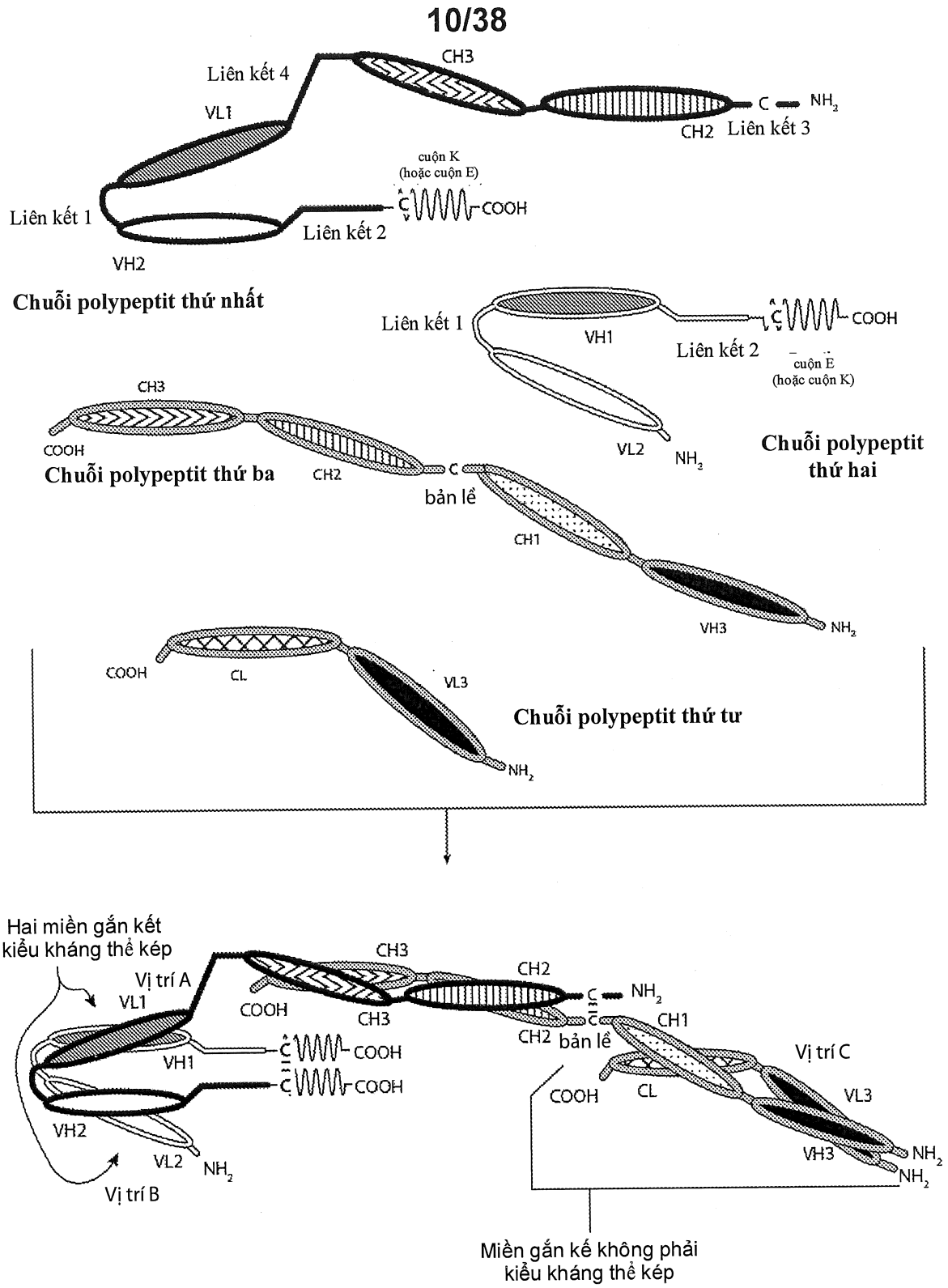

10/38
Liên kết 4
CH3
VL1
C
NH2
CH2
Liên kết 3
cuộn K
(hoặc cuộn E)
Liên kết 1
COOH
Liên kết 2
VH2
Chuỗi polypeptit thứ nhất
Liên kết 1
VH1
COOH
Liên kết 2
cuộn E
(hoặc cuộn K)
CH3
VL2
NH2
COOH
Chuỗi polypeptit thứ ba
CH2
Chuỗi polypeptit
thứ hai
bản lề
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Chuỗi polypeptit thứ tư
NH2
Hai miền gắn kết
kiểu kháng thể kép
CH3
Vị trí A
VL1
CH2
COOH
CH3
C
NH2
CH2
bản lề
CH1
VH1
COOH
COOH
Vị trí C
VH2
COOH
CL
VL3
VH3
NH2
VL2
NH2
NH2
Vị trí B
Miền gắn kế không phải
kiểu kháng thể kép

Fig. 6B

11/38

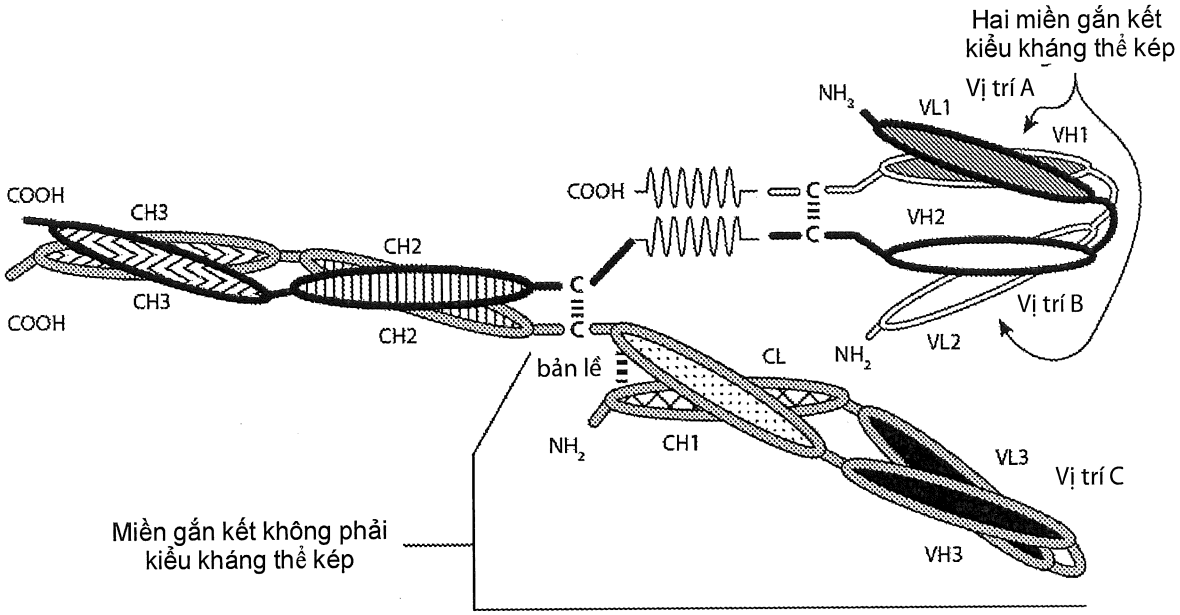


Fig. 6C

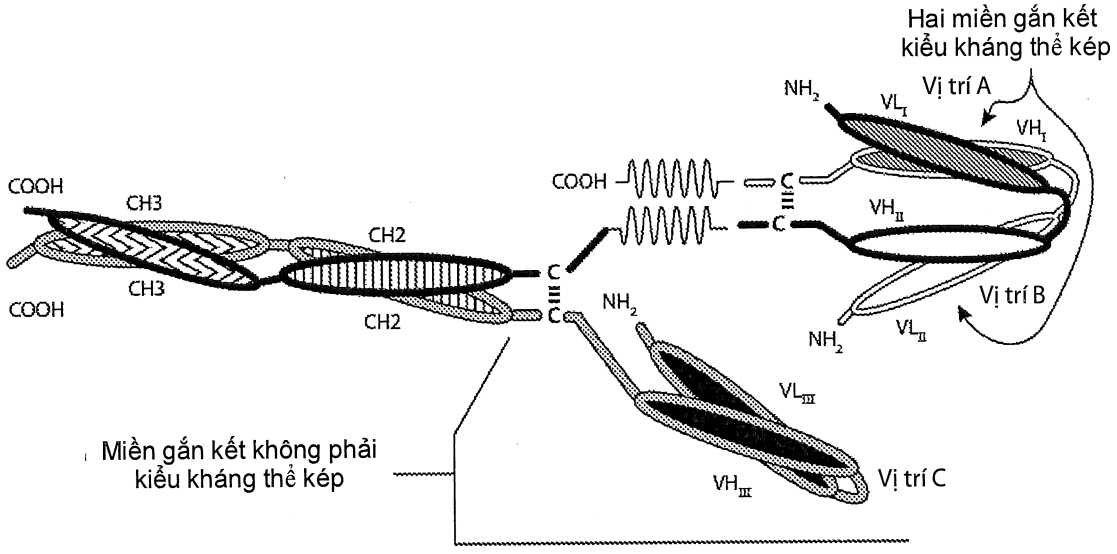


Fig. 6D

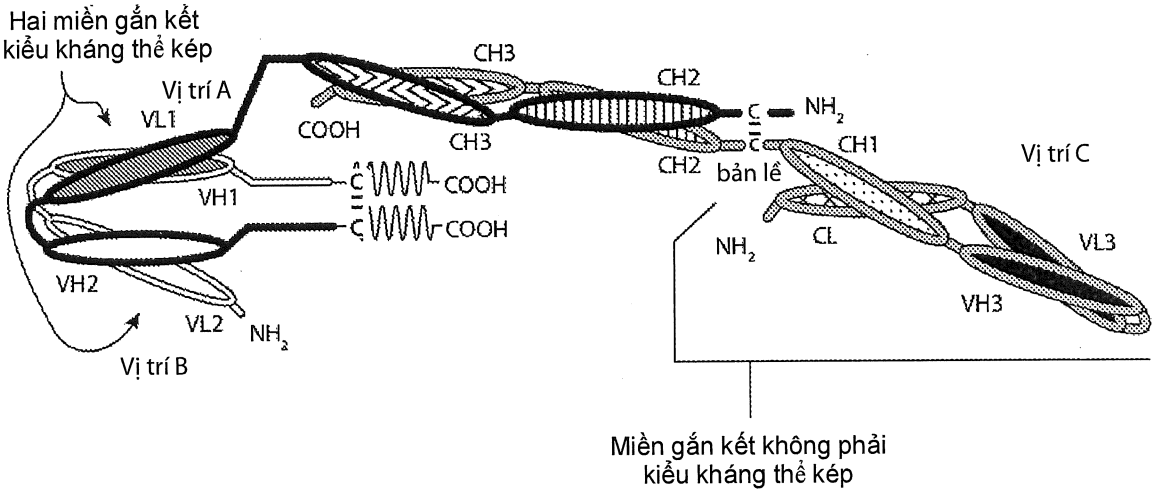

Hai miền gắn kết
kiểu kháng thể kép
Vị trí A
VL1
CH3
COOH
CH3
CH2
CH2
NH2
CH1
Vị trí C
VH1
COOH
COOH
bản lề
NH2
CL
VL3
VH3
VH2
VL2
NH2
Vị trí B
Miền gắn kết không phải
kiểu kháng thể kép

Fig. 6E

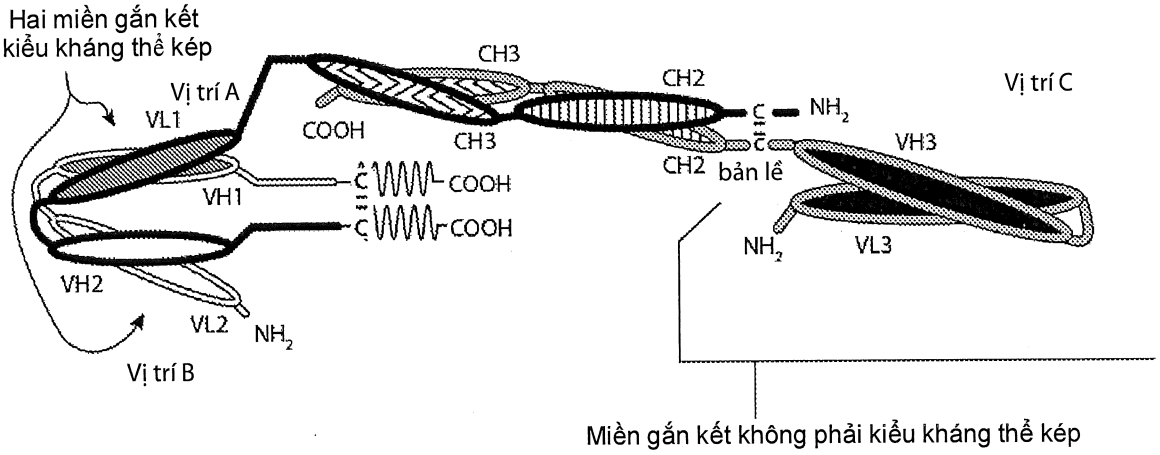

Hai miền gắn kết
kiểu kháng thể kép
Vị trí A
VL1
CH3
COOH
CH3
CH2
CH2
NH2
Vị trí C
VH3
VH1
COOH
COOH
bản lề
NH2
VL3
VH2
VL2
NH2
Vị trí B
Miền gắn kết không phải kiểu kháng thể kép

Fig. 6F

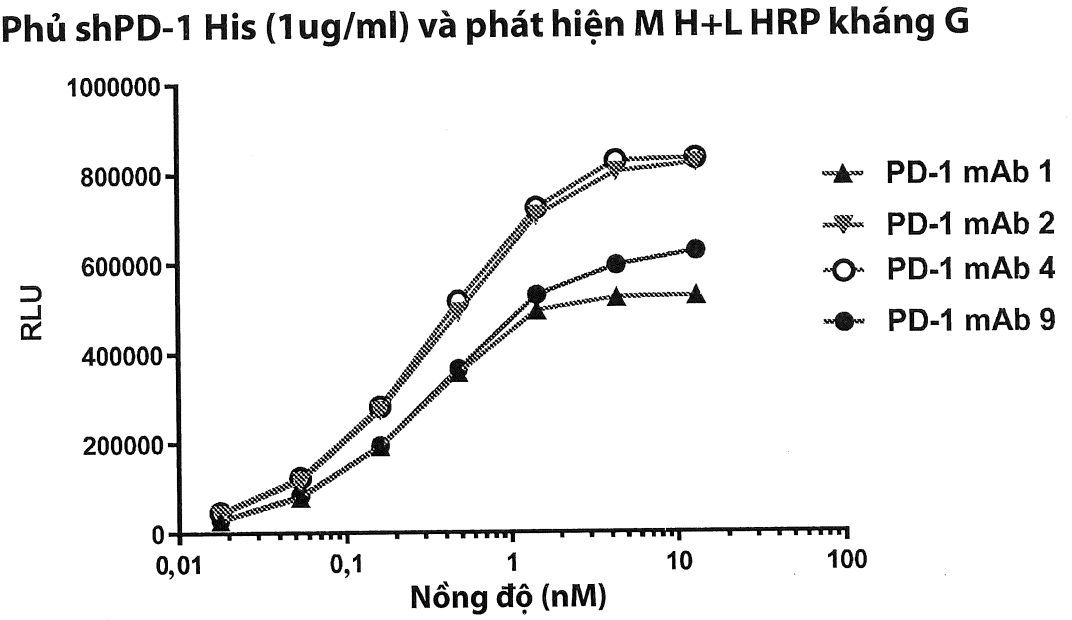

Phủ shPD-1 His (1ug/ml) và phát hiện M H+L HRP kháng G
1000000
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ (nM)
PD-1 mAb 1
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 4
PD-1 mAb 9

