



(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)



1-0033109

(51)⁸ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2018-01393

(22) 29/09/2016

(86) PCT/EP2016/073248 29/09/2016

(87) WO 2017/055443 06/04/2017

(30) 15188061.4 02/10/2015 EP

(45) 25/09/2022 414

(43) 27/08/2018 365A

(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland

(72) SEEBER, Stefan (DE); LIFKE, Valeria (DE); FISCHER, Jens (DE); WEISER, Barbara (DE); WUENSCH, Ildiko (HU); PLOETTNER, Oliver (DE); ZWICK, Adrian (DE); GEORGES, Guy (BE); DENGL, Stefan (DE); LEVITSKI, Viktor (SE); KLEIN, Christian (DE); CODARRI DEAK, Laura (CH); FENN, Sebastian (DE); BENZ, Joerg (DE).

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

(54) KHÁNG THỂ ĐÃ ĐƯỢC PHÂN LẬP GẮN KẾT VÀO PD1 CỦA NGƯỜI, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người và phương pháp tạo ra kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1, phương pháp tạo ra kháng thể và được phẩm chứa nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

PD-1

Sự đồng kích thích hoặc cung cấp hai tín hiệu riêng biệt vào tế bào T là mô hình hoạt hóa lympho bào được chấp nhận rộng rãi đối với các lympho bào T đang nghỉ bởi các tế bào trình diện kháng nguyên (APC: antigen-presenting cell) (Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)).

Mô hình này còn cho thấy sự phân biệt giữa sự tự dung chịu với không tự dung chịu và dung chịu miễn dịch (Bretscher et al., Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987)). Tín hiệu thứ nhất, hoặc tín hiệu đặc hiệu kháng nguyên, được tải nạp thông qua thụ thể tế bào T (TCR) sau khi nhận diện peptit kháng nguyên ngoại lai được trình diện trong bối cảnh phức hợp tương thích mô chính (MHC: major histocompatibility-complex). Tín hiệu thứ hai, hoặc tín hiệu đồng kích thích, được phân phối tới các tế bào T bởi các phân tử đồng kích thích được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) và khiến cho các tế bào T đẩy mạnh việc nhân rộng dòng vô tính, tiết xytokin và chức năng tác động (Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996)). Khi không có sự đồng kích thích, các tế bào T có thể trở nên trở ngại đối với sự kích thích kháng nguyên, không làm tăng đáp ứng miễn dịch hiệu quả, và ngoài ra có thể còn gây ra sự cạn kiệt hoặc sự dung chịu đối với các kháng nguyên ngoại lai.

Mô hình hai tín hiệu đơn giản này có thể là đơn giản hóa quá mức vì cường độ của tín hiệu TCR thực sự có ảnh hưởng định lượng đến sự hoạt hóa và biệt hóa tế bào T (Viola et al., Science 273: 104-106 (1996); Sloan-Lancaster, Nature 363: 156-159 (1993)). Ngoài ra, sự hoạt hóa tế bào T có thể xảy ra ngay cả khi không có mặt

các tín hiệu đồng kích thích nếu như cường độ của tín hiệu TCR cao. Quan trọng hơn là, các tế bào T nhận cả tín hiệu đồng kích thích thứ cấp tích cực và tiêu cực. Sự điều hòa các tín hiệu tích cực và tiêu cực này là rất quan trọng để tối đa hóa các đáp ứng miễn dịch bảo vệ của vật chủ, trong khi vẫn duy trì được sự dung chịu miễn dịch và ngăn ngừa sự tự miễn.

Các tín hiệu thứ cấp tiêu cực có vẻ là cần thiết để cảm ứng sự dung chịu của tế bào T, trong khi các tín hiệu tích cực đẩy mạnh sự hoạt hóa tế bào T. Tuy mô hình hai tín hiệu đơn giản này vẫn cung cấp sự giải thích hợp lệ cho các lympho bào chưa tiếp xúc kháng nguyên, nhưng đáp ứng miễn dịch của vật chủ là một quá trình động lực, và các tín hiệu đồng kích thích cũng có thể được cung cấp cho các tế bào T đã được cho tiếp xúc với kháng nguyên.

Cơ chế của sự đồng kích thích được quan tâm trong trị liệu vì thao tác của các tín hiệu đồng kích thích này đã cho thấy là tạo ra phương tiện để làm tăng hoặc chấm dứt đáp ứng miễn dịch trên cơ sở tế bào. Gần đây, đã phát hiện ra rằng sự mất ứng hoặc sự loạn chức năng tế bào T xảy ra đồng thời với sự biểu hiện được cảm ứng và duy trì của thụ thể có hoạt tính ức chế, polypeptit chết theo chương trình 1 (PD-1: Programmed Death-1). Kết quả là, sự hướng đích trị liệu của PD-1 là một lĩnh vực rất được quan tâm.

Protein chết theo chương trình 1 (PD-1) là thành viên có hoạt tính ức chế thuộc họ thụ thể CD28, họ này còn bao gồm CD28, CTLA-4, ICOS và BTLA. PD-1 được biểu hiện trên các tế bào B, tế bào T và tủy bào đã được hoạt hóa (Agata et al, nêu trên; Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). Các thành viên đầu tiên của họ này, CD28 và ICOS, được phát hiện thông qua các tác động chức năng đối với việc gia tăng sự tăng sinh tế bào T sau khi bổ sung kháng thể đơn dòng (Hutloff et al (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al (1980) Immunogenetics 10:247-260). PD-1 được phát hiện thông qua việc sàng lọc sự biểu hiện biệt hóa ở các tế bào chết theo chương trình (Ishida et al (1992) EMBO J 11 :3887-95). Các thành viên còn lại của họ này, CTLA-4 và BTLA, được phát hiện thông qua việc sàng lọc sự biểu hiện biệt hóa ở các lympho bào T và các tế bào TH1 gây độc tế bào, một cách tương ứng. CD28, ICOS và CTLA-4 đều có

gốc xystein không bắt cặp cho phép đồng dime hóa. Ngược lại, PD-1 được gợi ý là tồn tại ở dạng monome, không có gốc xystein không bắt cặp đặc trưng trong các thành viên khác của họ CD28.

Gen PD-1 là protein xuyên màng typ I 55 kDa mà là một phần của siêu họ gen Ig (Agata et al. (1996) *bit Immunol* 8:765-72). PD-1 chứa motif ức chế tyrosin thụ thể miễn dịch (ITIM: immunoreceptor tyrosine inhibitory motif) gần màng và motif chuyển đổi trên cơ sở tyrosin (ITSM: tyrosine- based switch motif) xa màng (Thomas, MX. (1995) *J Exp A4edW*: 1953-6; Vivier, E and Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Mặc dù có cấu trúc tương tự với CTLA-4, nhưng PD-1 không có motif MYPPPY mà rất quan trọng đối với việc gắn kết B7-1 và B7-2. Hai phối tử đối với PD-1 đã được nhận biết, là PD-L1 và PD-L2, đã được chứng minh là điều hòa giảm sự hoạt hóa tế bào T khi gắn kết vào PD-1 (Freeman et al (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman et al (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Cả PD-L1 và PD-L2 đều là các thể tương đồng của B7 mà gắn kết vào PD-1, nhưng không gắn kết vào các thành viên khác của họ CD28. Một phối tử đối với PD-1, là PD-L1, có nhiều trong nhiều bệnh ung thư ở người (Dong et al (2002) *Nat. Med* 8:787-9). Tương tác giữa PD-1 và PD-L1 làm giảm các lympho bào thâm nhiễm khối u, làm giảm sự tăng sinh được điều tiết bởi thụ thể tế bào T, và sự trốn miễn dịch của các tế bào ung thư (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Sự ức chế miễn dịch có thể được đảo ngược bằng cách ức chế tương tác cục bộ của PD-1 với PD-L1, và tác dụng này có tính cộng hợp khi tương tác của PD-1 với PD-L2 cũng bị phong bế (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 99: 12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

PD1 là thành viên có hoạt tính ức chế thuộc họ CD28 được biểu hiện trên các tế bào B, tế bào T và tủy bào đã được hoạt hóa (Agata et al, nêu trên; Okazaki et al. (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) *J Immunol* YWJl 1-8). Các động vật thiếu hụt PD-1 phát triển nhiều kiểu hình tự miễn khác nhau, bao gồm bệnh cơ tim tự miễn và hội chứng giống luput kèm viêm khớp và viêm thận (Nishimura et al. (1999) *Immunity* H: 141-51; Nishimura et al. (2001) *Science*

291:319-22). Ngoài ra, PD1 được phát hiện thấy là có vai trò trong bệnh viêm não-tủy tự miễn, luput ban đỏ hệ thống, bệnh mảnh ghép chống vật chủ (GVHD), bệnh đái tháo đường typ I và bệnh viêm đa khớp dạng thấp (Salama et al. (2003) J Exp Med 198:71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13:R143; Nielsen et al. (2004) Lupus 11:510). Trong dòng khối u tế bào B của chuột, ITSM của PD1 đã cho thấy là cần thiết để phong bế dòng Ca^{2+} được điều tiết bởi BCR và sự phosphoryl hóa tyrosin của các phân tử tác động nằm xuôi dòng (Okazaki et al. (2001) PNAS 98: 13866-71).