Fig. 7A

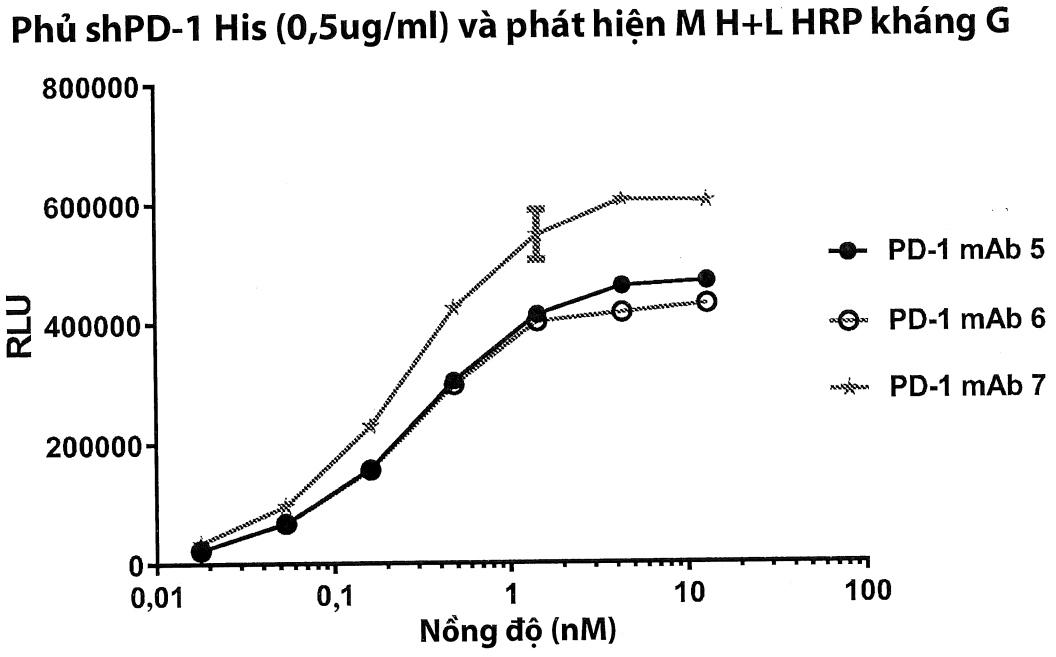

Phủ shPD-1 His (0,5ug/ml) và phát hiện M H+L HRP kháng G
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ (nM)
PD-1 mAb 5
PD-1 mAb 6
PD-1 mAb 7

Fig. 7B

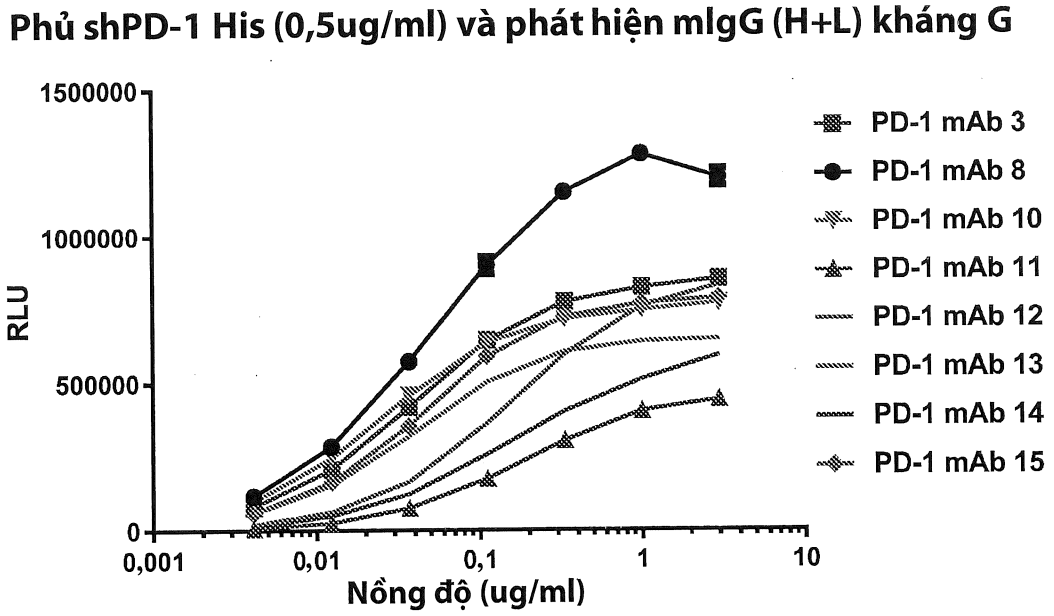

Phủ shPD-1 His (0,5ug/ml) và phát hiện mIgG (H+L) kháng G
1500000
1000000
500000
0
RLU
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ (ug/ml)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

Fig. 7C

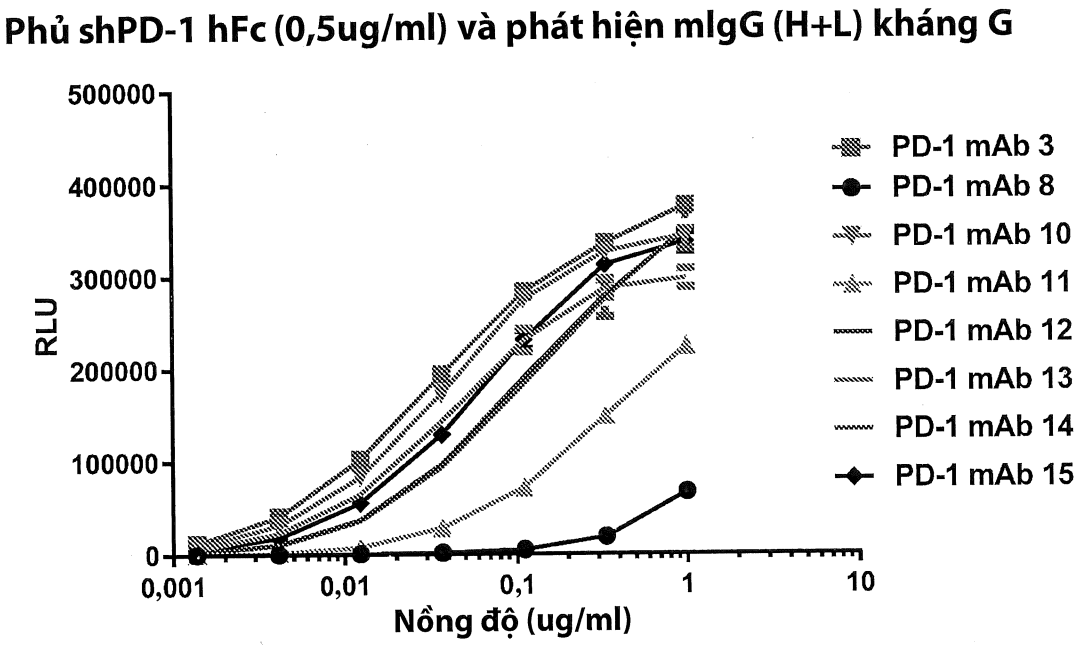

Phủ shPD-1 hFc (0,5ug/ml) và phát hiện mIgG (H+L) kháng G
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ (ug/ml)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

Fig. 7D

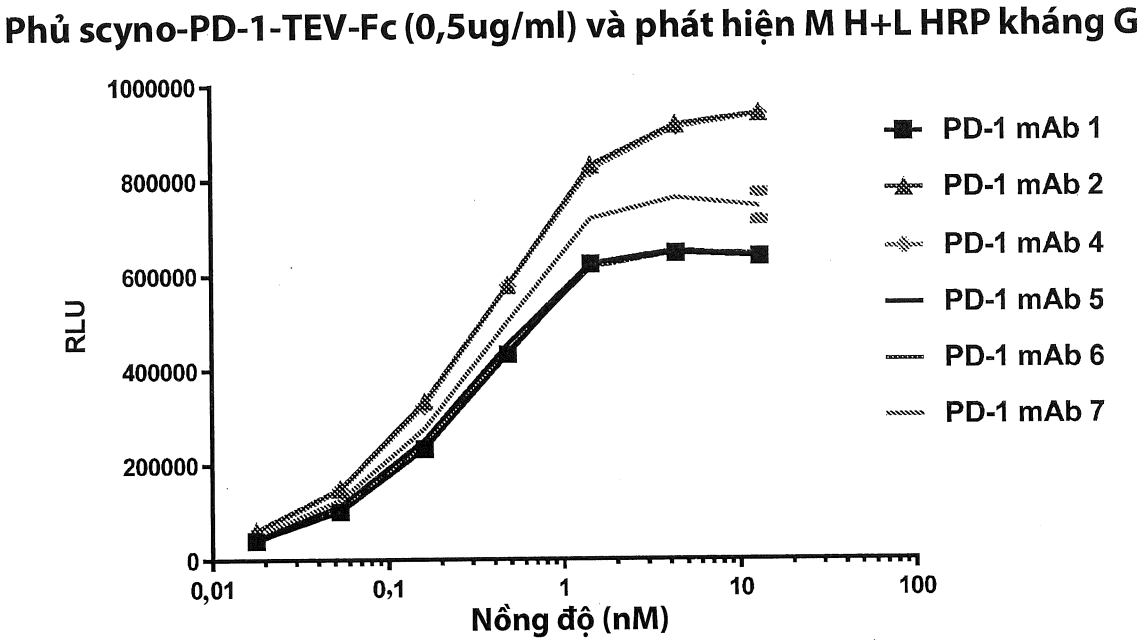

Phủ scyno-PD-1-TEV-Fc (0,5ug/ml) và phát hiện M H+L HRP kháng G
1000000
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ (nM)
PD-1 mAb 1
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 4
PD-1 mAb 5
PD-1 mAb 6
PD-1 mAb 7

Fig. 8A

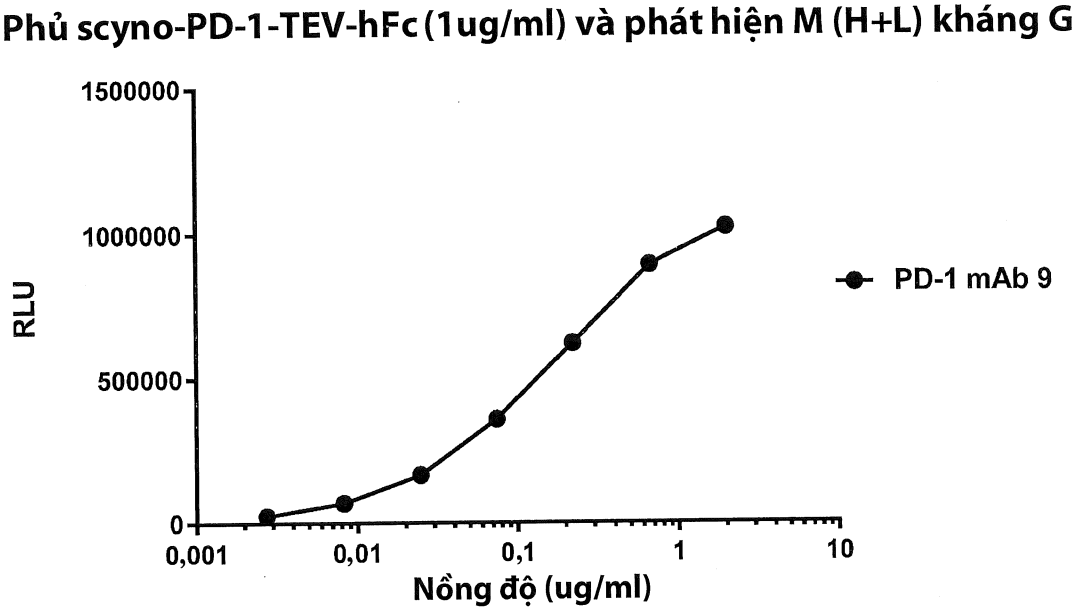

Phủ scyno-PD-1-TEV-hFc (1ug/ml) và phát hiện M (H+L) kháng G
1500000
1000000
500000
0
RLU
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ (ug/ml)
PD-1 mAb 9

Fig. 8B

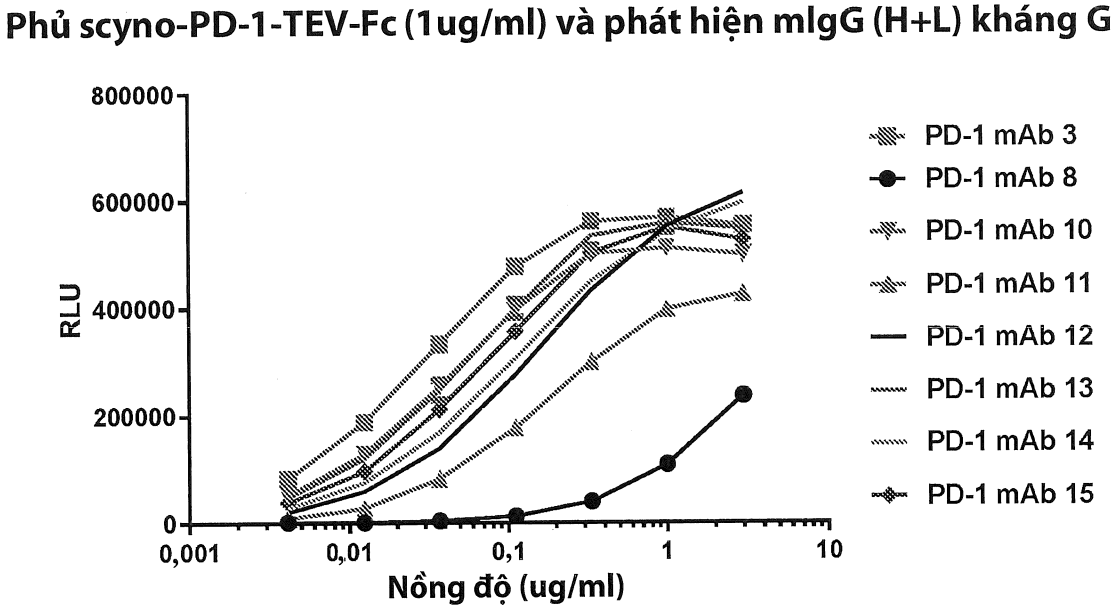

Phủ scyno-PD-1-TEV-Fc (1ug/ml) và phát hiện mIgG (H+L) kháng G
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ (ug/ml)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

Fig. 8C

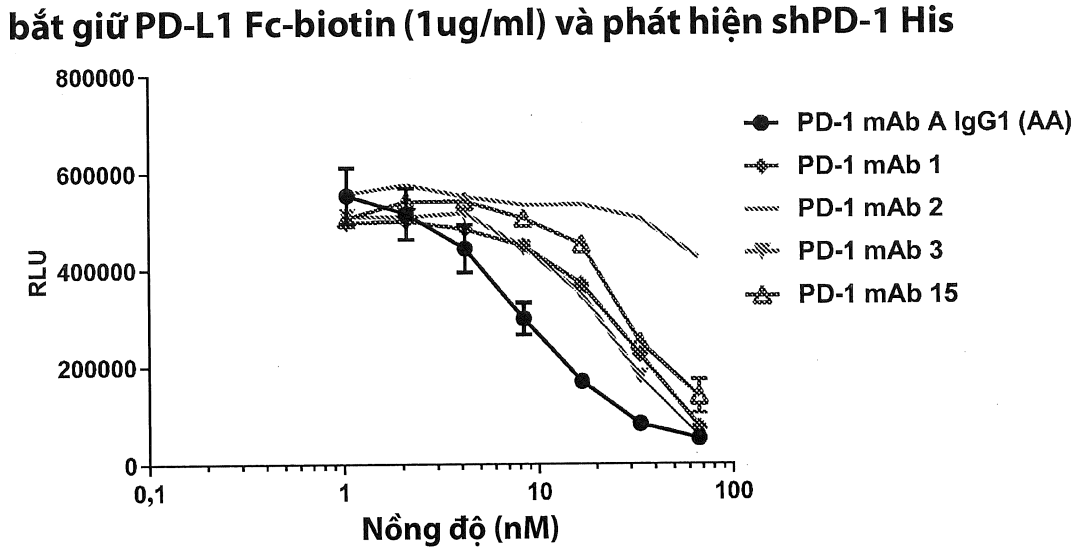

bắt giữ PD-L1 Fc-biotin (1ug/ml) và phát hiện shPD-1 His
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0,1
1
10
100
Nồng độ (nM)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 1
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 15

Fig. 9A

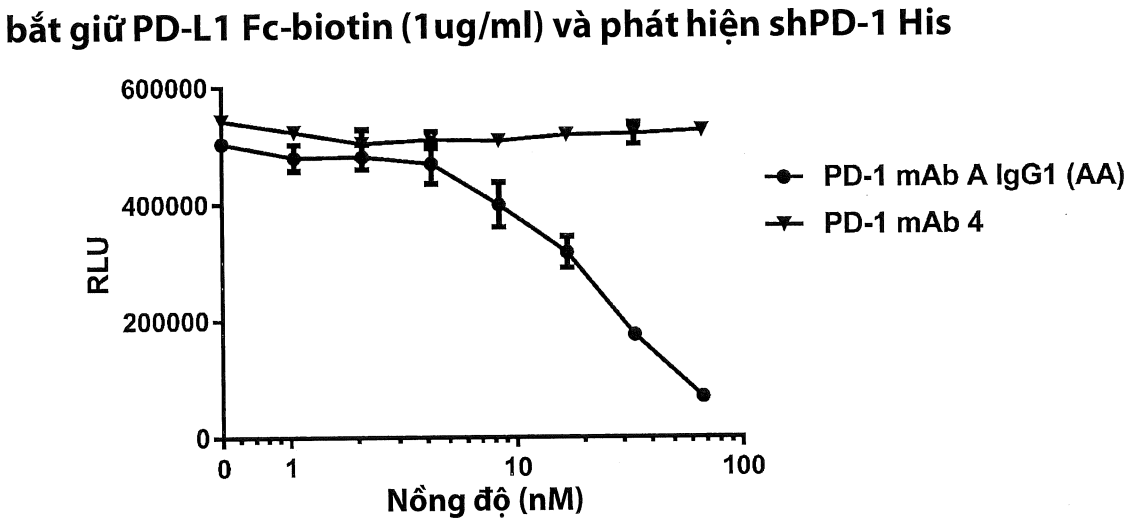

bắt giữ PD-L1 Fc-biotin (1ug/ml) và phát hiện shPD-1 His
600000
400000
200000
0
RLU
0
1
10
100
Nồng độ (nM)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 4

Fig. 9B

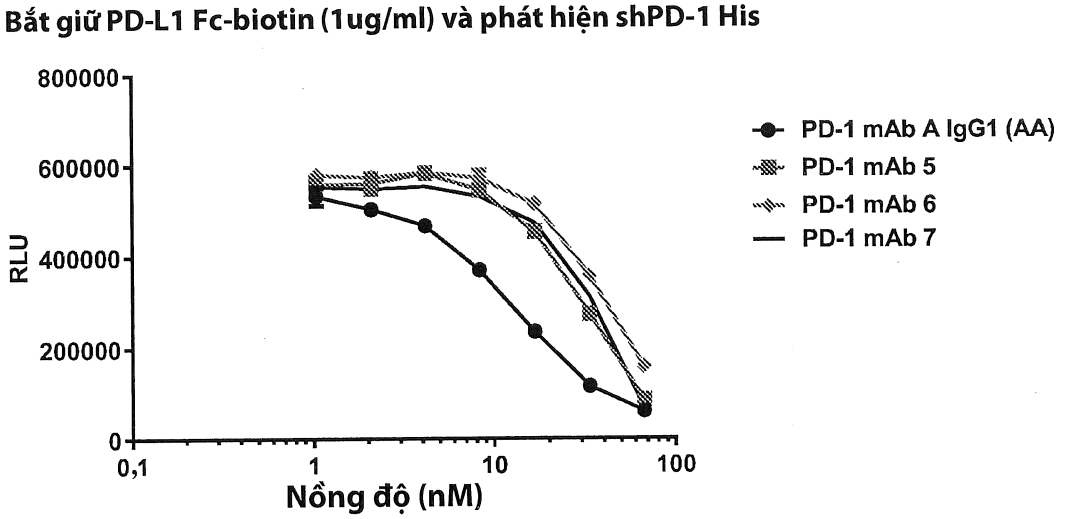

Bắt giữ PD-L1 Fc-biotin (1ug/ml) và phát hiện shPD-1 His
800000
600000
400000
200000
0
RLU
0,1
1
10
100
Nồng độ (nM)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 5
PD-1 mAb 6
PD-1 mAb 7

Fig. 9C

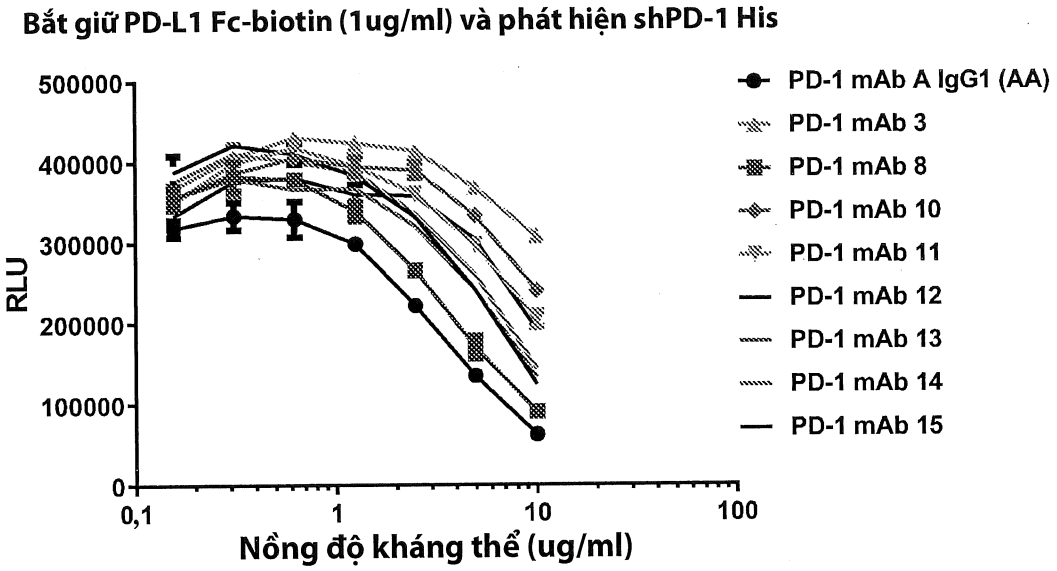

Bắt giữ PD-L1 Fc-biotin (1ug/ml) và phát hiện shPD-1 His
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (ug/ml)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb 3
PD-1 mAb 8
PD-1 mAb 10
PD-1 mAb 11
PD-1 mAb 12
PD-1 mAb 13
PD-1 mAb 14
PD-1 mAb 15

Fig. 9D

19/38

Mô bình thường

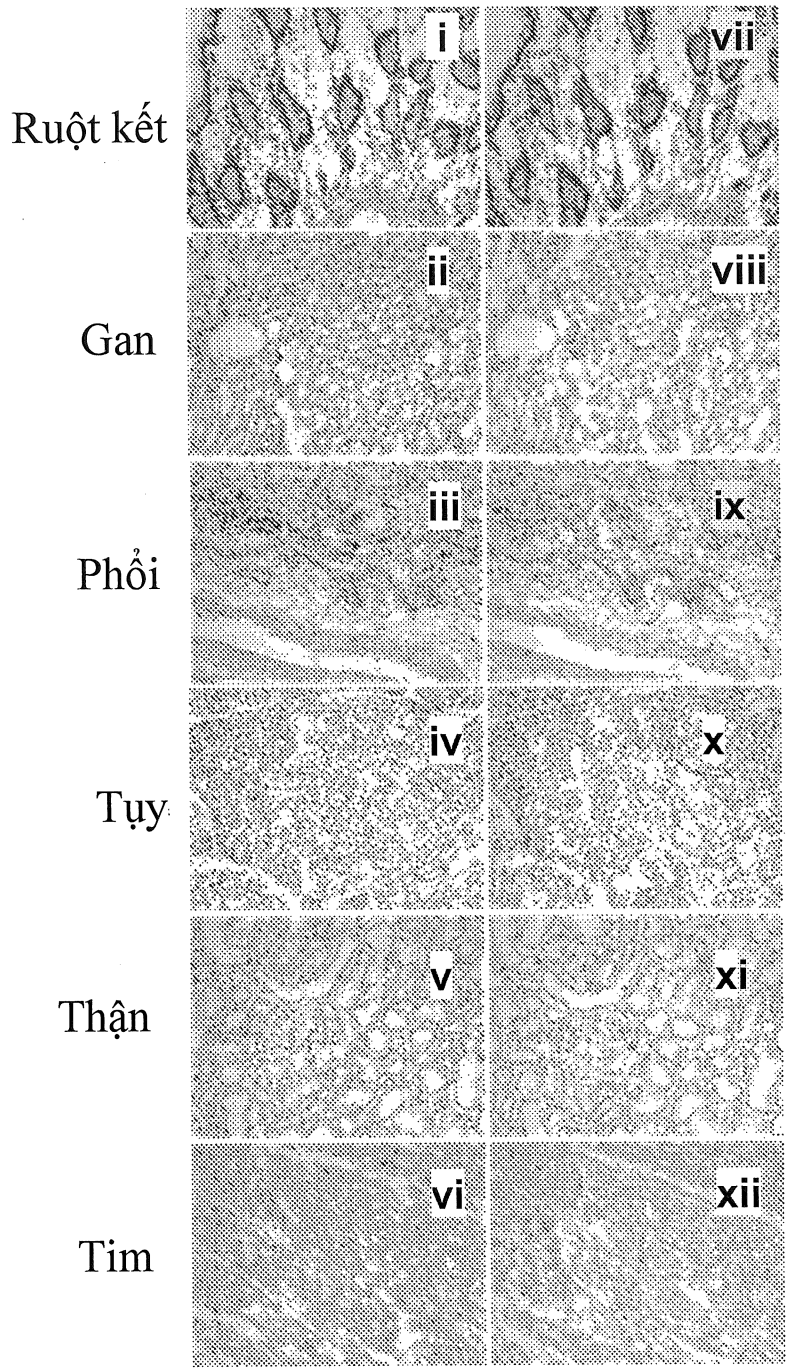


Fig. 10A

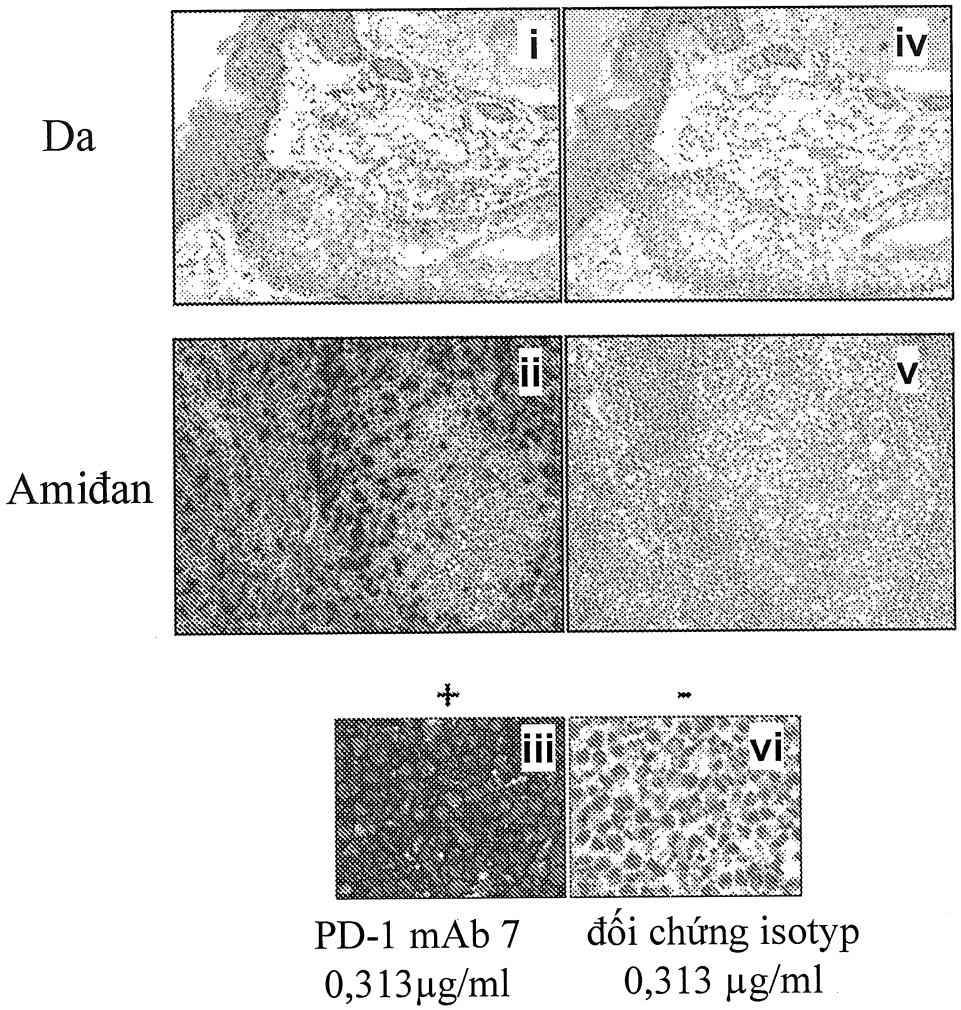
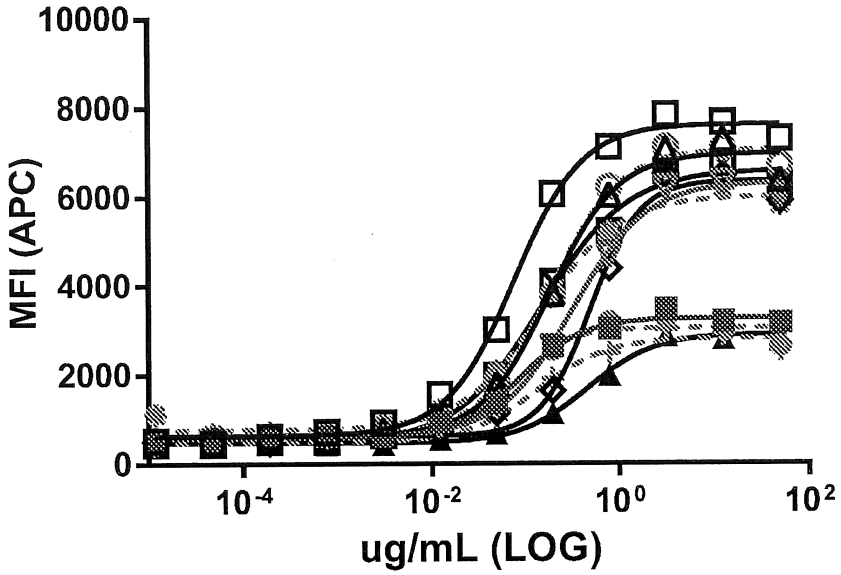

Da
Amiđan
i
iv
ii
v
+
-
iii
vi
PD-1 mAb 7
0,313µg/ml
đối chứng isotyp
0,313 µg/ml

Fig. 10B

Đường cong bão hòa
(pha loãng 1:4)



hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)

Fig. 11

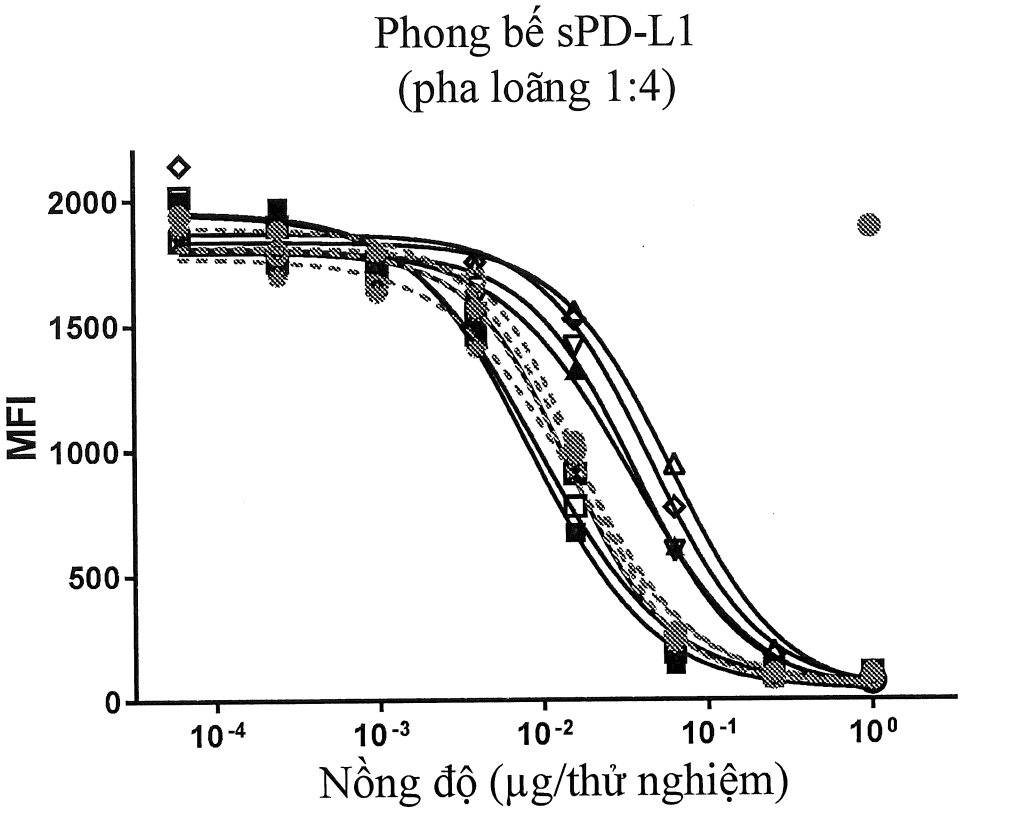

Phong bế sPD-L1
(pha loãng 1:4)
MFI
2000
1500
1000
500
0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
Nồng độ (µg/thử nghiệm)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)
Chỉ PDL1
Không nhuộm