Nhiều đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế bộc lộ việc tạo ra các kháng thể kháng PD-1 và/hoặc các phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch bằng chất (bao gồm kháng thể kháng PD-1) mà cản trở sự gắn kết với PD-L1 và/hoặc sự phát tín hiệu PD-1, bao gồm các đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế sau đây: US2003/0039653, US2004/0213795, US2006/0110383, US2007/0065427, US2007/0122378, US2012/237522, WO2004/072286, WO2006/121168, WO2006/133396, WO2007/005874, WO2008/083174, WO2008/156712, WO2009/024531, WO2009/014708, WO2009/114335, WO2010/027828, WO2010/027423, WO2010/036959, WO2010/029435, WO2010/029434, WO2010/063011, WO2010/089411, WO2011/066342, WO2011/110604, WO2011/110621 và WO2012/145493.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng PD1 và phương pháp sử dụng chúng.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD1, trong đó kháng thể này:

- i) cạnh tranh với kháng thể kháng PD1 chứa VH và VL của PD1-0103 để gắn kết vào PD-1, và/hoặc
- ii) gắn kết vào PD-1 của người và của khỉ đuôi dài (khỉ cynomolgus); và/hoặc
- iii) làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 $\mu\text{g/mL}$; và/hoặc

iv) làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR).

Sáng chế đề xuất kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa:

A) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc

B) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:11; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14; hoặc

C) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22; hoặc

D) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:27; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (e) HVR-L2 chứa

trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30; hoặc

E) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:35; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38; hoặc

F) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:43; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46; hoặc

G) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:51; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa:

A) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:3; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc

B) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:11; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14; hoặc

C) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:19; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22; hoặc

D) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:27; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30; hoặc

E) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:35; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38; hoặc

F) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:43; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46; hoặc

G) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:51; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này:

A)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc B)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58;

ii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59;

iii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60;

iv) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61;

hoặc C)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:15 và trình tự VL là SEQ ID NO:16;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc D)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:23 và trình tự VL là SEQ ID NO:24;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc E)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:31 và trình tự VL là SEQ ID NO:32;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc F)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:39 và trình tự VL là SEQ ID NO:40;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc G)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:47 và trình tự VL là SEQ ID NO:48;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc H)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:55 và trình tự VL là SEQ ID NO:56;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 theo sáng chế là kháng thể đơn dòng.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 theo sáng chế là kháng thể của người, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể thể khảm.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 theo sáng chế là mảnh kháng thể gắn kết vào PD1.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 theo sáng chế là mảnh Fab.

Sáng chế đề xuất axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể theo mục bất kỳ trong số các mục nêu trên.

Sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic này.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ sao cho kháng thể được tạo ra.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể như nêu trên, còn bao gồm bước thu hồi kháng thể từ tế bào chủ.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể nêu trong bản mô tả này và chất mang dược dụng.

Sáng chế đề xuất kháng thể nêu trong bản mô tả này để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế đề xuất kháng thể nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể nêu trong bản mô tả này trong sản xuất thuốc. Theo một phương án, thuốc này được dùng để điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh ung thư, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng có tác dụng của kháng thể nêu trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Sự phong bế PD1 bằng PD1-0103 thể khảm làm tăng mạnh sự tiết IFN-gamma bởi các tế bào T sơ cấp của người đã được kích thích dị sinh.

Fig.2: Sự phong bế PD1 bằng PD1-0103 thể khảm làm tăng mạnh sự tiết interferon-gamma (IFN-g) bởi các tế bào T sơ cấp của người đã được kích thích dị sinh.

Fig.3: Sự phong bế PD1 bằng PD1-0103 thể khảm làm tăng mạnh sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF) bởi các tế bào T sơ cấp của người đã được kích thích dị sinh.

Fig.4: 4A) Tần suất của các tế bào CD4 T tạo ra granzym B và 4B) Lượng IFN- γ phát hiện được bằng độ hấp thụ (mật độ quang học, O.D.) trong dịch nổi bề mặt của MLR với sự có mặt của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau với các nồng độ gia tăng.

Fig.5: 5A) Tác động của việc phong bế PD1/PD-L1 đối với sự tái hoạt hóa quá trình phát tín hiệu thụ thể tế bào T đã bị ức chế với sự có mặt của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau; 5B) Tác động của việc phong bế PD1/PD-L1 đối với sự tái hoạt hóa quá trình phát tín hiệu thụ thể tế bào T đã bị ức chế với sự có mặt của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau.

Fig.6: Cấu trúc của PD1-ECD trong phức hợp với Fab của PD1-0103.

Fig.7: Cấu trúc của phức hợp PD1-ECD với Fab PD1-0103: Sự glycosyl hóa tại Asn58 trên PD1 tham gia vào tương tác.

Fig.8: Cấu trúc của phức hợp PD1-ECD với Fab PD1-0103: Quan sát trên epitop/paratop.

Fig.9: Các điểm tiếp xúc PD1 của chuỗi bên đường lõi tại Asn58 – chuỗi nặng Fab PD1-0103: các điểm tiếp xúc được nhận biết theo điểm cắt khoảng cách là 5Å.

Fig.10: Các gốc của PD1-ECD tương tác với kháng thể - Quan sát trình tự với các tính chất tiếp xúc chi tiết – PD-1.

Fig.11: Các gốc của kháng thể tương tác với PD1-ECD - Quan sát trình tự với các tính chất tiếp xúc chi tiết – chuỗi nặng.

Fig.12: Các gốc của kháng thể mà tương tác với PD1-ECD - Quan sát trình tự với các tính chất tiếp xúc chi tiết – chuỗi nhẹ.

Fig.13A: Sự gắn kết của các kháng thể khác nhau vào PD1 không được glycosyl hóa tại Asn58 (bên trái) và vào PD1 đã được glycosyl hóa tại Asn58 (bên phải) (các đồ thị Biacore).

Fig.13B: Sự gắn kết của các kháng thể khác nhau vào PD1 không được glycosyl hóa tại Asn58 và vào PD1 đã được glycosyl hóa tại Asn58 – Tốc độ kết hợp-phân ly (on-off-rate) mAb được xác định bằng Biacore.

Fig.14A: Sự ức chế sinh trưởng khối u *in vitro* của PD1-0103-0312 (aPD-1) so với nivolumab ở dạng tổ hợp với kháng thể CEA-CD3 đặc hiệu kép - ở các liều thấp.

Fig.14B: Sự ức chế sinh trưởng khối u *in vitro* của PD1-0103-0312 (aPD-1) so với nivolumab ở dạng tổ hợp với kháng thể CEA-CD3 đặc hiệu kép - ở các liều cao.

Mô tả chi tiết sáng chế

“Khung nhận của người” đối với mục đích trong bản mô tả này là khung chứa trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được lấy từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được định nghĩa dưới đây. Khung nhận của người “được lấy từ” khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể chứa cùng trình tự axit amin của nó, hoặc có thể chứa các thay đổi trong trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lượng các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, khung nhận VL của người có trình tự

giống với trình tự khung globulin miễn dịch VL của người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “PD1”, “PD1 của người”, “PD-1” hoặc “PD-1 của người” dùng để chỉ protein PD1 của người (SEQ ID NO: 68) (protein không có trình tự tín hiệu)/(SEQ ID NO: 70) (protein có trình tự tín hiệu). Trong bản mô tả này, kháng thể “gắn kết vào PD1 của người”, “gắn kết đặc hiệu vào PD1 của người”, “gắn kết với PD1 của người” hoặc “kháng thể kháng PD1” dùng để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên PD1 của người hoặc miền ngoại bào (ECD) của nó với ái lực gắn kết có giá trị K_D là $1,0 \times 10^{-8}$ mol/L hoặc nhỏ hơn, theo một phương án, có giá trị K_D là $1,0 \times 10^{-9}$ mol/L hoặc nhỏ hơn, theo một phương án, có giá trị K_D nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^{-9}$ mol/L đến $1,0 \times 10^{-13}$ mol/L. Ái lực gắn kết được xác định bằng thử nghiệm gắn kết tiêu chuẩn, như kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Thụy Điển), ví dụ, bằng cách sử dụng miền ngoại bào của PD1.