Fig. 12A

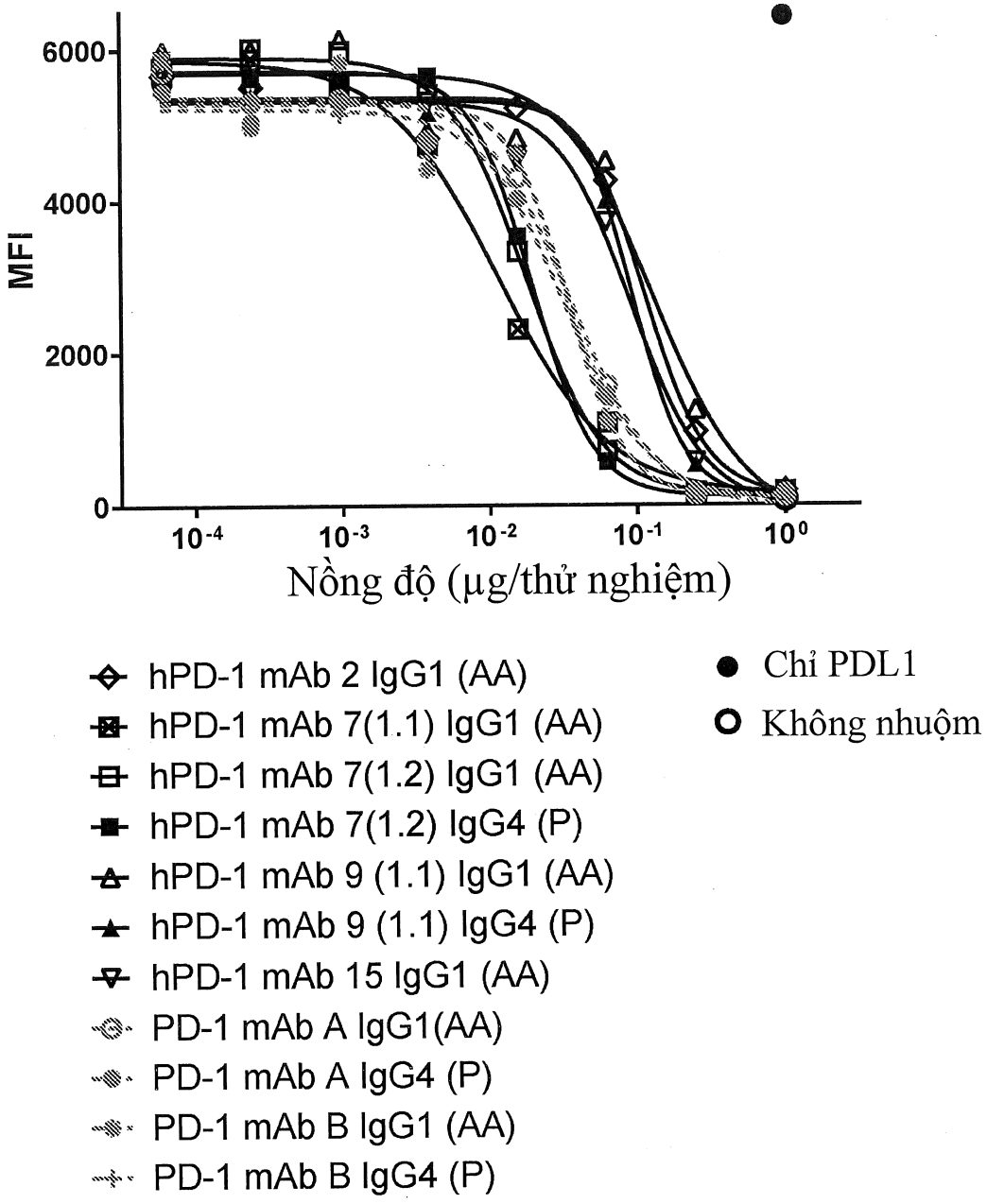

Phong bế sPD-L2
(pha loãng 1:4)
6000
4000
2000
0
MFI
10-4
10-3
10-2
10-1
100
Nồng độ (µg/thử nghiệm)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)
Chỉ PDL1
Không nhuộm

Fig. 12B

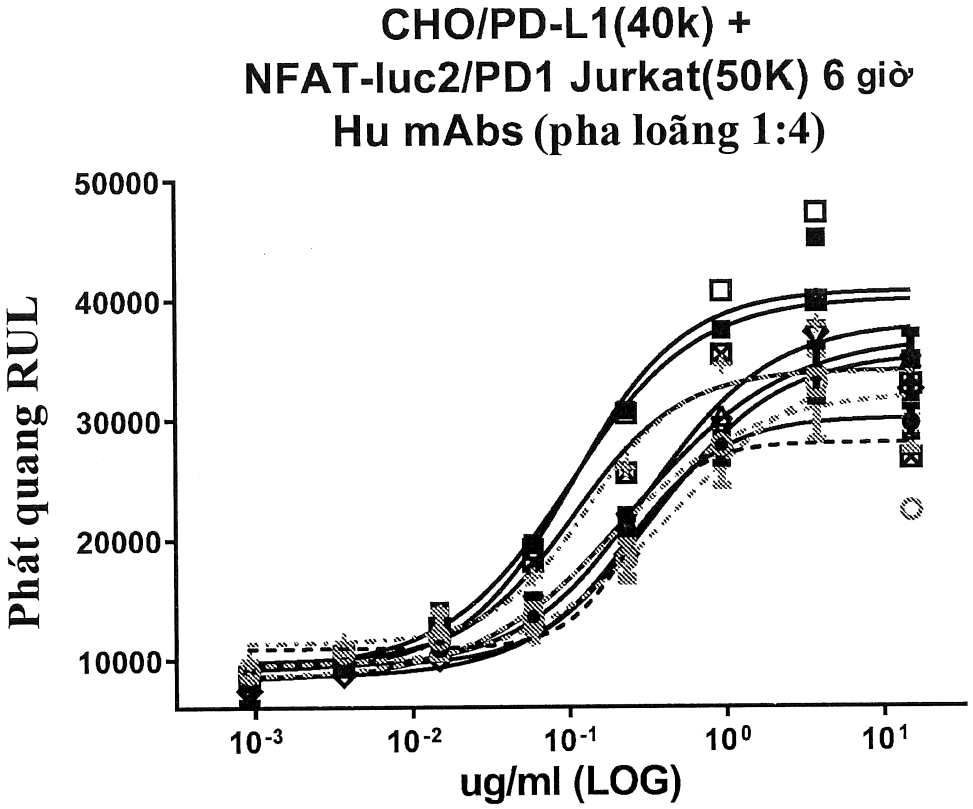

CHO/PD-L1(40k) +
NFAT-luc2/PD1 Jurkat(50K) 6 giờ
Hu mAbs (pha loãng 1:4)
Phát quang RUL
50000
40000
30000
20000
10000
10-3
10-2
10-1
100
101
ug/ml (LOG)
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4 (P)
PD-1 mAb B IgG1 (AA)
PD-1 mAb B IgG4 (P)

Fig. 13

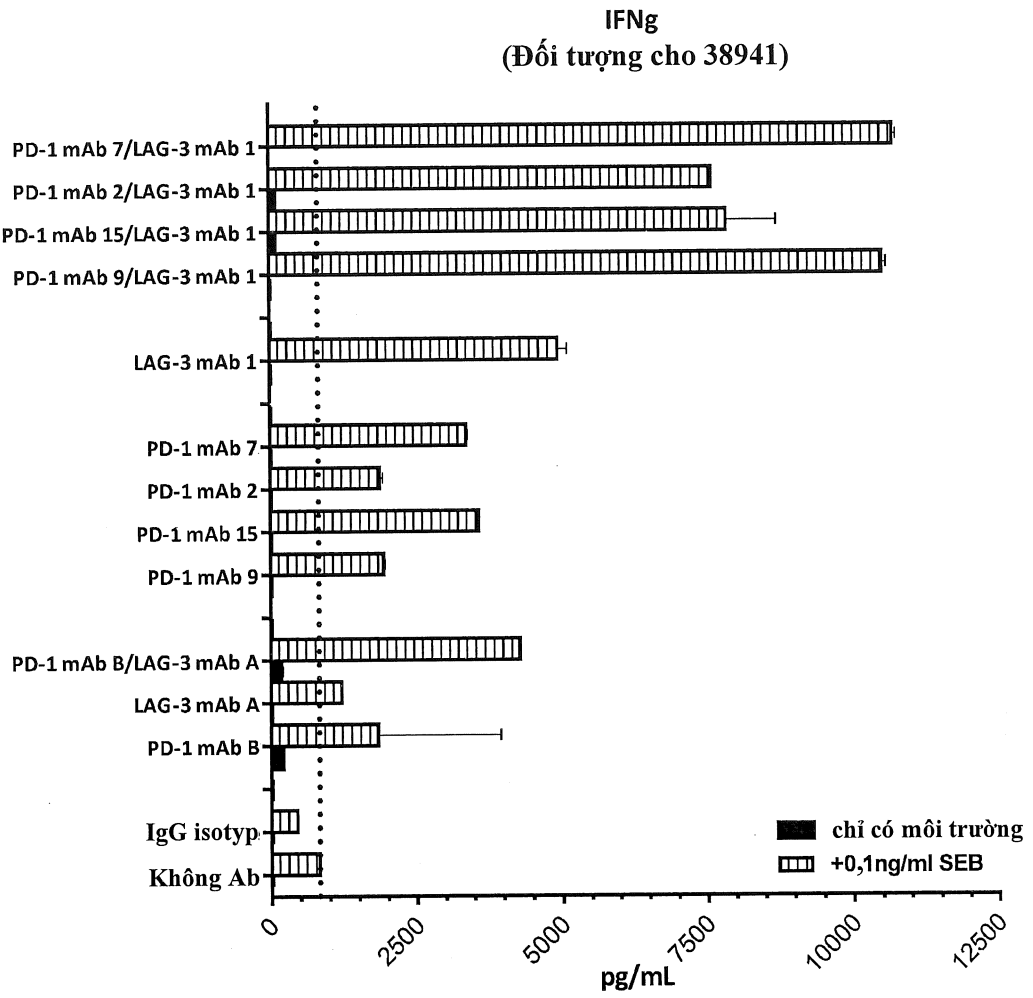

IFNg
(Đối tượng cho 38941)
PD-1 mAb 7/LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 2/LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 15/LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 9/LAG-3 mAb 1
LAG-3 mAb 1
PD-1 mAb 7
PD-1 mAb 2
PD-1 mAb 15
PD-1 mAb 9
PD-1 mAb B/LAG-3 mAb A
LAG-3 mAb A
PD-1 mAb B
IgG isotyp
Không Ab
chỉ có môi trường
+0,1ng/ml SEB
0
2500
5000
7500
10000
12500
pg/mL

Fig. 14

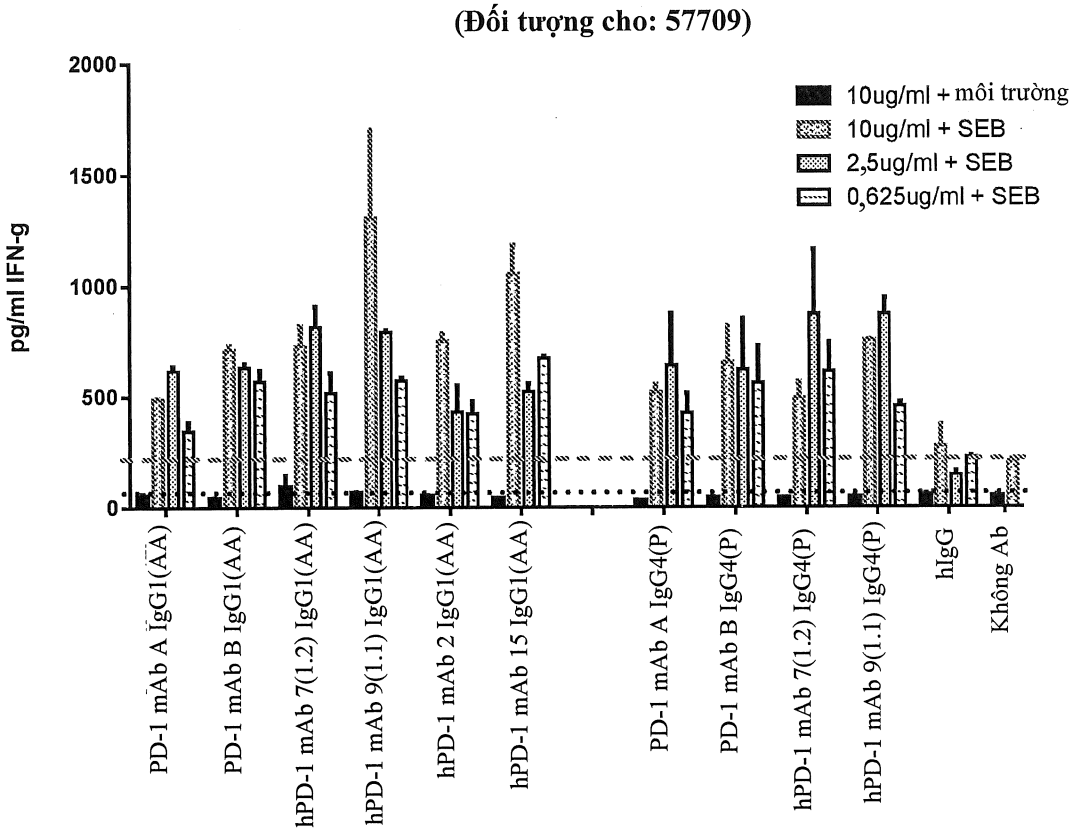

(Đối tượng cho: 57709)
pg/ml IFN-g
2000
1500
1000
500
0
10ug/ml + môi trường
10ug/ml + SEB
2,5ug/ml + SEB
0,625ug/ml + SEB
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb B IgG1(AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1(AA)
hPD-1 mAb 2 IgG1(AA)
hPD-1 mAb 15 IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4(P)
PD-1 mAb B IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4(P)
hIgG
Không Ab

Fig. 15A

27/38

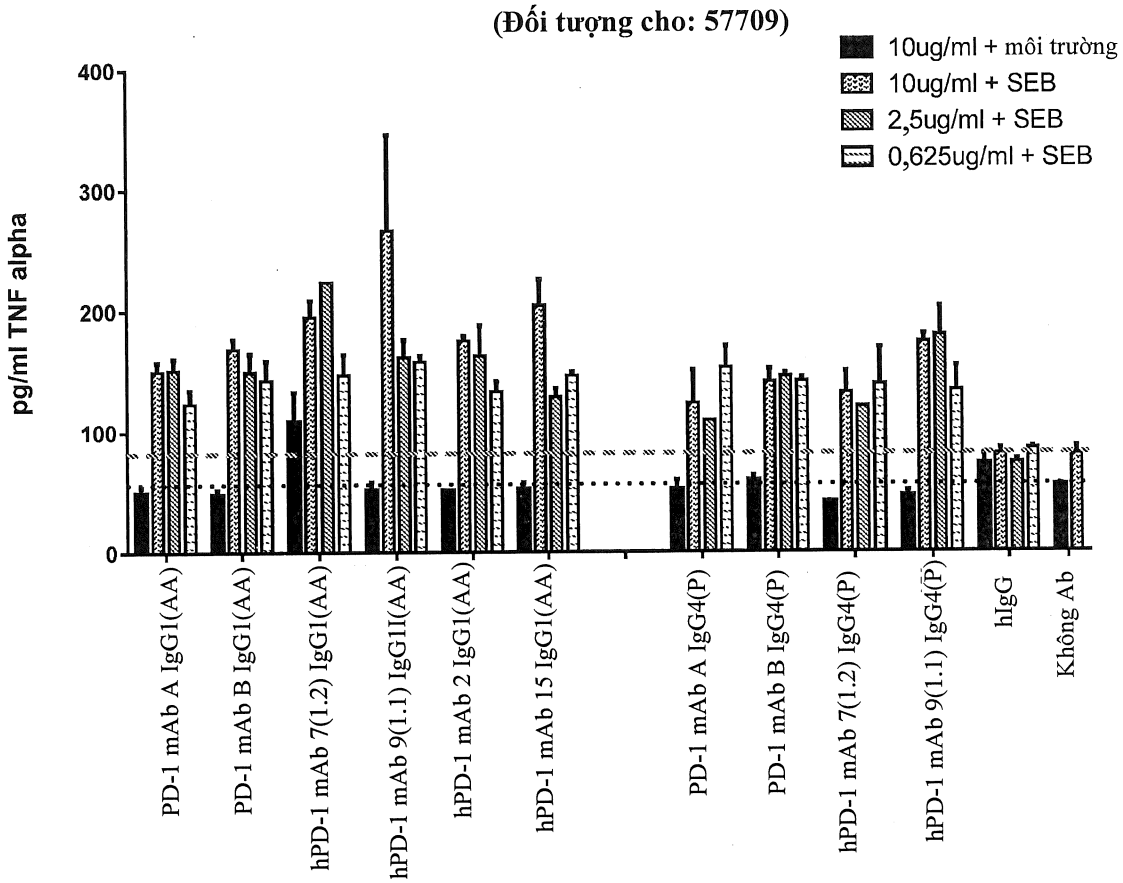

(Đối tượng cho: 57709)
10ug/ml + môi trường
10ug/ml + SEB
2,5ug/ml + SEB
0,625ug/ml + SEB
pg/ml TNF alpha
400
300
200
100
0
PD-1 mAb A IgG1(AA)
PD-1 mAb B IgG1(AA)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1I(AA)
hPD-1 mAb 2 IgG1(AA)
hPD-1 mAb 15 IgG1(AA)
PD-1 mAb A IgG4(P)
PD-1 mAb B IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4(P)
hIgG
Không Ab