PD1 của người có các vị trí glycosyl hóa liên kết N tại các gốc PD-1 49, 58, 74 của SEQ ID NO. 70 (xem, ví dụ, tài liệu D.Y. Lin et al, PNAS 105 (2008) 3011–3016)). Nhánh chuỗi đường lõi (glycosyl hóa liên kết N) ở vị trí Asn58 của PD-1 có cấu trúc nêu dưới đây đối với các monosacarit. Theo một phương án, chuỗi đường lõi tại Asn58 của PD1 dùng để chỉ 5 đường (monosacarit) đầu tiên được gắn vào PD1 tại Asn58.

Asn58-N-GlcNAc(FUC) – GlcNAc – BMA – MAN (xem Fig.9) trong đó các ký hiệu viết tắt dưới đây được sử dụng.

[GlcNAc] = NGA = N-acetyl-beta-D-galactosamin = 2-(axetyl-amino)-2-deoxy-beta-D-galactopyranoza

[FUC] = alpha-L-fucoza

[BMA] = beta-D-mannopyranoza

[MAN] = alpha-D-mannopyranoza

GlcNAc đầu tiên trong chuỗi đường được fucosyl hóa, được viết tắt là GlcNAc(FUC).

Theo một phương án, chuỗi đường lõi tại Asn58 của PD1 dùng để chỉ 5 đường (monosacarit) đầu tiên GlcNAc, FUC, GlcNAc, BMA, MAN được gắn vào PD1 tại Asn58.

Thuật ngữ “kháng thể” trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) và mảnh kháng thể, miễn là chúng thể hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

“Mảnh kháng thể” dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn nhưng chứa một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết vào kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này gắn vào đó. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; kháng thể thể đôi; kháng thể mạch thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

“Kháng thể gắn kết vào cùng một epitop” như kháng thể tham chiếu dùng để chỉ kháng thể phong bế sự gắn kết của kháng thể tham chiếu vào kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh đến 50% hoặc hơn, và ngược lại, kháng thể tham chiếu này phong bế sự gắn kết của kháng thể vào kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh đến 50% hoặc hơn. Thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ được trình bày trong bản mô tả này.

Thuật ngữ kháng thể “thể khảm” dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ một loài hoặc nguồn cụ thể, còn phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ một loài hoặc nguồn khác.

“Lớp” kháng thể dùng để chỉ loại miền hằng định hoặc vùng hằng định mà chuỗi nặng của nó có. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một số lớp trong số này có thể được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ và IgA₂. Các miền hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ và μ , một cách tương ứng.

Thuật ngữ “chất gây độc tế bào” trong bản mô tả này dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn chặn chức năng của tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 và các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu); chất hóa trị hoặc thuốc hóa trị (ví dụ, metotrexat, adriamixin, vinca alkaloid (vincristin, vinblastin, etoposid), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, clorambuxil, daunorubicin hoặc các chất can thiệp khác); chất ức chế sinh trưởng; enzym và các mảnh của chúng như enzym phân giải axit nucleic; chất kháng sinh; độc tố như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc các biến thể của chúng; và các chất chống khối u hoặc các chất chống ung thư nêu dưới đây.

“Lượng có tác dụng” của chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng có tác dụng, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trị liệu hoặc phòng ngừa mong muốn.

Thuật ngữ “vùng Fc” trong bản mô tả này được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên gốc và các vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc này có thể có hoặc có thể không có mặt. Trừ khi có quy định khác, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong tài liệu Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

“Khung” hoặc “FR” dùng để chỉ các gốc của miền biến đổi mà không phải là các gốc của vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3 và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Các thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn” và “kháng thể toàn phần” được sử dụng trong bản mô tả này theo cách thay thế cho nhau để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản là tương tự với cấu trúc của kháng thể nguyên gốc hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc nêu trong bản mô tả này.

Các thuật ngữ “tế bào chủ”, “đồng tế bào chủ” và “giống cây tế bào chủ” được sử dụng theo cách thay thế cho nhau và dùng để chỉ tế bào trong đó axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thế hệ sau của tế bào này. Tế bào chủ bao gồm “thế biến nạp” và “tế bào biến nạp”, bao gồm tế bào biến nạp sơ cấp và thế hệ sau có nguồn gốc từ chúng, không tính đến số lần cấy chuyển. Thế hệ sau có thể không hoàn toàn giống về thành phần axit nucleic với tế bào bố mẹ, mà có thể chứa đột biến. Thế hệ sau đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào biến nạp ban đầu được bao gồm trong các thuật ngữ này.

“Kháng thể của người” là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bởi người hoặc tế bào người hoặc được lấy từ nguồn không phải của người mà sử dụng kho kháng thể của người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể của người khác. Định nghĩa này về kháng thể của người đặc biệt không bao gồm kháng thể được biến đổi giống như của người chứa các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người.

“Khung liên ứng của người” là khung đại diện cho các gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong một tập hợp trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Nhìn chung, tập hợp trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm trình tự miền biến đổi. Thông thường, phân nhóm trình tự này là phân nhóm như nêu trong tài liệu Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như nêu trong tài liệu Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như nêu trong tài liệu Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể “được biến đổi giống như của người” dùng để chỉ kháng thể thể khả chứa các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể được biến đổi

giống như của người về cơ bản là chứa toàn bộ ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các HVR (ví dụ, CDR) đều tương ứng với các HVR (ví dụ, CDR) của kháng thể không phải của người, và toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các FR đều tương ứng với các FR của kháng thể người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý có thể chứa ít nhất một phần vùng hằng định của kháng thể được lấy từ kháng thể của người. “Dạng được biến đổi giống như của người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, dùng để chỉ kháng thể trải qua quá trình biến đổi giống như của người.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR” trong bản mô tả này dùng để chỉ mỗi trong số các vùng của miền biến đổi kháng thể có tính siêu biến về trình tự (“vùng quyết định bổ sung” hoặc “CDR”) và/hoặc tạo thành các vòng xác định về mặt cấu trúc (“vòng siêu biến”) và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên (“vị trí tiếp xúc kháng nguyên”). Thông thường, kháng thể chứa sáu HVR: ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). Các HVR lấy làm ví dụ trong bản mô tả này bao gồm:

- (a) các vòng siêu biến xuất hiện tại các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));
- (b) các CDR xuất hiện tại các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
- (c) các vị trí tiếp xúc kháng nguyên xuất hiện tại các gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) và 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); và
- (d) các tổ hợp của (a), (b) và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) và 94-102 (H3).

Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) trong bản mô tả này được đánh số theo tài liệu Kabat et al., nêu trên.

“Thể liên hợp miễn dịch” là kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất gây độc tế bào.

“Cá thể” hoặc “đối tượng” là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật đã được thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo một số phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng là người.

Kháng thể “đã được phân lập” là kháng thể đã được tách ra khỏi một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, kỹ thuật điện di (ví dụ, SDS-PAGE, tập trung theo điểm đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc kỹ thuật sắc ký (ví dụ, HPLC trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Để biết tổng quan về các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, xem, ví dụ, tài liệu Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Axit nucleic “đã được phân lập” dùng để chỉ phân tử axit nucleic đã được tách ra khỏi một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic đã được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic chứa trong tế bào mà thường chứa phân tử axit nucleic này, nhưng phân tử axit nucleic này có mặt bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc tại vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

“Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng PD1” dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc các mảnh của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic trong một vectơ đơn lẻ hoặc trong các vectơ riêng biệt, và (các) phân tử axit nucleic có mặt tại một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể thu được từ một quần thể kháng thể về cơ bản là tương đồng, tức là, các kháng thể cá

thể trong quần thể này giống nhau và/hoặc gắn kết vào cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc xuất hiện trong quá trình tạo ra chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường chứa các kháng thể khác nhau hướng tới các yếu tố quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng chỉ hướng tới một yếu tố quyết định trên kháng nguyên. Vì vậy, từ bỏ nghĩa “đơn dòng” thể hiện đặc tính của kháng thể là được thu nhận từ một quần thể kháng thể về cơ bản là tương đồng, và không được hiểu là yêu cầu phải tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa toàn bộ hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp lấy làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được trình bày trong bản mô tả này.