Fig. 15B

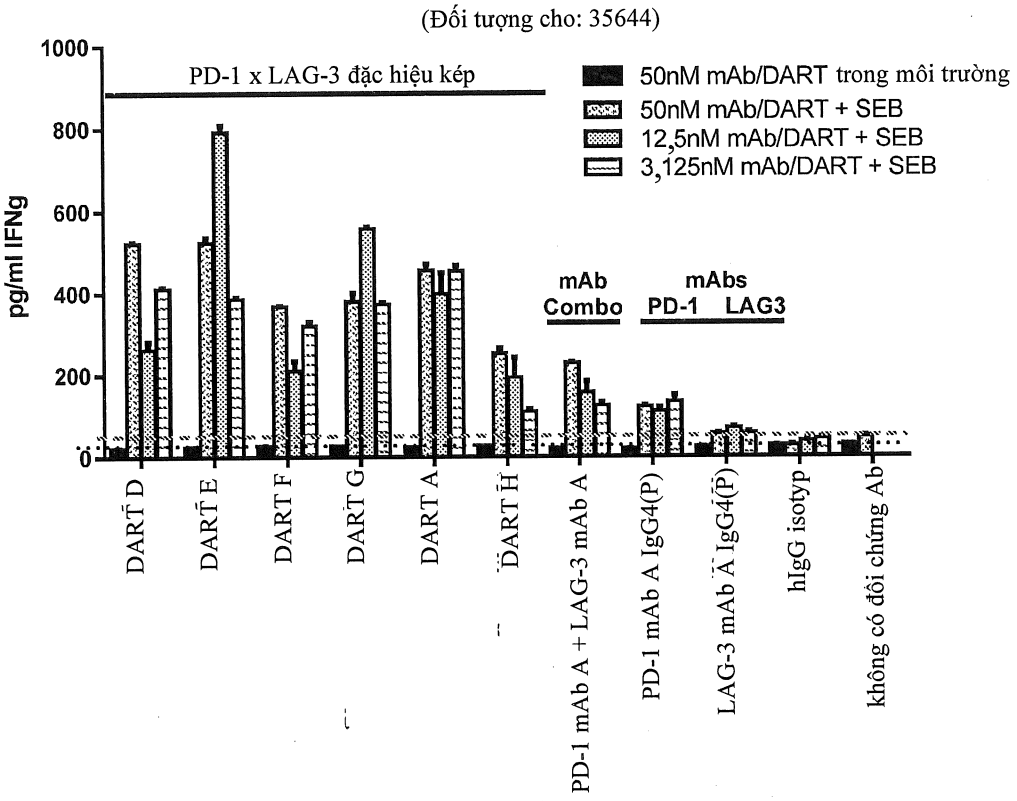


Fig. 16A

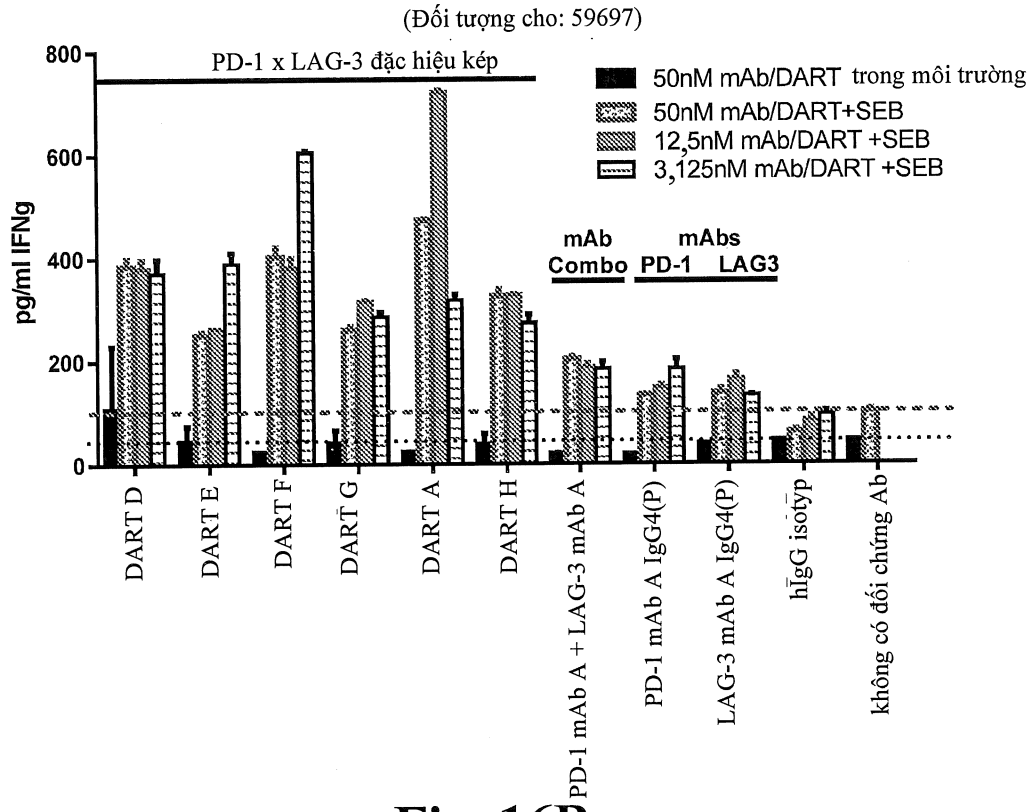


Fig. 16B

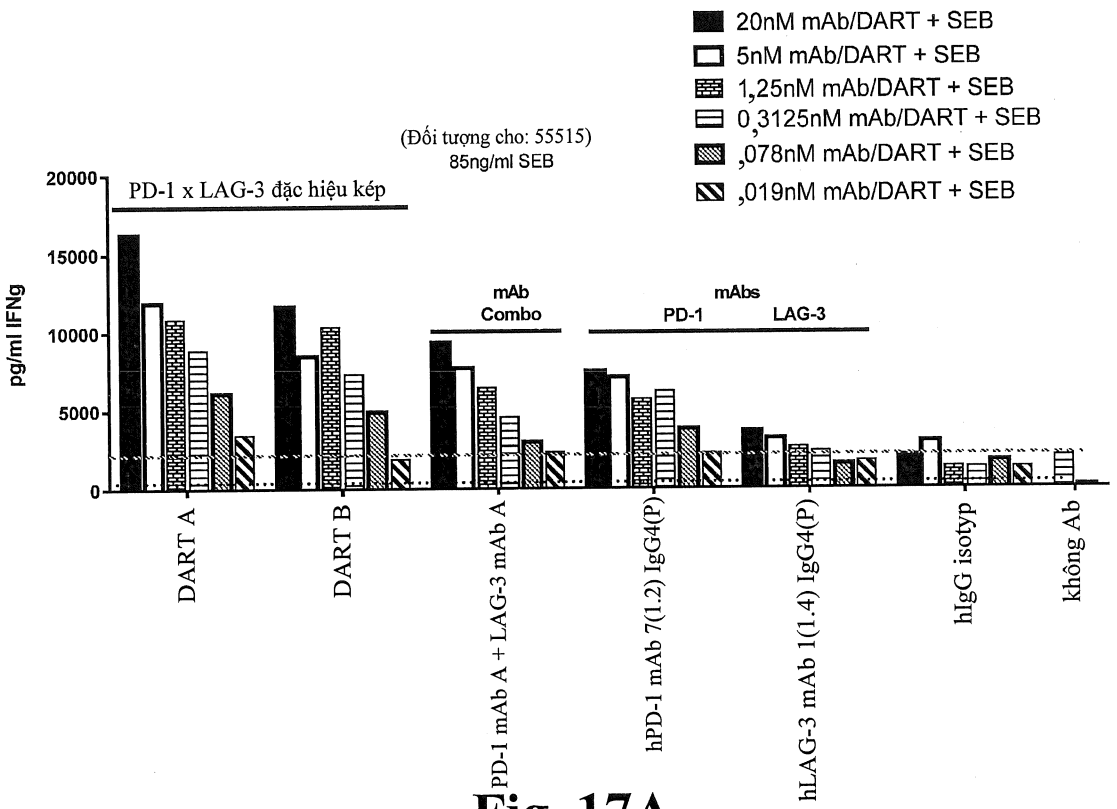


Fig. 17A

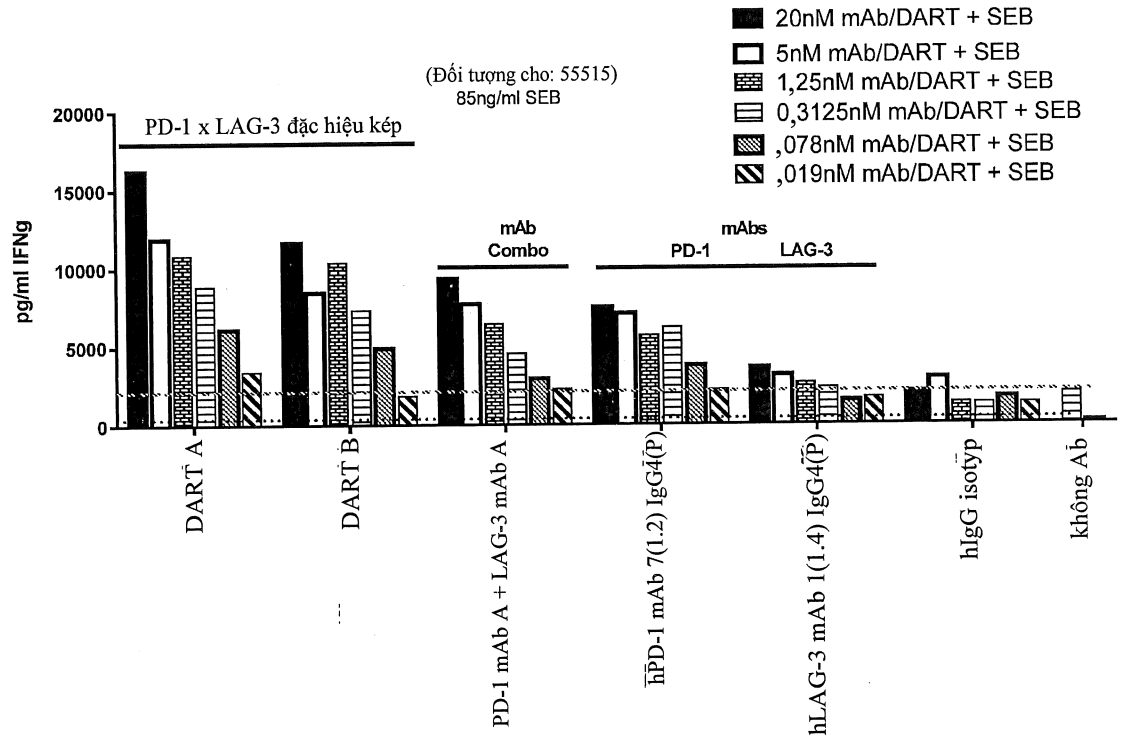


Fig. 17B

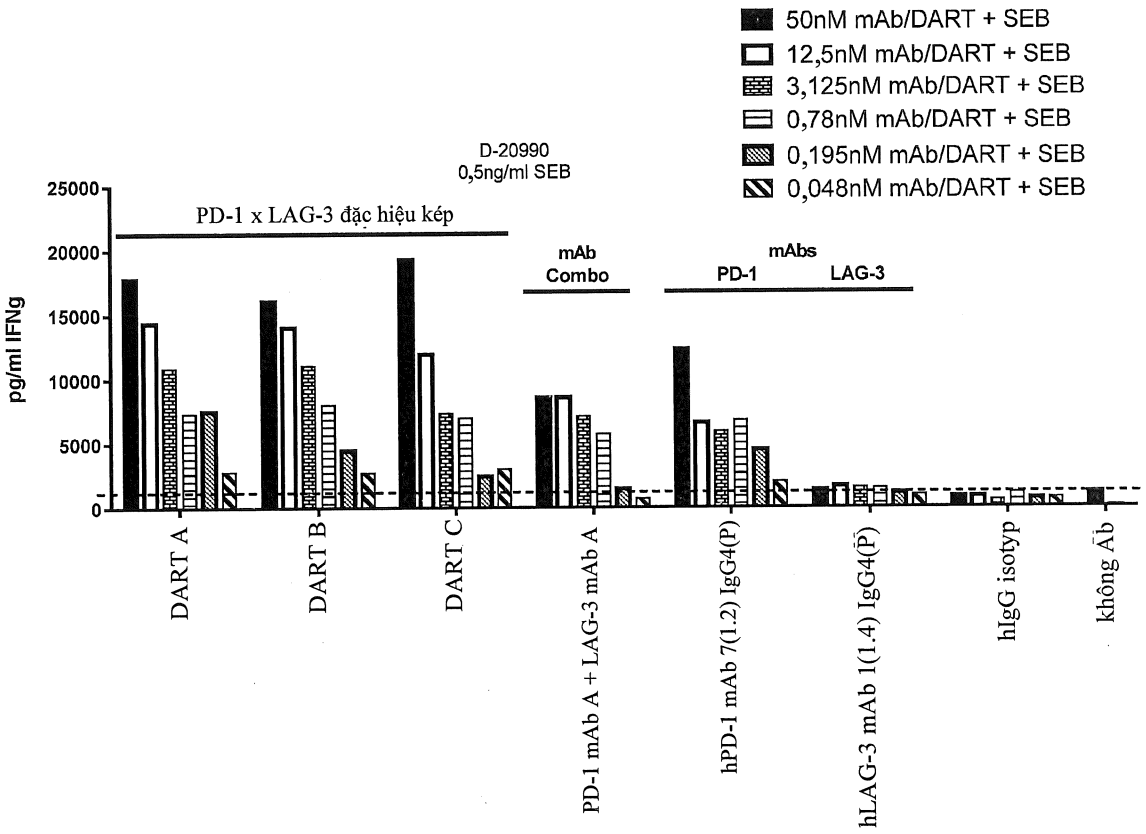

50nM mAb/DART + SEB
12,5nM mAb/DART + SEB
3,125nM mAb/DART + SEB
0,78nM mAb/DART + SEB
0,195nM mAb/DART + SEB
0,048nM mAb/DART + SEB
D-20990
0,5ng/ml SEB
PD-1 x LAG-3 đặc hiệu kép
mAb
Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNg
25000
20000
15000
10000
5000
0
DART A
DART B
DART C
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG isotyp
không Ab

Fig. 18A

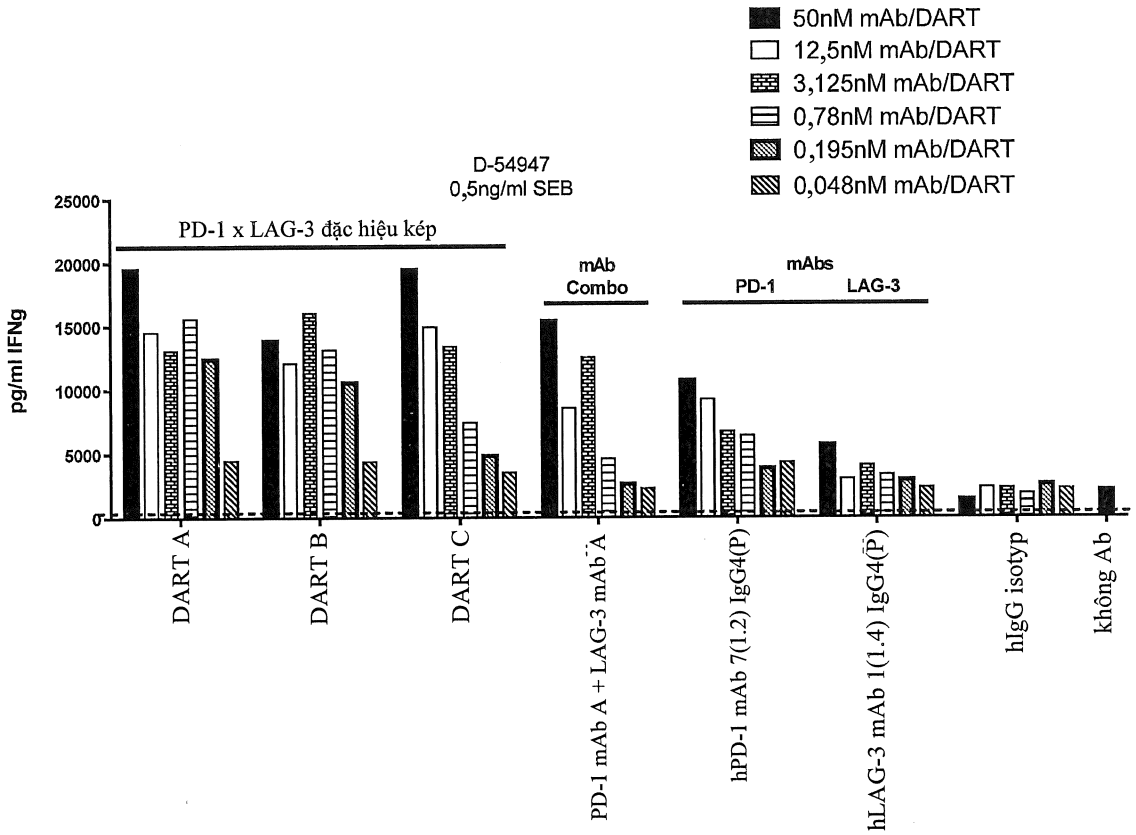

50nM mAb/DART
12,5nM mAb/DART
3,125nM mAb/DART
0,78nM mAb/DART
0,195nM mAb/DART
0,048nM mAb/DART
D-54947
0,5ng/ml SEB
PD-1 x LAG-3 đặc hiệu kép
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNg
25000
20000
15000
10000
5000
0
DART A
DART B
DART C
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG isotyp
không Ab

Fig. 18B

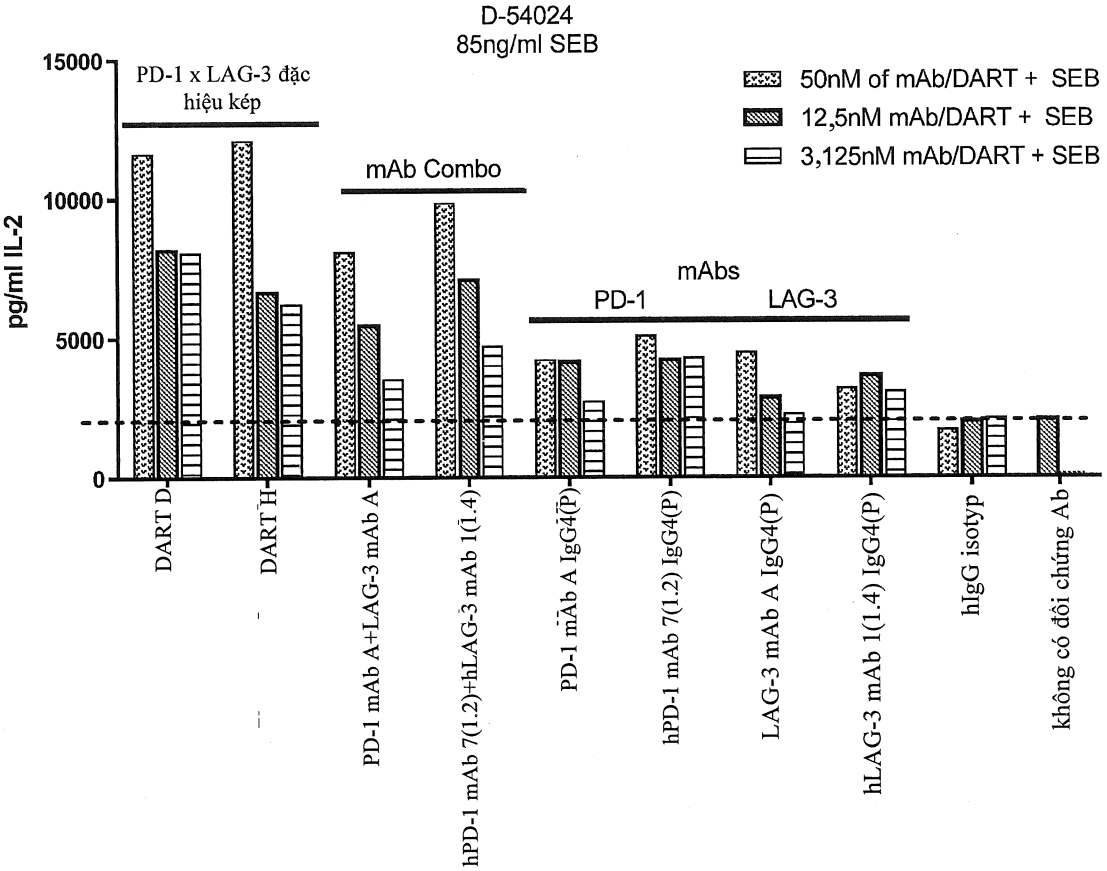

D-54024
85ng/ml SEB
50nM of mAb/DART + SEB
12,5nM mAb/DART + SEB
3,125nM mAb/DART + SEB
pg/ml IL-2
15000
10000
5000
0
PD-1 x LAG-3 đặc hiệu kép
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
DART D
DART H
PD-1 mAb A+LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2)+hLAG-3 mAb 1(1.4)
PD-1 mAb A IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hIgG isotyp
không có đối chứng Ab

Fig. 19

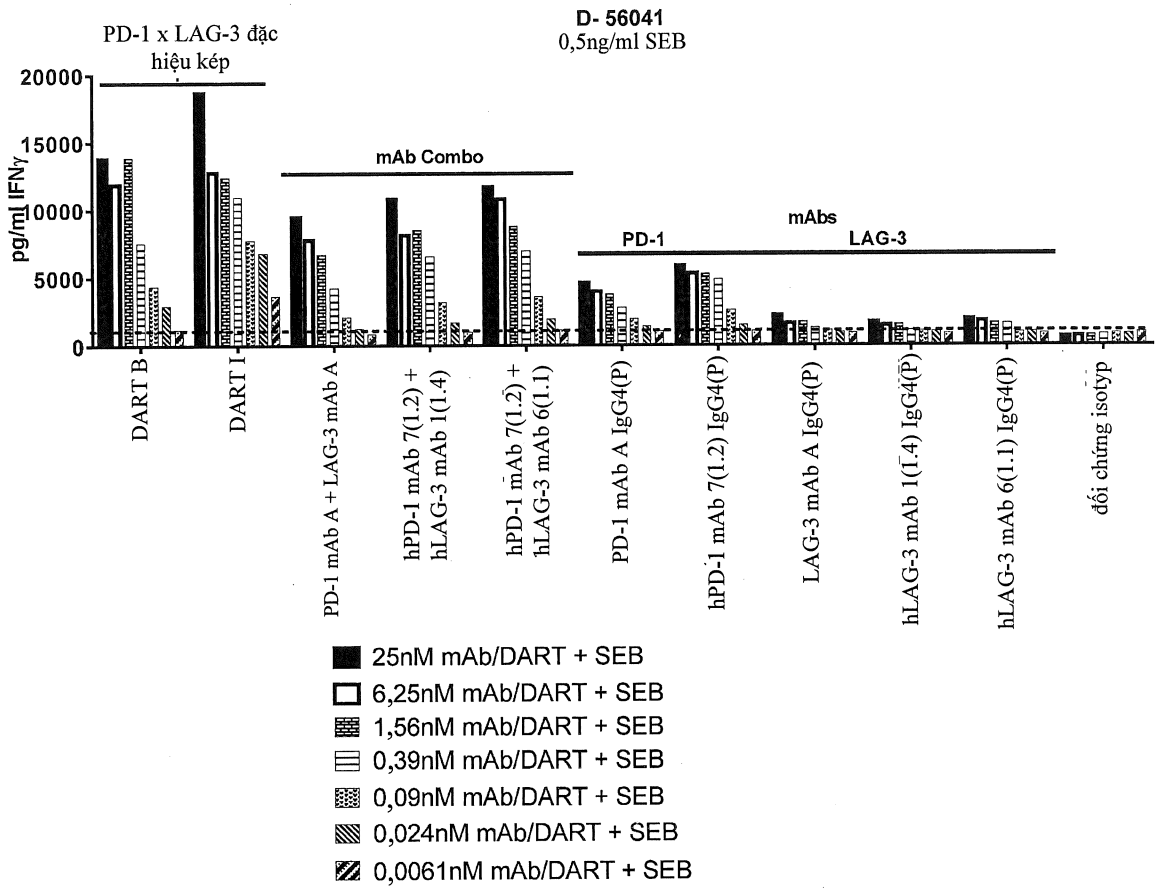

D- 56041
0,5ng/ml SEB
PD-1 x LAG-3 đặc hiệu kép
mAb Combo
mAbs
PD-1
LAG-3
pg/ml IFNγ
20000
15000
10000
5000
0
DART B
DART I
PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A
hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 1(1.4)
hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 6(1.1)
PD-1 mAb A IgG4(P)
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)
LAG-3 mAb A IgG4(P)
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)
hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4(P)
đối chứng isotyp
25nM mAb/DART + SEB
6,25nM mAb/DART + SEB
1,56nM mAb/DART + SEB
0,39nM mAb/DART + SEB
0,09nM mAb/DART + SEB
0,024nM mAb/DART + SEB
0,0061nM mAb/DART + SEB

Fig. 20

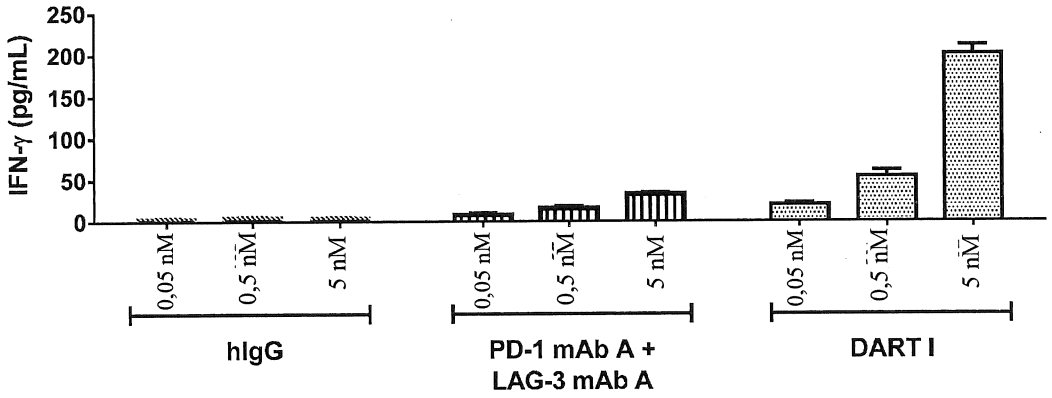


Fig. 21A

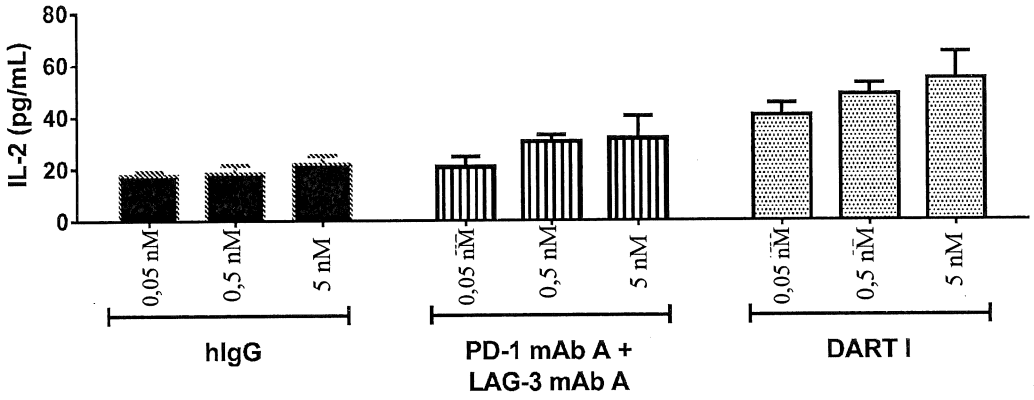


Fig. 21B

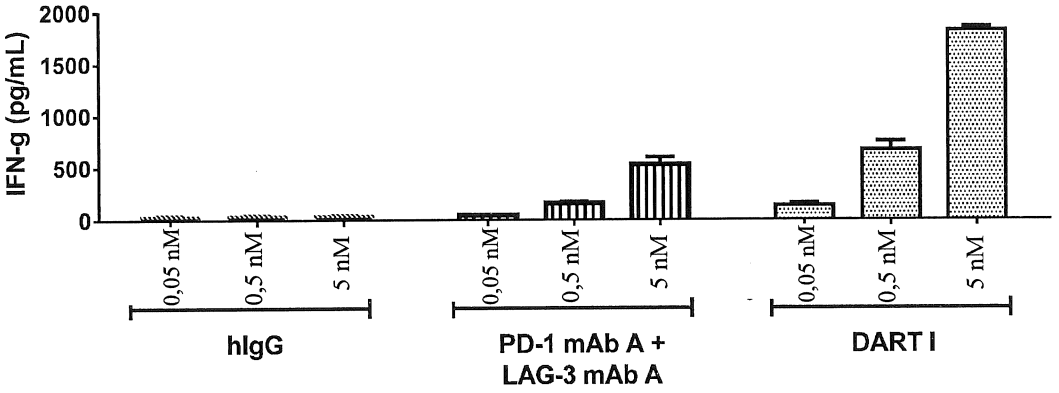


Fig. 21C

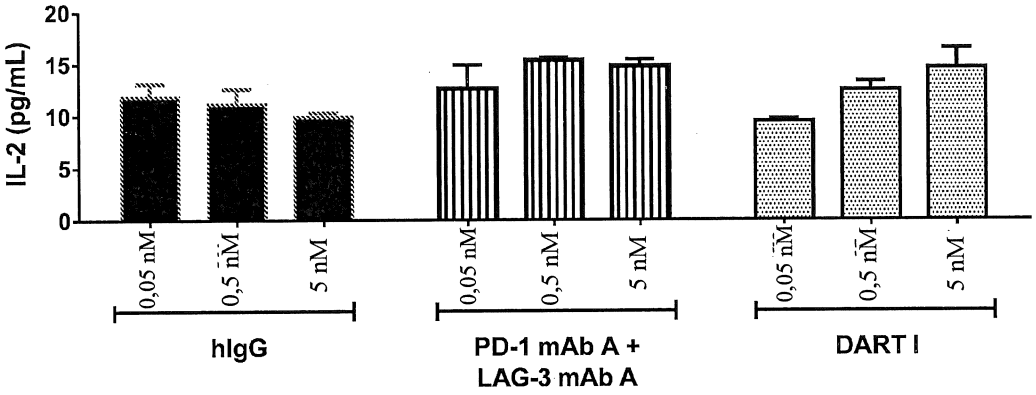


Fig. 21D

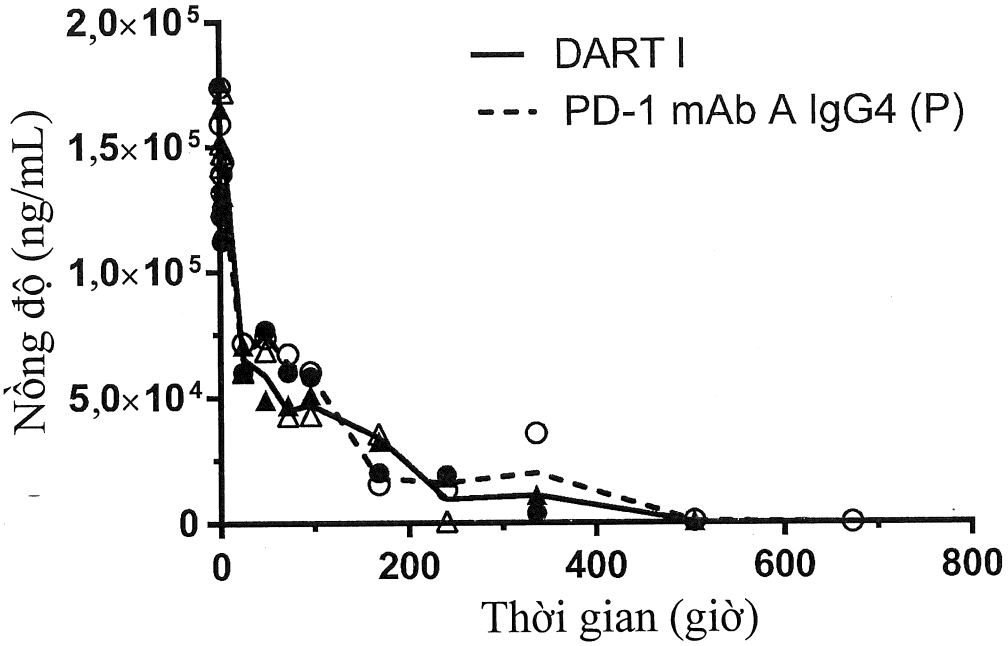

2,0×10^5
1,5×10^5
1,0×10^5
5,0×10^4
0
Nồng độ (ng/mL)
DART I
PD-1 mAb A IgG4 (P)
0
200
400
600
800
Thời gian (giờ)