“Kháng thể trần” dùng để chỉ kháng thể không được liên hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong dược phẩm. (Bao gồm nếu tình trạng kỹ thuật có các thể liên hợp miễn dịch)

“Kháng thể nguyên gốc” dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên có các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, kháng thể IgG nguyên gốc là glycoprotein dị tetrame khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau được nối với nhau bằng liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2 và CH3). Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là một miền hằng định chuỗi nhẹ (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được gắn vào một trong hai typ, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), trên cơ sở trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

Thuật ngữ “tờ hướng dẫn sử dụng” dùng để chỉ các hướng dẫn thường được đưa vào trong các gói hàng thương mại chứa sản phẩm trị liệu, chứa thông tin về chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng sản phẩm trị liệu này.

“Phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin” so với trình tự polypeptit tham chiếu được định nghĩa là phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp hàng các trình tự này và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm độ đồng nhất trình tự tối đa, và không coi bất kỳ cải biến thay thế bảo toàn nào là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp hàng nhằm mục đích xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính công bố công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các thông số thích hợp để sắp hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được mức thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, đối với các mục đích trong bản mô tả này, giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với tài liệu hướng dẫn sử dụng tại Cơ quan bản quyền Hoa Kỳ (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, được đăng ký tại đó với số đăng ký bản quyền Hoa Kỳ là TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được công bố công khai bởi Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 này nên được biên dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D số hóa. Tất cả các thông số so sánh trình tự đều được thiết lập bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong trường hợp ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % độ đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã cho với, đối với hoặc so với trình tự axit amin B đã cho (có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin

A đã cho có hoặc chứa % độ đồng nhất trình tự axit amin cụ thể với, đối với hoặc so với trình tự axit amin B đã cho) được tính như sau:

$$100 \text{ lần của phân số } X/Y$$

trong đó X là số lượng gốc axit amin được chấm điểm là các cặp so khớp giống nhau bởi chương trình sắp hàng trình tự ALIGN-2 trong bước sắp hàng A và B bằng chương trình đó, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng với chiều dài của trình tự axit amin B, thì % độ đồng nhất trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng với % độ đồng nhất trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả các giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này được thu lại như được mô tả trong đoạn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ “dược phẩm” dùng để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó có tác dụng, và không chứa các thành phần bổ sung độc không thể chấp nhận được đối với đối tượng sử dụng chế phẩm này.

“Chất mang dược dụng” dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, mà không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định hoặc chất bảo quản.

Trong bản mô tả này, “điều trị” (và các biến thể ngữ pháp của nó như “sự điều trị” hoặc “việc điều trị”) dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm nỗ lực làm thay đổi chu trình tự nhiên của cá thể được điều trị, và có thể được thực hiện để phòng ngừa hoặc trong chu trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng điều trị mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, cải thiện các triệu chứng, giảm bớt các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa di căn, giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm hoặc cải thiện tiên lượng. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để làm chậm sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ “vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên quan đến việc gắn kết kháng thể vào kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách tương ứng) của kháng thể nguyên gốc thường có cấu trúc tương tự, trong đó mỗi miền chứa bốn vùng khung (FR) bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). (Xem, ví dụ, tài liệu Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), trang 91). Một miền VH hoặc VL đơn lẻ có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể mà gắn kết vào kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể mà gắn kết vào kháng nguyên đó để sàng lọc thư viện miền VL hoặc VH bổ sung, một cách tương ứng. Xem, ví dụ, tài liệu Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628).

Thuật ngữ “vector” trong bản mô tả này dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân rộng một axit nucleic khác mà nó được liên kết vào đó. Thuật ngữ này bao gồm vector dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ mà nó được đưa vào đó. Một số vector cụ thể có khả năng điều khiển sự biểu hiện của axit nucleic mà nó được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào đó. Các vector như vậy trong bản mô tả này được gọi là “vector biểu hiện”.

I. Chế phẩm và phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa một phần vào kết quả rằng kháng thể kháng PD1 được chọn lọc theo sáng chế gắn kết vào một số epitop cụ thể của PD1, và có khả năng làm tăng sự hoạt hóa các tế bào miễn dịch khác nhau (ví dụ, tế bào T, tế bào B, tế bào NK, tế bào đuôi gai (DC), bạch cầu đơn nhân to và đại thực bào). Ví dụ, chúng làm tăng sự giải phóng (tiết) xytokin điều biến miễn dịch (ví dụ, interferon gamma và granzym B). Các xytokin điều biến miễn dịch khác mà được hoặc có thể được làm tăng là, ví dụ, sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) và IL-12. Trong bản mô tả này, các thuật ngữ tiết interferon-gamma (IFN-gamma), yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha), IL-12, v.v., dùng để chỉ các xytokin của người.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1. Kháng thể theo sáng chế hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị bệnh ung thư.

A. Các kháng thể kháng PD1 lấy làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 trong đó kháng thể này:

- i) cạnh tranh để gắn kết vào PD-1 với kháng thể kháng PD1 chứa VH và VL của PD1-0103, và
- ii) gắn kết vào PD-1 của người và của khỉ đuôi dài; và
- iii) làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 90% hoặc hơn, theo một phương án được ưu tiên, đến 95% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL (trong đó mức tiết khi không có kháng thể được thiết lập là 0% (mức cơ sở của IFN gamma) và mức tiết khi có IL-2 tái tổ hợp của người 20 EU/mL được thiết lập là 100% (trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) (dị sinh) theo ví dụ 3); và/hoặc
- iv) làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 250% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL (trong đó sự tiết khi không có kháng thể được thiết lập là 0% (mức cơ sở của IFN gamma) và mức tiết khi có IL-2 tái tổ hợp của người 20 EU/mL được thiết lập là 100% (trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) (dị sinh) theo ví dụ 3).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:3; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58; hoặc
- ii) trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59; hoặc
- iii) trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60; hoặc
- iv) trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:11; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin là SEQ ID NO:12; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:11; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:11; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:11; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:15 và trình tự VL là SEQ ID NO:16;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin là SEQ ID NO:20; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:19; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:19; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:23 và trình tự VL là SEQ ID NO:24;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:27; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin là SEQ ID NO:28; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:27; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:27; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:27; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:31 và trình tự VL là SEQ ID NO:32;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:35; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin là SEQ ID NO:36; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:35; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:35; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:35; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:39 và trình tự VL là SEQ ID NO:40;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:43; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin là SEQ ID NO:44; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:43; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:43; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:43; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:47 và trình tự VL là SEQ ID NO:48;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:51; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit

amin là SEQ ID NO:52; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:51; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:51; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:51; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 này chứa

- i) trình tự VH là SEQ ID NO:47 và trình tự VL là SEQ ID NO:48;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào cùng một epitop như kháng thể kháng PD1 chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến kháng thể cạnh tranh để gắn kết vào PD1 của người với kháng thể kháng PD1 chứa trình tự VH là SEQ ID

NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8 (như được xác định trong thử nghiệm cạnh tranh được mô tả trong ví dụ 2 (ELISA lập bản đồ epitop/thử nghiệm cạnh tranh gắn kết)).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 (ví dụ, kháng thể gắn kết vào PD1 của người) chứa

A) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 (ví dụ, kháng thể gắn kết vào PD1 của người) chứa

(a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:3; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1 của người

A)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc B)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58.
- ii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59.
- iii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60.
- iv) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

hoặc C)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:15 và trình tự VL là SEQ ID NO:16;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc D)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:23 và trình tự VL là SEQ ID NO:24;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc E)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:31 và trình tự VL là SEQ ID NO:32;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc F)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:39 và trình tự VL là SEQ ID NO:40;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc G)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:47 và trình tự VL là SEQ ID NO:48;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc H)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:55 và trình tự VL là SEQ ID NO:56;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1 của người

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1 của người chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1 của người chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1 của người chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết vào PD1 của người chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 (ví dụ, kháng thể gắn kết vào PD1 của người) chứa

A) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc

B) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:11; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14; hoặc

C) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22; hoặc

D) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:27; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (e) HVR-L2 chứa

trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30; hoặc

E) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:35; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38; hoặc

F) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:43; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46; hoặc

G) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:51; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54;

trong đó kháng thể này được đặc trưng một cách độc lập bởi một hoặc nhiều tính chất nêu dưới đây: kháng thể kháng PD-1 này

i) cạnh tranh với kháng thể kháng PD-1 chứa VH và VL của PD1-0103 để gắn kết vào PD-1, và/hoặc

ii) gắn kết vào PD-1 của người và của khỉ đuôi dài; và/hoặc

iii) làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc lớn hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 90% hoặc lớn hơn, theo một phương án được ưu tiên, đến 95% hoặc lớn hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL (trong đó sự tiết khi không có kháng thể được thiết lập là 0% (mức cơ sở của IFN gamma) và sự tiết khi có IL-2 tái tổ hợp của người 20 EU/mL được thiết lập là 100% (trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) (dị sinh) theo ví dụ 3); và/hoặc

iv) làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 250% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL (trong đó mức tiết khi không có kháng thể được thiết lập là 0% (mức cơ sở của IFN gamma) và mức tiết khi có IL-2 tái tổ hợp của người 20 EU/mL được thiết lập là 100% (trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) (dị sinh) theo ví dụ 3).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 (ví dụ, kháng thể gắn kết vào PD1 của người) chứa

- A) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:3; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc
- B) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:11; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14; hoặc
- C) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:19; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22; hoặc
- D) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:27; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30; hoặc

E) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:35; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38; hoặc

F) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:43; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46; hoặc

G) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:51; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54;

trong đó kháng thể này được đặc trưng một cách độc lập bởi một hoặc nhiều tính chất nêu dưới đây: kháng thể kháng PD-1 này

i) cạnh tranh với kháng thể kháng PD-1 chứa VH và VL của PD1-0103 để gắn kết vào PD-1, và/hoặc

ii) gắn kết vào PD-1 của người và của khỉ đuôi dài; và/hoặc

iii) làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 90% hoặc hơn, theo một phương án được ưu tiên, đến 95% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL (trong đó mức tiết khi không có kháng thể được thiết lập là 0% (mức cơ sở của IFN gamma) và mức tiết khi có IL-2 tái tổ hợp của người 20 EU/mL được thiết lập là 100% (trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) (dị sinh) theo ví dụ 3); và/hoặc

iv) làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến

250% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 $\mu\text{g/mL}$ (trong đó mức tiết khi không có kháng thể được thiết lập là 0% (mức cơ sở của IFN gamma) và mức tiết khi có IL-2 tái tổ hợp của người 20 EU/mL được thiết lập là 100% (trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) (dị sinh) theo ví dụ 3).

Theo một khía cạnh khác theo sáng chế, kháng thể kháng PD1 theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể thể khảm, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể của người. Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 là mảnh kháng thể, ví dụ, mảnh Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể thể đôi hoặc mảnh $F(ab')_2$. Theo một phương án khác, kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4 nguyên vẹn hoặc lớp hoặc isotyp kháng thể khác như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng PD1 theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu được mô tả trong các phần 1-7 dưới đây, ở dạng đơn lẻ hoặc kết hợp:

1. Ái lực của kháng thể

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này có hệ số phân ly KD là $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ hoặc $\leq 0,001 \text{ nM}$ (ví dụ, 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Theo một phương án được ưu tiên, KD được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng BIACORE®) ở nhiệt độ 25°C với chip CM5 có kháng nguyên được giữ cố định trên đó ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU). Một cách ngắn gọn, chip cảm biến sinh học dextran đã được carboxymetyl hóa (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hóa bằng *N*-etyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuccinimide (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng với natri axetat 10 mM, độ pH=4,8, đến 5 $\mu\text{g/mL}$ (~0,2 μM) trước khi tiêm với tốc độ dòng chảy là 5 $\mu\text{L/phút}$ để đạt được xấp xỉ 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein đã ghép cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, etanolamin 1 M được tiêm để phong bế các nhóm không phản ứng. Để đo các thông số động học, các dịch pha loãng hai lần theo dãy của Fab (0,78 nM đến 500 nM) được tiêm vào

PBS với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 (TWEEN-20™) 0,05% (PBST) ở nhiệt độ 25°C với tốc độ dòng chảy là xấp xỉ 25 $\mu\text{L}/\text{phút}$. Tốc độ kết hợp (kon hoặc ka) và tốc độ phân ly (koff hoặc kd) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-một đơn giản (phần mềm đánh giá BIACORE® phiên bản 3.2) bằng cách làm khớp đồng thời các đồ thị (sensorgram) kết hợp và phân ly. Hệ số phân ly cân bằng KD được tính dưới dạng tỷ số kd/ka (koff/kon.) Xem, ví dụ, tài liệu Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881. Nếu tốc độ kết hợp (on-rate) vượt quá $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ theo thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt nêu trên, thì tốc độ kết hợp này có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật tắt huỳnh quang mà đo lường tăng hoặc giảm cường độ phát huỳnh quang (kích thích = 295 nm; phát xạ = 340 nm, dải thông 16 nm) ở nhiệt độ 25°C của kháng thể kháng kháng nguyên (dạng Fab) 20 nM trong PBS, độ pH=7,2, với sự có mặt của các nồng độ kháng nguyên tăng như được đo trong thiết bị đo phổ, như thiết bị đo quang phổ có trang bị bộ phận chặn dòng (Aviv Instruments) hoặc thiết bị đo quang phổ SLM-AMINCO™ sê-ri 8000 (ThermoSpectronic) với cuvet có khuấy.

2. Mảnh kháng thể

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv và scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để biết tổng quan về các mảnh kháng thể cụ thể, xem tài liệu Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Để biết tổng quan về các mảnh scFv, xem, ví dụ, tài liệu Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; xem thêm WO 93/16185; và các patent Mỹ số 5571894 và 5587458. Để biết các thảo luận về các mảnh Fab và F(ab')₂ chứa các gốc epitop gắn kết thụ thể cứu trợ (salvage receptor) và làm tăng thời gian bán hủy *in vivo*, xem patent Mỹ số 5869046.

Kháng thể thể đôi là mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; và Holliger, P. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Các kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong tài liệu Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134).

Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể chứa toàn bộ hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, patent Mỹ số 6248516 B1).

Mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kỹ thuật phân giải protein đối với kháng thể nguyên vẹn cũng như kỹ thuật tạo ra bởi tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ, *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như được nêu trong bản mô tả này.

3. Kháng thể thể khảm và kháng thể được biến đổi giống như của người

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là kháng thể thể khảm. Các kháng thể thể khảm cụ thể được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 4816567; và Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). Trong một ví dụ, kháng thể thể khảm chứa vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi được lấy từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Trong một ví dụ khác, kháng thể thể khảm là kháng thể “được chuyển lớp” trong đó lớp hoặc phân lớp được thay đổi so với lớp hoặc phân lớp của kháng thể bố mẹ. Kháng thể thể khảm bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án nhất định, kháng thể thể khảm là kháng thể được biến đổi giống như của người. Thông thường, kháng thể không phải của người được biến đổi giống như của người để làm giảm tính sinh miễn dịch đối với người, nhưng vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể bố mẹ không phải của người đó. Thông thường, kháng thể được biến đổi giống như của người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (hoặc các phần của chúng) được lấy từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của chúng) được lấy từ các trình tự kháng thể của người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý cũng chứa ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được biến đổi giống như của người được thay thế bằng

các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà các gốc HVR được lấy từ đó), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được biến đổi giống như của người và các phương pháp tạo ra chúng được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu Riechmann, I. et al., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; các patent Mỹ số 5821337, 7527791, 6982321 và 7087409; Kashmiri, S.V. et al., *Methods* 36 (2005) 25-34 (mô tả kỹ thuật ghép SDR (a-CDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (mô tả “kỹ thuật tái tạo bề mặt”); Dall’Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (mô tả “kỹ thuật xáo trộn FR”); và Osbourn, J. et al., *Methods* 36 (2005) 61-68 và Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (mô tả phương pháp “chọn lọc có hướng dẫn” để làm xáo trộn FR).

Các vùng khung của người mà có thể được sử dụng trong bước biến đổi giống như của người bao gồm, nhưng không giới hạn ở: vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp “khớp tốt nhất” (xem, ví dụ, tài liệu Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; vùng khung được lấy từ trình tự liên ứng của kháng thể của người thuộc phân nhóm cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (xem, ví dụ, tài liệu Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; và Presta, L.G. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); vùng khung thuần thực (được gây đột biến soma) của người hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, tài liệu Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); và vùng khung thu được thông qua sàng lọc các thư viện FR (xem, ví dụ, tài liệu Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 và Rosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Kháng thể của người

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là kháng thể của người. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể của người được mô tả chung

trong tài liệu van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 và Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459.

Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất sinh miễn dịch cho động vật chuyển gen đã được cải biến để tạo ra kháng thể nguyên vẹn của người hoặc kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi của người nhằm đáp ứng lại thách thức kháng nguyên. Động vật này thường chứa toàn bộ hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, thay cho locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc được kết hợp một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật. Ở chuột nhắt chuyển gen như vậy, locus globulin miễn dịch nội sinh thường bị làm bất hoạt. Để biết tổng quan về các phương pháp thu được kháng thể của người từ động vật chuyển gen, xem tài liệu Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125. Xem thêm, ví dụ, các patent Mỹ số 6075181 và 6150584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; patent Mỹ số 5770429 mô tả công nghệ HUMAB®; patent Mỹ số 7041870 mô tả công nghệ K-M MOUSE® và công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2007/0061900 mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Vùng biến đổi của người từ kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi động vật này có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng hằng định khác của người.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp trên cơ sở tế bào lai. Dòng tế bào u tủy của người và dòng tế bào u tủy khác loại của chuột nhắt-người dùng để tạo ra kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (Xem, ví dụ, tài liệu Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; và Boerner, P. et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Kháng thể của người được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai đối với tế bào B của người cũng được mô tả trong tài liệu Li, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562. Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7189826 (mô tả việc tạo ra kháng thể IgM đơn dòng của người từ dòng tế bào lai) và trong tài liệu Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268 (mô tả tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong tài liệu Vollmers, H.P. and Brandlein, S., *Histology and*

Histopathology 20 (2005) 927-937 và Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập trình tự miền biến đổi dòng vô tính Fv được chọn lọc từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người. Trình tự miền biến đổi này sau đó có thể được kết hợp với miền hằng định mong muốn của người. Các kỹ thuật chọn lọc kháng thể của người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Kháng thể được lấy từ thư viện

Kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp để thu nhận kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, có nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện này để thu nhận kháng thể có các đặc tính gắn kết mong muốn. Các phương pháp như vậy được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Hoogenboom, H.R. et al., Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37 và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu McCafferty, J. et al., Nature 348 (1990) 552-554; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. et al., J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. and Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. et al., J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. et al., J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472; và Lee, C.V. et al., J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132.

Trong các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn cụ thể, các kho gen VH và VL được tách dòng một cách riêng biệt bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp một cách ngẫu nhiên trong các thư viện thể thực khuẩn, các thư viện này sau đó có thể được sàng lọc để thu nhận thể thực khuẩn gắn kết kháng nguyên như được mô tả trong tài liệu Winter, G. et al., Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455. Thể thực khuẩn thường biểu hiện mảnh kháng thể dưới dạng mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc dưới dạng mảnh Fab. Các thư viện từ các nguồn đã được gây miễn dịch cung cấp kháng thể có ái lực cao đối với chất sinh miễn dịch mà không cần phải tạo cấu trúc tế bào lai. Theo cách khác, kho chưa quen với thử nghiệm có thể được tách dòng (ví dụ, từ người) để tạo ra nguồn kháng thể đơn lẻ đối với nhiều loại kháng

nguyên không tự thân và cả kháng nguyên tự thân mà không cần đến bất kỳ quá trình gây miễn dịch nào như được mô tả trong tài liệu Griffiths, A.D. et al., EMBO J. 12 (1993) 725-734. Cuối cùng, các kháng thể chưa quen với thử nghiệm cũng có thể được tạo ra một cách tổng hợp bằng cách tách dòng các phân đoạn gen V không được tái sắp xếp từ tế bào gốc, và bằng cách sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa các vùng CDR3 có tính biến đổi cao và để thực hiện việc tái sắp xếp *in vitro*, như được mô tả trong tài liệu Hoogenboom, H.R. and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388. Các công bố đơn sáng chế mô tả các thư viện thể thực khuẩn biểu hiện kháng thể của người bao gồm, ví dụ: patent Mỹ số 5750373, và các công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 và 2009/0002360.

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể đã được phân lập từ các thư viện kháng thể của người được xem là kháng thể của người hoặc mảnh kháng thể của người trong bản mô tả này.

6. Kháng thể đa đặc hiệu

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo một số phương án nhất định, một trong các tính đặc hiệu gắn kết này là cho PD1 và tính đặc hiệu gắn kết còn lại là cho kháng nguyên khác bất kỳ. Theo một số phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép có thể gắn kết vào hai epitop khác nhau của PD1. Kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để định vị chất gây độc tế bào đến tế bào biểu hiện PD1. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra dưới dạng kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh kháng thể.

Các kỹ thuật tạo ra kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu Milstein, C. and Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, và Traunecker, A. et al., EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), và kỹ thuật “tra khóa vào ổ” (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5731168). Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách xử lý kỹ thuật các hiệu ứng điều

hướng tĩnh điện để tạo ra phân tử Fc kháng thể dị dime (WO 2009/089004); liên kết ngang hai hoặc nhiều hơn hai kháng thể hoặc mảnh (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4676980, và Brennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83); sử dụng khóa kéo leuxin để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, tài liệu Kostelny, S.A. et al., J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553; sử dụng công nghệ “kháng thể thể đôi” để tạo ra mảnh kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, tài liệu Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); và sử dụng dime Fv chuỗi đơn (sFv) (xem, ví dụ, tài liệu Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); và tạo ra kháng thể thể ba như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

Các kháng thể được xử lý kỹ thuật với ba hoặc nhiều hơn ba vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng, bao gồm “kháng thể Octopus (kháng thể có nhiều vị trí đặc hiệu)”, cũng được bao gồm trong bản mô tả này (xem, ví dụ, US 2006/0025576).

Kháng thể hoặc mảnh nêu trong bản mô tả này còn bao gồm “Fab chức năng kép” hay “DAF” chứa vị trí gắn kết kháng nguyên mà gắn kết vào PD1 cũng như kháng nguyên khác (xem, ví dụ, US 2008/0069820).

Kháng thể hoặc mảnh nêu trong bản mô tả này còn bao gồm kháng thể đa đặc hiệu được mô tả trong WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, và WO 2010/145793, WO2011/117330, WO2012/025525, WO2012/025530, WO2013/026835, WO2013/026831, WO2013/164325 hoặc WO 2013/174873.

7. Biến thể của kháng thể

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể của trình tự axit amin của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, có thể mong muốn là cải thiện được ái lực gắn kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Biến thể của trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, cải biến làm khuyết và/hoặc cải biến cài xen và/hoặc cải biến thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của cải biến làm khuyết, cải biến cài xen và cải biến thay thế có thể được thực

hiện để thu được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên.

a) Biến thể thay thế, biến thể cài xen và biến thể làm khuyết

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể của kháng thể có một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin. Các vị trí được quan tâm để gây đột biến thay thế bao gồm HVR và FR. Các thay đổi lấy làm ví dụ được trình bày trong bảng 1 với tiêu đề là “cải biến thay thế lấy làm ví dụ”, và như được mô tả thêm dưới đây liên quan đến các nhóm chuỗi bên axit amin. Các cải biến thay thế bảo toàn được thể hiện trong bảng 1 với tiêu đề là “cải biến thay thế được ưu tiên”. Cải biến thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đang quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc để thu nhận hoạt tính mong muốn, ví dụ, sự gắn kết kháng nguyên được giữ lại/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC cải thiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Cải biến thay thế lấy làm ví dụ	Cải biến thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Các axit amin có thể được nhóm theo các tính chất chuỗi bên chung:

- (1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) có tính axit: Asp, Glu;
- (4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc gây ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro;
- (6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các cải biến thay thế không bảo toàn sẽ phải trao đổi thành viên thuộc một trong số các lớp này cho một lớp khác.