Fig. 22

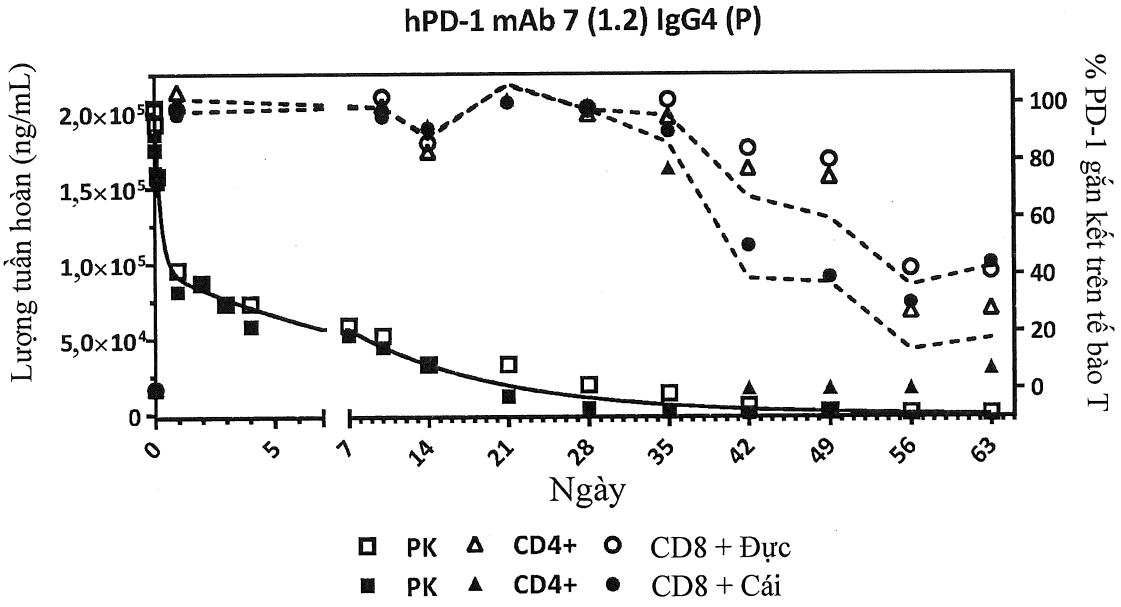


Fig. 23A

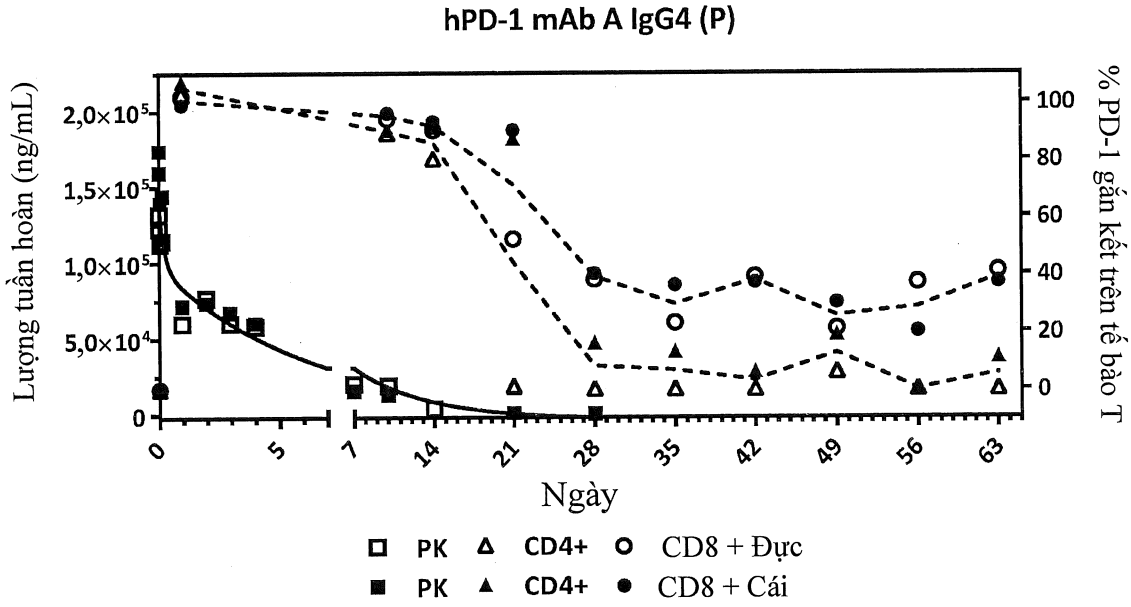


Fig. 23B

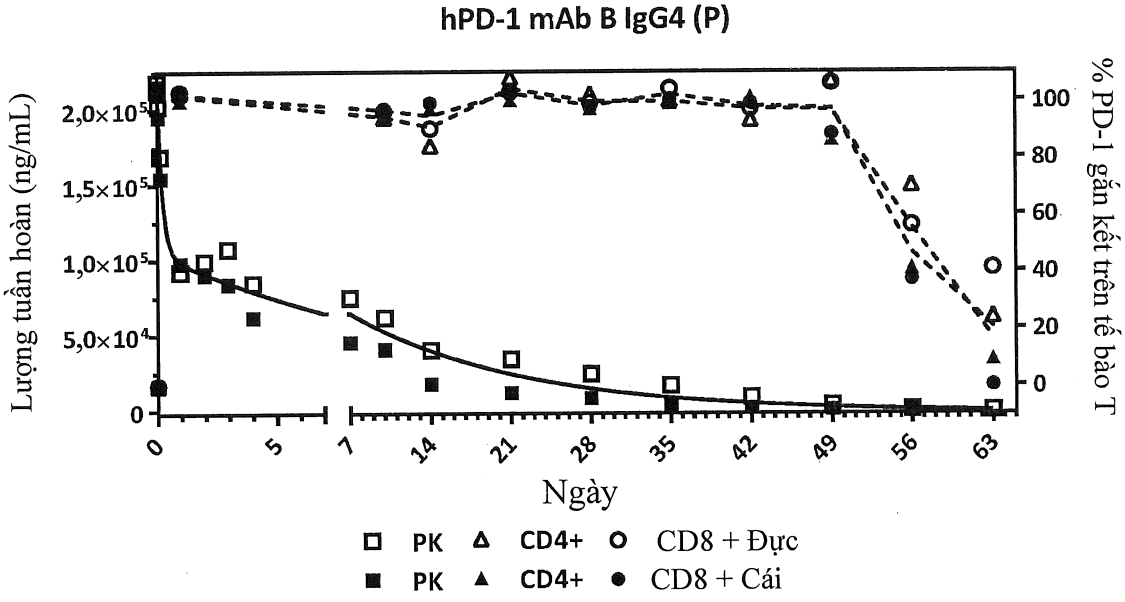

hPD-1 mAb B IgG4 (P)
Lượng tuần hoàn (ng/mL)
2,0×10^5
1,5×10^5
1,0×10^5
5,0×10^4
0
% PD-1 gắn kết trên tế bào T
100
80
60
40
20
0
0
5
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Ngày
PK
CD4+
CD8 + Đực
PK
CD4+
CD8 + Cái

Fig. 23C

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MacroGenic, Inc.
Shah, Kalpana
Smith, Douglas
La Motte-Mohs, Ross
Johnson, Leslie
Moore, Paul
Bonvini, Ezio
Koenig, Scott

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐƠN ĐẶC HIỆU CỦA NGƯỜI, KHÁNG THỂ ĐƠN ĐẶC HIỆU THỂ KHẢM HOẶC KHÁNG THỂ ĐƠN ĐẶC HIỆU ĐƯỢC LÀM GIỐNG NHƯ CỦA NGƯỜI KHÁNG PD-1

<130> 1301.0122PCT

<150> US 62/198,867
<151> 2015-07-30

<150> US 62/239,559
<151> 2015-10-09

<150> US 62/255,140
<151> 2015-11-13

<150> US 62/322,974
<151> 2016-04-15

<160> 298

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền CH2-CH3 của IgG1 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 2
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(216)
<223> Miền CH2-CH3 của IgG2 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (216)..(216)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 3
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền CH2-CH3 của IgG3 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

```
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210                 215
```

<210> 4
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền CH2-CH3 của IgG4 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 4

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền CH2-CH3 của IgG1 của người có thay thế L234A/L235A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 5

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

```
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210                 215
```

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền CH2-CH3 của IgG1 của người "mang nốt phồng"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 6

```
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1               5                   10                  15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30
```

```
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210                 215
```

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền CH2-CH3 của IgG1 của người "mang lỗ"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 7

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền Kappa CL của IgG của người

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 9
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(104)
<223> Miền Lambda CL của IgG của người

<400> 9

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

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

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 10
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền CH1 của IgG1 của người

<400> 10

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Vùng bản lề của IgG2 của người

<400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Vùng bản lề của IgG4 của người

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng bản lề của IgG4 được làm ổn định

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết 1

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết 2 chứa Xystein

<400> 15

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 16

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 17

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 18

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 19

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 20

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 21
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền (cuộn E) thúc đẩy heterodime

<400> 21

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 22
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền (cuộn K) thúc đẩy heterodime

<400> 22

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền (cuộn E) thúc đẩy heterodime chứa xystein

<400> 23

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 24
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền (cuộn K) thúc đẩy heterodime chứa xystein

<400> 24

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 25
<211> 46
<212> PRT
<213> Streptococcus dysgalactiae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(46)
<223> Miên gắn kết albumin 3 của Protein G của chủng Streptococcus G148

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 26
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền gắn kết albumin đã khử miễn dịch biến đổi

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 27
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền gắn kết albumin đã khử miễn dịch biến đổi

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 28
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền gắn kết albumin đã khử miễn dịch biến đổi

<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết luân phiên 2

<400> 29

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết luân phiên 2

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 31
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết

<400> 31

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết

<400> 32

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết luân phiên 2

<400> 33

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết luân phiên 2

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết

<400> 35

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết

<400> 36

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

<210> 37
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết

<400> 37

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 38
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(525)
<223> LAG-3 của người (Trình tự tín hiệu và protein trưởng thành)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(28)
<223> Trình tự tín hiệu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(525)
<223> Protein trưởng thành

<400> 38

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser

370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> Miền biến đổi chuỗi nặng của LAG-3 mAb A

<400> 39

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền biến đổi chuỗi nhẹ của LAG-3 mAb A

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền biến đổi chuỗi nặng LAG-3 mAb 1

<400> 41

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Val Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Gly Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ile Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> CDRH1 của LAG-3 mAb 1

<400> 42

Arg Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của LAG-3 mAb 1

<400> 43

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

Gly

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRH3 của LAG-3 mAb 1

<400> 44

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của LAG-3 mAb 1

<400> 45

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 46
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 của LAG-3 mAb 1

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của LAG-3 mAb 1

<400> 47

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của LAG-3 mAb 1

<400> 48

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49

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

<220>
<223> Miền VH của hLAG-3 mAb 1 VH1

<400> 49

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hLAG-3 mAb 1 VH2

<400> 50

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hLAG-3 mAb 1 VL1

<400> 51

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 52
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL2

<400> 52

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL3

<400> 53

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 54

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 55
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL1 của miền VL của hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> Miền VH của LAG-3 mAb 6

<400> 56

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của LAG-3 mAb 6

<400> 57

Asp Tyr Asn Met Asp
1 5

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của LAG-3 mAb 6

<400> 58

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

Gly

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRH3 của LAG-3 mAb 6

<400> 59

Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của LAG-3 mAb 6

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

```
        35                  40                  45

Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65                  70                  75                  80

Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của LAG-3 mAb 6

<400> 61

```
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1               5                   10
```

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của LAG-3 mAb 6

<400> 62

```
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1               5
```

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL3 của LAG-3 mAb 6

<400> 63

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> Miền biến đổi chuỗi nặng PD-1 mAb A

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

```
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110


Ser
```

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb A

<400> 65

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


Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45


Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80


Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 66
<211> 120
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> Miền biến đổi chuỗi nặng PD-1 mAb B

<400> 66

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> Miền biến đổi chuỗi nhẹ của PD-1 mAb B

<400> 67

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 68
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(288)
<223> Polypeptit PD-1 của người (Trình tự NCI NP 005009.2)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> Trình tự tín hiệu PD-1 của người

<400> 68

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

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

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

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

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

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

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

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

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

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 69
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 1

<400> 69

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Asn Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 373
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(373)
<223> Polynucleotit mã hoá miền VH của PD-1 mAb 1

<400> 70
cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc 60

tctgtccctc acctgcactg tcactggctt ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg 120

gatccgacag tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag 180

cactagctac aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa 240

ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc 300

aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tggggtcaag gtacctcagt 360

caccgtctcc tcc 373

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)

<400> 71

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 72
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 1

<400> 72

His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 1

<400> 73

Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 1

<400> 74

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Gln Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 318
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(318)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 1

<400> 75
caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga 120

tcctcccccc aaccctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggaggggggg 300

accaagctgg aaataaaa 318

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 1

<400> 76

Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 1

<400> 77

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 1

<400> 78

Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 79
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 1 VH1

<400> 79

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Asn Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 1 VH1

<400> 80
gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg 60

acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag 120

cctcccggta aagggctgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat 180

aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt 240

ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat 300

ggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc 360

tcc 363

<210> 81
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 1 VL1

<400> 81

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gln Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn 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 Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 1 VL1

<400> 82
gaaatcgttc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc 60

attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggt 120

caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt 180

ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa 240

gacgccgcca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc 300

accaaagtcg aaataaag 318

<210> 83
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(116)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 2

<400> 83

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 348
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(348)
<223> Polynucleotit mã hóa Miền VH của PD-1 mAb 2

<400> 84
gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac atcagtagtg gcagtatgag catttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 củacủa PD-1 mAb 2

<400> 85

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 2

<400> 86

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

Gly

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 2

<400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 2

<400> 88

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

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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

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

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

<210> 89
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(336)
<223> Polynucleotit mã hóa Miền VL của PD-1 mAb 2

<400> 89
gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acagggtttc taaccgattt 180

tctggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 2

<400> 90

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

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 2

<400> 91

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 2

<400> 92

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 93
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 2 VH1

<400> 93

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe

20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Ser Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 94
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 2 VH1

<400> 94
gaagtgcaat tggttgagag tggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg 60

tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattgggt gcgccaggct 120

cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat 180

gccgacacag tgaaaggcag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac 240

ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct 300

gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc 348

<210> 95
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 2 VL1

<400> 95

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

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

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

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

<210> 96
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 2 VL1

<400> 96
gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca gccagccagt 60

atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg 120

tacctgcaaa aaccagggca gagcccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt 180

tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggtctggca ctgatttcac actgaaaatc 240

tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc 300

tggacttttg gccaaggtac taagctggaa atcaag 336

<210> 97
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 3

<400> 97

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 98
<211> 375
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(375)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 3

<400> 98
caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag 300

attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 3

<400> 99

Asp Tyr Val Met His
1 5

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 3

<400> 100

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

1 5 10 15

Gly

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 3

<400> 101

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

<210> 102
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 3

<400> 102

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

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

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

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

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

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

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

<210> 103
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(336)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 3

<400> 103
gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct ataaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 104
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 3

<400> 104

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

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 3

<400> 105

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 3

<400> 106

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 107
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(116)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 4

<400> 107

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe

20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 348
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(348)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 4

<400> 108
gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 109

<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 4

<400> 109

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 4

<400> 110

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

Gly

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 4

<400> 111

Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 4

<400> 112

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

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

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

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

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

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

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

<210> 113
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(336)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb

<400> 113
gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcctgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg gaaacaccta tttccattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acagggtttc taaccgattt 180

tctggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 4

<400> 114

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

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 4

<400> 115

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 4

<400> 116

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 117
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(119)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 5

<400> 117

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Val 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 Ala Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Gln Leu Ile Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 118
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(357)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 5

<400> 118
caggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac 300

tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 5

<400> 119

Ala Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 5

<400> 120

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 5

<400> 121

Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 5

<400> 122

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 123
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(333)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 5

<400> 123
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 124
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)

<223> CDRL1 của PD-1 mAb 5

<400> 124

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 5

<400> 125

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 5

<400> 126

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 127
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 6

<400> 127

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr
115

<210> 128
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(333)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 6

<400> 128
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 6

<400> 129

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 130
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 6

<400> 130

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

Gly

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)

<223> CDRH3 của PD-1 mAb 6

<400> 131

Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 132
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 6

<400> 132

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 133
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(333)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 6

<400> 133
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 134
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 6

<400> 134

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 6

<400> 135

Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 6

<400> 136

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 137
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(119)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 7

<400> 137

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Gln Leu Ile Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 138
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(357)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 7

<400> 138
gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

gatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggagcac 300

tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc 357

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 7

<400> 139

Ser Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 7

<400> 140

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 7

<400> 141

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 142
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 7

<400> 142

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 143
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(333)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 7

<400> 143
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 144
<211> 15

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 7

<400> 144

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 145
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 7

<400> 145

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 7

<400> 146

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 147
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 147

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 148
caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240

atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat cacctttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 149
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 149

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 150
caagttcaat tggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240

atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat cacctttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 151
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 151

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 152
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 152
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 153
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 153

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 154
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 154
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 155
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 155

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 156
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 156
gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 157
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL1 của the Miền VL của hPD-1 mAb 7 VL2 and hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 157

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL2 của miền VL của hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 158

Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 159
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 8

<400> 159

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Ser Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 160
<211> 339
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(339)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 8

<400> 160
gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatggtga cactcactac 180

aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt 300

gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc 339

<210> 161
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 8

<400> 161

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 162
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 8

<400> 162

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

Gly

<210> 163
<211> 4
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 8

<400> 163

Asp Phe Asp Tyr
1

<210> 164
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 8

<400> 164

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 165
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(336)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 8

<400> 165
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg 120

ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 166
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 8

<400> 166

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

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 8

<400> 167

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 8

<400> 168

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 169
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(119)

<223> Miền VH của PD-1 mAb 9

<400> 169

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 170
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(357)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 9

<400> 170
gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggtggtaa cacctactat 180

tcagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatggt 300

ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

<210> 171
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 9

<400> 171

Ser Tyr Leu Val Ser
1 5

<210> 172
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 9

<400> 172

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

Gly

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 9

<400> 173

Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 174
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 9

<400> 174

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

Asp Ile Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Thr
100 105

<210> 175
<211> 321

<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(321)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 9

<400> 175
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct 240

gaagattttg ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccagac tggaaatcac a 321

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 9

<400> 176

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 9

<400> 177

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 9

<400> 178

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 179
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 9 VH1

<400> 179

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 180
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 9 VH1

<400> 180
gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tacttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240

ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300

tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

<210> 181
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 181

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 182
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 182
gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tacttttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttggaatg gacggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240

ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300

tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRH1 của Miền VH của hPD-1 mAb 9 VH2 có thay thế axit amin từ serin thành glyxin

<400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly
1 5

<210> 184
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 9 VL1

<400> 184

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 185
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 9 VL1

<400> 185

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtgggggа tcgggtcacc 60

atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct 120

ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt 180

aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240

gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa 300

ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 186
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 186

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 187
<211> 321

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 187
gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtgggggа tcgggtcacc 60

atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctggtatca acagaaacct 120

ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt 180

aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240

gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa 300

ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL1 của miền VL của hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 188

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 189
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL2 của miền VL của hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 189

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1 5

<210> 190
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(116)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 10

<400> 190

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

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

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

Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 191
<211> 348
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(348)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 10

<400> 191
gaagtgatac tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtggtg gtggtagtaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa 300

ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 10

<400> 192

Asn Tyr Leu Met Ser
1 5

<210> 193
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 10

<400> 193

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

Gly

<210> 194
<211> 7
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 10

<400> 194

Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 195
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 10

<400> 195

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile
100 105

<210> 196
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(321)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 10

<400> 196
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatttttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcat a 321

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 10

<400> 197

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 của PD-1 mAb 10

<400> 198

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 199
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..()
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 10

<400> 199

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 200
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 11

<400> 200

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 201
<211> 351
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(351)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 11

<400> 201
gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttatcctg gaaatagtga tactcactac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240

atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc 300

tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a 351

<210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 11

<400> 202

Gly Tyr Trp Met His
1 5

<210> 203
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 11

<400> 203

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

Gly

<210> 204
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(8)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 11

<400> 204

Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 205
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)

<223> Miền VL của PD-1 mAb 11

<400> 205

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln His Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

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

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 206
<211> 318
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(318)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 11

<400> 206
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60

ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcacagaaca 120

aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180

aggtttagtg gcagtggatc agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240

gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cggtgctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

<210> 207
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 11

<400> 207

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 11

<400> 208

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 209
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(8)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 11

<400> 209

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr
1 5

<210> 210
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 12

<400> 210

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 211
<211> 375
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(375)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 12

<400> 211
cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcactgggt gaaacagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300

attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 212
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 12

<400> 212

Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 213
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 12

<400> 213

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

Gly

<210> 214
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 12

<400> 214

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

<210> 215
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 4

<400> 215

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

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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Cys Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

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

<210> 216
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(336)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 12

<400> 216
gatgttttga tgacccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct gcaaagtttc cacccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 12

<400> 217

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

<210> 218
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 12

<400> 218

Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser
1 5

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 12

<400> 219

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 13

<400> 220

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 221
<211> 363
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(363)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 13

<400> 221
gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggttctaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct 300

tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc 360

tcc 363

<210> 222
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 13

<400> 222

Ser His Thr Met Ser
1 5

<210> 223
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 13

<400> 223

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

Gly

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 13

<400> 224

Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 225
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 13

<400> 225

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 226
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(321)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 13

<400> 226
gacattcaga tgacccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60

atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240

gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 227
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 13

<400> 227

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

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 13

<400> 228

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 13

<400> 229

Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 230
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 14

<400> 230

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 231
<211> 351
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(351)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 14

<400> 231
caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caacttcatc agctactgga taacctgggt gaaacagagg 120

cctggacaag gccttcagtg gattggaaat atttatcctg gtactgatgg tactacctac 180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta 300

cactggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc c 351

<210> 232
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 14

<400> 232

Ser Tyr Trp Ile Thr
1 5

<210> 233
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 14

<400> 233

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

Ser

<210> 234
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(8)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 14

<400> 234

Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 235
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 14

<400> 235

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 236
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(321)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 14

<400> 236
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt 60

gtcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaagccc 120

ggtcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctccc gattcagtgg cgtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 237
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 14

<400> 237

Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 238
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 14

<400> 238

Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 14

<400> 239

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 240
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> Miền VH của PD-1 mAb 15

<400> 240

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 241
<211> 351
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(351)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VH của PD-1 mAb 15

<400> 241
gaagtgatgc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc attagtggtg gtggtgctga cacctactat 180

gccgacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg 300

acctatgcta tggactactg gggtcaagga acctcagtca ccgtctcctc c 351

<210> 242
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 của PD-1 mAb 15

<400> 242

Ser Tyr Leu Ile Ser
1 5

<210> 243
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 của PD-1 mAb 15

<400> 243

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

Gly

<210> 244
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)
<223> CDRH3 của PD-1 mAb 15

<400> 244

Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 245
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của PD-1 mAb 15

<400> 245

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 246
<211> 321
<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(321)
<223> Polynucleotit mã hóa miền VL của PD-1 mAb 15

<400> 246
gacattcaga tgacccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60

atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240

gaagattttg taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 247
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 của PD-1 mAb 15

<400> 247

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

<210> 248
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 của PD-1 mAb 15

<400> 248

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp

1 5

<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 của PD-1 mAb 15

<400> 249

Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 250
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 15 VH1

<400> 250

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 251
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 15 VH1

<400> 251
gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc actcagactg 60

tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta tctcttgggt gcgccaagcc 120

ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat 180

gccgacagcg tcaagggacg tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac 240

ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg 300

acttacgcta tggactattg gggccagggc accttggtca ctgtctcatc c 351

<210> 252
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 252

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 253
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polynucleotit mã hóa hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 253
gatatccaga tgacccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc 60

atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg cctggtatca gcagaaacct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tcgcagatgg agtgccctcc 180

cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag 300

ggtactaaac tggagatcaa a 321

<210> 254
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền CH1 của IgG4 của người

<400> 254

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 255
<211> 329
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người IgG1

<400> 255

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 256
<211> 326
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người IgG4 có vùng bản lề được làm ổn định

<400> 256

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

```
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
```

325

<210> 257
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền CH1 của IgG2 của người

<400> 257

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 258
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự IgG1 đối với miền CH2 và CH3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 258

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 259
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự IgG4 đối với miền CH2 và CH3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa là lysin (K) hoặc không có

<400> 259

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 260
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Các miền CH2 và CH3 của IgG1 của người biến thể và kiểu dại

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> Xaa4 và Xaa5 đều là L (kiểu dại), hoặc đều là A (giảm gắn kết FcgammaR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(26)
<223> Xaa22, Xaa24 và Xaa26 tương ứng là M, S và T (kiểu dại), hoặc là Y, T và E (thời gian bán thải kéo dài)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (136)..(177)

<223> Xaa136, Xaa138, và Xaa177 tương ứng là: T, L và Y (kiểu dại), hoặc là W, L and Y (nốt phồng), or S, A và V (lỗ)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (204)..(205)
<223> Xaa204 và Xaa205 tương ứng là N và H (kiểu dại), hoặc là N và R (không có gắn kết protein A), hoặc A và K (không có gắn kết protein A)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 là K hoặc không có

<400> 260

Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Xaa Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Xaa Xaa Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 261
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết luân phiên 2

<400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 262
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết 3

<400> 262

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 263
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết 3

<400> 263

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 264
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể PD-1 được làm giống như của người (hPD-1 mAb 7(1.2))

<400> 264

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 265
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người ((hPD-1 mAb 7(1.2))

<400> 265

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
```

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 266
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng kháng thể được làm giống như của người ((hPD-1 mAb 7(1.2))

<400> 266

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
```

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 267
<211> 501
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Xaa34 là A hoặc G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (307)..(307)
<223> Xaa307 là Y hoặc M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (309)..(309)
<223> Xaa309 là T hoặc S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (311)..(311)
<223> Xaa311 là E hoặc T

<400> 267

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Xaa Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

```
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        115                 120                 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
        195                 200                 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
    210                 215                 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
                245                 250                 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
            260                 265                 270

Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
        275                 280                 285

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
```

290 295 300

Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
305 310 315 320

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
370 375 380

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
405 410 415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Gly
500

<210> 268
<211> 273
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART A

<400> 268

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu

165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

<210> 269
<211> 571
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART D

<400> 269

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

```
Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
                85                  90                  95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
                245                 250                 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
```

260 265 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
275 280 285

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
290 295 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
305 310 315 320

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
325 330 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val
370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
435 440 445

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
465 470 475 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 270
<211> 352
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART D

<400> 270

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
245 250 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
260 265 270

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
275 280 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
290 295 300

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
305 310 315 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340 345 350

<210> 271
<211> 571
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART E

<400> 271

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

```
           100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        115                 120                 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
                165                 170                 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
        195                 200                 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
    210                 215                 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
                245                 250                 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
            260                 265                 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
        275                 280                 285

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
    290                 295                 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
305                 310                 315                 320
```

```
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
                325                 330                 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
            340                 345                 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
        355                 360                 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val
    370                 375                 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
385                 390                 395                 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                405                 410                 415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
            420                 425                 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        435                 440                 445

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    450                 455                 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
465                 470                 475                 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                485                 490                 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            500                 505                 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        515                 520                 525
```

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 272
<211> 352
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART E

<400> 272

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

```
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
                245                 250                 255

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
            260                 265                 270

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
        275                 280                 285

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
    290                 295                 300

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
305                 310                 315                 320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
                325                 330                 335
```

```
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345                 350


<210>  273
<211>  448
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART F

<400>  273

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


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


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


Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
    50                  55                  60


Lys Asp Arg Val Thr Ile 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


Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110


Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125


Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140


Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160
```

```
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
                245                 250                 255

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
        355                 360                 365
```

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 274
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của DART F

<400> 274

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 275
<211> 732
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ ba của DART F

<400> 275

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
245 250 255

```
Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Val Met Thr
    450                 455                 460
```

```
Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile
465                 470                 475                 480

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr
                485                 490                 495

Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Glu Arg Leu Ile
            500                 505                 510

Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        515                 520                 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
    530                 535                 540

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
545                 550                 555                 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
                565                 570                 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            580                 585                 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
        595                 600                 605

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    610                 615                 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
625                 630                 635                 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
                645                 650                 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            660                 665                 670
```

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
690 695 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
725 730

<210> 276
<211> 273
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ tư của DART F

<400> 276

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
                245                 250                 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
            260                 265                 270

Glu
```

<210> 277
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART G

<400> 277

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
                245                 250                 255

Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
```

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 278
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của DART G

<400> 278

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 279
<211> 732
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ ba của DART G

<400> 279

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

```
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
                245                 250                 255

Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
```

```
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu
    450                 455                 460

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
465                 470                 475                 480

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe
                485                 490                 495
```

```
Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
            500                 505                 510

His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        515                 520                 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
    530                 535                 540

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr
545                 550                 555                 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
                565                 570                 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            580                 585                 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
        595                 600                 605

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
    610                 615                 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
625                 630                 635                 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
                645                 650                 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            660                 665                 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
        675                 680                 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
    690                 695                 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
```

705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
725 730

<210> 280
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ tư của DART G

<400> 280

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu
165 170 175

Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp
180 185 190

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro
210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 281
<211> 503
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART H

<400> 281

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

```
Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
                85                  90                  95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
                245                 250                 255
```

```
Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
            260                 265                 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        275                 280                 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    290                 295                 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305                 310                 315                 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                325                 330                 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            340                 345                 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        355                 360                 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    370                 375                 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385                 390                 395                 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                405                 410                 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            420                 425                 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        435                 440                 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    450                 455                 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
```

465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 282
<211> 273
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của DART H

<400> 282

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

<210> 283
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ ba của DART H

<400> 283

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

```
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220
```

Pro Gly Lys
225

<210> 284
<211> 563
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART 1

<400> 284

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
115 120 125

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe
130 135 140

Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

```
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala
                165                 170                 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
            180                 185                 190

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
        275                 280                 285

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
    290                 295                 300

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
305                 310                 315                 320

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
                325                 330                 335

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
            340                 345                 350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
        355                 360                 365
```

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
370 375 380

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
385 390 395 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
405 410 415

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
420 425 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
435 440 445

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
450 455 460

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
465 470 475 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
485 490 495

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
500 505 510

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
515 520 525

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
530 535 540

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545 550 555 560

Ser Pro Gly

<210> 285

<211> 348
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART 1

<400> 285

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

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

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
115 120 125

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
130 135 140

Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro
165 170 175

```
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln
            180                 185                 190

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205

Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser
225                 230                 235                 240

Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
            260                 265                 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
        275                 280                 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                325                 330                 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345
```

<210> 286
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của BSAB A

<400> 286

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
```

```
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Glu Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
```

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 287
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của BSAB A

<400> 287

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 288
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ ba của BSAB A

<400> 288

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Arg
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
```

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 289
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ tư của BSAB A

<400> 289

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

```
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        35                  40                  45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 290
<211> 496
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART I

<400> 290

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
165 170 175

```
Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ser Lys Tyr
            260                 265                 270

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
        275                 280                 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
    290                 295                 300

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
305                 310                 315                 320

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                325                 330                 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
            340                 345                 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
        355                 360                 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
    370                 375                 380
```

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
485 490 495

<210> 291
<211> 271
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART I

<400> 291

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
                85                  90                  95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val
                165                 170                 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp
            180                 185                 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
    210                 215                 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
                245                 250                 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
            260                 265                 270
```

<210> 292
<211> 566
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của DART J

<400> 292

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
165 170 175

```
Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly
225                 230                 235                 240

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
                245                 250                 255

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            260                 265                 270

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        275                 280                 285

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    290                 295                 300

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
305                 310                 315                 320

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                325                 330                 335

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            340                 345                 350

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        355                 360                 365

Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    370                 375                 380
```

```
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
385                 390                 395                 400

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                405                 410                 415

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            420                 425                 430

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        435                 440                 445

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    450                 455                 460

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
465                 470                 475                 480

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                485                 490                 495

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            500                 505                 510

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        515                 520                 525

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    530                 535                 540

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
545                 550                 555                 560

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
                565
```

<210> 293
<211> 350
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư của DART J

<400> 293

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val
165 170 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp
180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
245 250 255

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
260 265 270

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
275 280 285

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
290 295 300

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
305 310 315 320

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
325 330 335

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340 345 350

<210> 294
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hLAG-3 mAb 6 VH1

<400> 294

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

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

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

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

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 295
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của hLAG-3 mAb 6 VH2

<400> 295

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

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

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

Ser Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 296
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL1

<400> 296

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 297
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL2

<400> 297

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 298
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDRL1 của miền VL của hLAG-3 mAb 6 VL1 và VL2

<400> 298

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1 5 10