Một loại biến thể thay thế bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể bố mẹ (ví dụ, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể của người). Thông thường, (các) biến thể tạo thành được chọn lọc để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, các cải thiện) về một số tính chất sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể bố mẹ và/hoặc sẽ có một số tính chất sinh học cụ thể của kháng thể bố mẹ về cơ bản được giữ lại. Cải biến thay thế lấy làm ví dụ là kháng thể thuần thực ái lực, mà có thể được tạo ra một cách thông thường, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật thuần thực ái lực trên cơ sở biểu hiện thể thực khuẩn như các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này. Một cách ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và kháng thể biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc để thu nhận hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Các thay đổi (ví dụ, cải biến thay thế) có thể được tạo ra trong HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực của kháng thể. Các thay đổi này có thể được tạo ra trong “điểm nóng” HVR, tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon mà trải qua quá trình đột biến với tần suất cao trong quá trình thuần thực soma (xem, ví dụ, tài liệu Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), và/hoặc SDR (a-CDR), và biến thể VH hoặc VL tạo thành được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Sự thuần thực ái lực bằng cách tạo cấu trúc và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Hoogenboom, H.R. et al. in *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. Theo

một số phương án về việc thuần thực ái lực, tính đa dạng được đưa vào gen có khả năng biến đổi được chọn để thuần thực bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương án nêu ở trên (ví dụ, PCR dễ bị lỗi, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến định hướng oligonucleotit). Thư viện thứ cấp được tạo ra sau đó. Thư viện này sau đó được sàng lọc để nhận biết biến thể kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Phương pháp khác để đưa sự đa dạng vào bao gồm phương pháp định hướng HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lúc) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR tham gia vào sự gắn kết kháng nguyên có thể được nhận biết một cách đặc hiệu, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật lập mô hình hoặc gây đột biến quét alanin. Cụ thể, CDR-H3 và CDR-L3 thường được nhắm tới.

Theo một số phương án nhất định, cải biến thay thế, cải biến cài xen hoặc cải biến làm khuyết có thể xuất hiện trong một hoặc nhiều HVR, miễn là các thay đổi này về cơ bản không làm giảm khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, cải biến thay thế bảo toàn nêu trong bản mô tả này) mà về cơ bản không làm giảm ái lực gắn kết có thể được tạo ra trong HVR. Các thay đổi này có thể ở bên ngoài “điểm nóng” HVR hoặc SDR. Theo một số phương án nhất định về trình tự VH và VL biến thể nêu ở trên, mỗi HVR không được làm thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba cải biến thay thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được nhắm tới để gây đột biến được gọi là “gây đột biến quét alanin” như được mô tả trong tài liệu Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. Trong phương pháp này, gốc hoặc nhóm các gốc đích (ví dụ, các gốc mang điện như arg, asp, his, lys và glu) được nhận biết và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các cải biến thay thế khác nữa có thể được đưa vào tại các vị trí axit amin thể hiện độ nhạy chức năng đối với các cải biến thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận diện các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được hướng

đích hoặc loại bỏ với vai trò là ứng viên thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Cải biến cài xen trình tự axit amin bao gồm đột biến dung hợp đầu tận amino và/hoặc đầu tận carboxyl có chiều dài nằm trong khoảng từ một gốc đến polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như cải biến cài xen một hoặc nhiều gốc axit amin bên trong chuỗi. Các ví dụ về cải biến cài xen đầu tận bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu N. Các biến thể cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm đột biến dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C của kháng thể với enzym (ví dụ, đối với ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể.

b) Biến thể của vùng Fc

Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề cập trong bản mô tả này, từ đó tạo ra biến thể của vùng Fc. Biến thể của vùng Fc có thể chứa trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) chứa cải biến axit amin (ví dụ, cải biến thay thế) tại một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Các kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm các kháng thể có cải biến thay thế một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6737056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc có các cải biến thay thế tại hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến Fc được gọi là “DANA” có cải biến thay thế gốc 265 và 297 thành alanin (patent Mỹ số 7332581).

Một số biến thể kháng thể nhất định có khả năng gắn kết vào FcR được cải thiện hoặc giảm đi được mô tả. (Xem, ví dụ, patent Mỹ số 6737056; WO 2004/056312, và Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể này là IgG1 có các đột biến L234A và L235A hoặc có các đột biến L234A, L235A và P329G. Theo một phương án khác, kháng thể này là IgG4 có các đột biến S228P và L235E hoặc S228P, L235E hoặc và P329G (đánh số theo chỉ số EU được mô tả trong tài liệu Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Kháng thể có thời gian bán hủy tăng và khả năng gắn kết cải thiện vào thụ thể Fc mới sinh (FcRn), mà chịu trách nhiệm vận chuyển IgG từ mẹ sang bào thai (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, và Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), được mô tả trong US 2005/0014934. Kháng thể này chứa vùng Fc với một hoặc nhiều cải biến thay thế trong đó để cải thiện sự gắn kết của vùng Fc vào FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm các biến thể Fc có các cải biến thay thế tại một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, cải biến thay thế gốc vùng Fc 434 (patent Mỹ số 7371826).

Xem thêm tài liệu Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5648260; US 5624821; và WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác về biến thể của vùng Fc.

c) Biến thể kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein

Theo một số phương án nhất định, có thể mong muốn là tạo ra được kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein, ví dụ, “thioMAb”, trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thay thế bằng gốc xystein. Theo một số phương án nhất định, các gốc được thay thế xuất hiện tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Nhờ việc thế các gốc này bằng xystein, các nhóm thiol có tính phản ứng nhờ đó được định vị tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể với các gốc khác, như gốc thuốc hoặc gốc thuốc-nhóm liên kết, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc sau đây có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số EU) của vùng Fc chuỗi nặng. Kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7521541.

d) Dẫn xuất của kháng thể

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này có thể được cải biến tiếp để chứa các gốc không chứa protein khác đã biết trong lĩnh vực này và đã có sẵn. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất của kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme tan trong nước. Các ví dụ không nhằm giới hạn sáng chế về polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme của etylen/maleic anhydrit, axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, copolyme của propylen oxit/etylen oxit, polyol đã được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có ưu điểm trong sản xuất nhờ tính ổn định trong nước của nó. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể là mạch phân nhánh hoặc mạch không phân nhánh. Số lượng polyme gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, thì chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Thông thường, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các yếu tố cân nhắc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, liệu dẫn xuất của kháng thể này có được sử dụng trong trị liệu trong điều kiện xác định hay không, v.v..

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến thể liên hợp của kháng thể và gốc không chứa protein mà có thể được làm nóng một cách chọn lọc bằng cách cho tiếp xúc với bức xạ. Theo một phương án, gốc không chứa protein là ống nano cacbon (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bước sóng không gây hại cho các tế bào bình thường, nhưng là các bước sóng làm nóng gốc không chứa protein đến nhiệt độ mà tại đó các tế bào trong vùng lân cận kháng thể-gốc không chứa protein bị tiêu diệt.

B. Phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm

Kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm, ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 4816567. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng PD1 nêu trong bản mô tả này. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin chứa VL và/hoặc trình tự axit amin chứa VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện) chứa axit nucleic này. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic này. Theo một phương án như vậy, tế bào chủ chứa (ví dụ, được biến nạp với): (1) vector chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, hoặc (2) vector thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vector thứ hai chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO) hoặc tế bào dạng lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể kháng PD1, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể nêu ở trên trong điều kiện thích hợp đối với việc biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể này từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để tạo ra kháng thể kháng PD1 theo cách tái tổ hợp, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như nêu ở trên, được phân lập và được cài xen vào một hoặc nhiều vector để tiếp tục tách dòng và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Axit nucleic này có thể được phân lập và giải trình tự một cách dễ dàng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng mẫu dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu vào gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện vector mã hóa kháng thể bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra ở vi khuẩn, đặc biệt là khi không cần đến quá trình glycosyl hóa và chức năng tác động Fc. Đối với việc biểu hiện mảnh kháng thể và polypeptit ở vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5648237, US 5789199 và US 5840523. (xem

thêm tài liệu Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, mô tả sự biểu hiện mảnh kháng thể ở *E. coli*). Sau khi biểu hiện, kháng thể này có thể được phân lập từ tế bào vi khuẩn thể nhão trong phân đoạn tan được và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài sinh vật nhân sơ, vi sinh vật nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men cũng là vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp đối với vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm các chủng nấm và nấm men mà quá trình glycosyl hóa của chúng đã “được biến đổi giống như của người”, dẫn đến việc tạo ra kháng thể có mô hình glycosyl hóa của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem tài liệu Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; và Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể đã được glycosyl hóa còn được lấy từ sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được nhận biết có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các giống cây tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, các patent Mỹ số 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 và 6417429 (công nghệ mô tả PLANTIBODIES™ để tạo ra kháng thể ở thực vật chuyển gen).

Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được làm thích nghi để sinh trưởng trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (293 hoặc tế bào 293 được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); tế bào thận chuột đồng con (BHK); tế bào Sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào canxinom cổ tử cung người (HELA); tế bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột Buffalo (BRL 3A); tế bào phổi người (W138); tế bào gan người (Hep G2); khối u vú chuột nhắt (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; tế bào MRC 5; và tế bào FS4.

Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), bao gồm tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); và dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để biết tổng quan về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú cụ thể thích hợp để tạo ra kháng thể, xem, ví dụ, tài liệu Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Thử nghiệm

Kháng thể kháng PD1 được đề cập trong bản mô tả này có thể được nhận biết, sàng lọc hoặc xác định đặc điểm về các tính chất lý/hóa và/hoặc các hoạt tính sinh học bằng nhiều thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

1. Thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, thẩm tách Western, v.v..

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận biết kháng thể cạnh tranh với PD1-0103 (chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8) để gắn kết vào PD1 (hoặc theo cách khác là với các kháng thể biến thể PD1-0103 được biến đổi giống như của người PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, có 5 đến 6 HVR giống nhau). Một phương án của sáng chế là kháng thể cạnh tranh với kháng thể kháng PD1 chứa tất cả 3 HVR của trình tự VH là SEQ ID NO:7 và tất cả 3 HVR của trình tự VL là SEQ ID NO:8 để gắn kết vào PD1 của người. Một phương án của sáng chế là kháng thể cạnh tranh với kháng thể kháng PD1 chứa tất cả 3 HVR của trình tự VH là SEQ ID NO:57 và tất cả 3 HVR của trình tự VL là SEQ ID NO:58 để gắn kết vào PD1 của người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết vào cùng một epitop (ví dụ, epitop thẳng hoặc epitop cấu trúc không gian) mà được gắn kết bởi kháng thể kháng PD1 PD1-0103. Các phương pháp chi tiết lấy làm ví dụ để lập bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết vào đó được nêu trong tài liệu Morris, G.E. (ed.),

Epitope Mapping Protocols, In: Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Humana Press, Totowa, NJ (1996).

Trong thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ, PD1(-ECD) đã được giữ cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể thứ nhất được đánh dấu mà gắn kết vào PD1 (ví dụ, kháng thể kháng PD1 PD1-0103 hoặc kháng thể được biến đổi giống như của người PD1-0103-0312) và kháng thể thứ hai không được đánh dấu mà được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết vào PD1 của nó. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi bề mặt của tế bào lai. Để làm đối chứng, PD1 đã được giữ cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể thứ nhất được đánh dấu nhưng không chứa kháng thể thứ hai không được đánh dấu. Sau khi ủ trong điều kiện cho phép kháng thể thứ nhất gắn kết vào PD1, lượng kháng thể dư không gắn kết được loại bỏ, và lượng chất đánh dấu gắn liền với PD1 đã được giữ cố định được đo. Nếu lượng chất đánh dấu gắn liền với PD1 đã được giữ cố định giảm đi một cách đáng kể trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì điều này thể hiện rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết vào PD1. Xem tài liệu Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988). Để biết về thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ khác, xem ví dụ 2 (ELISA lập bản đồ epitop/thử nghiệm cạnh tranh gắn kết).

2. Thử nghiệm về hoạt tính

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thử nghiệm nhận biết kháng thể kháng PD1 có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, khả năng tăng cường sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào miễn dịch khác nhau, đặc biệt là tế bào T. Ví dụ, chúng làm tăng sự tiết xytokin điều biến miễn dịch (ví dụ, interferon-gamma (IFN-gamma) và/hoặc yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha)). Các xytokin điều biến miễn dịch khác mà được hoặc có thể được tăng cường là, ví dụ, IL12, granzym B v.v.. Hoạt tính sinh học cũng có thể bao gồm, khả năng phản ứng chéo gắn kết vào tế bào khi đuôi dài, cũng như gắn kết vào các loại tế bào khác. Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể có hoạt tính sinh học như vậy *in vivo* và/hoặc *in vitro*.

Theo một số phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học như được mô tả, ví dụ, trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

D. Th thể liên hợp miễn dịch (chỉ đối với bệnh ung thư hoặc cải biến đối với đích)

Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể kháng PD1 nêu trong bản mô tả này liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hóa trị hoặc thuốc hóa trị, chất ức chế sinh trưởng, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng) hoặc chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch là thể liên hợp kháng thể-thuốc (ADC: antibody-drug conjugate) trong đó kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều thuốc, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, maytansinoid (xem US 5208020, US 5416064 và EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc thuốc monomethyl auristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem US 5635483, US 5780588 và US 7498298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của chúng (xem US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710, US 5773001 và US 5877296; Hinman, L.M. et al., *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342; và Lode, H.N. et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928); anthracyclin như daunomycin hoặc doxorubicin (xem tài liệu Kratz, F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. et al., *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721; Nagy, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. et al., *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343; và Patent Mỹ số 6630579); metotrexat; vindesin; taxan như doxorubicin, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này được liên hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, diphtheria chuỗi A, các mảnh không gắn kết có hoạt tính của độc tố diphtheria, ngoại độc tố chuỗi A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, modeccin chuỗi A, alpha-sarxin, protein

từ *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein từ *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII và PAP-S), chất ức chế từ *Momordica charantia*, curxin, crotin, chất ức chế từ *Sapaonaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin và tricothexen.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể nêu trong bản mô tả này được liên hợp với nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo ra thể liên hợp phóng xạ. Đã có sẵn nhiều chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ để tạo ra thể liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu. Khi thể liên hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể chứa nguyên tử có hoạt tính phóng xạ dùng cho nghiên cứu ghi đồ thị nhấp nháy, ví dụ $\text{TC}^{99\text{m}}$ hoặc I^{123} , hoặc chất ghi nhãn spin dùng để chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là chụp cộng hưởng từ, MRI), như iot-123 , iot-131 , indi-111 , flo-19 , cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Thể liên hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều loại chất ghép cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este có hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được tạo ra như được mô tả trong tài liệu Vitetta, E.S. et al., Science 238 (1987) 1098-1104. Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triamin pentaaxetic đã được đánh dấu bằng cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat lấy làm ví dụ để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO 94/11026. Nhóm liên kết có thể là “nhóm liên kết có thể phân cắt”, tạo điều kiện cho việc giải phóng thuốc gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, nhóm liên kết dễ phân hủy bởi axit, nhóm liên kết mẫn cảm với peptidaza, nhóm liên kết dễ phân hủy bởi ánh

sáng, nhóm liên kết dimetyl hoặc nhóm liên kết chứa disulfua (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; patent Mỹ số 5208020) có thể được sử dụng.

Thể liên hợp miễn dịch hoặc ADC nêu trong bản mô tả này rõ ràng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thể liên hợp như vậy được tạo ra với chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC và sulfo-SMPB, và SVSB (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có bán trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Hoa Kỳ).

E. Phương pháp và chế phẩm dùng để chẩn đoán và phát hiện

Theo một số phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD1 được đề cập trong bản mô tả này hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của PD1 trong mẫu sinh học. Thuật ngữ “phát hiện” trong bản mô tả này bao gồm sự phát hiện định tính hoặc định lượng. Theo một số phương án nhất định, mẫu sinh học chứa tế bào hoặc mô, như tế bào miễn dịch hoặc tế bào T thâm nhiễm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp phát hiện sự có mặt của PD1 trong mẫu sinh học. Theo một số phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể kháng PD1 như được nêu trong bản mô tả này trong điều kiện cho phép kháng thể kháng PD1 gắn kết vào PD1, và phát hiện xem liệu có tạo ra phức hợp giữa kháng thể kháng PD1 và PD1 hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 được sử dụng để lựa chọn đối tượng đủ điều kiện để trị liệu bằng kháng thể kháng PD1, ví dụ khi PD1 là chỉ thị sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 đã được đánh dấu. Chất đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đánh dấu hoặc gốc được phát hiện một cách trực tiếp (như chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu sinh màu, chất đánh dấu dày đặc điện tử, chất đánh dấu phát quang và chất đánh dấu có hoạt tính phóng xạ), cũng như gốc, như enzym hoặc phối tử, được phát

hiện một cách gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H và ^{131}I , nhóm huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc florescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, luxiferaza, ví dụ, luxiferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn (patent Mỹ số 4737456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza hồi hải mã (HRP), phosphataza kiềm, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactosa oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xantin oxidaza, kết hợp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất ghi nhãn spin, chất đánh dấu thể thực khuẩn, gốc tự do ổn định, và dạng tương tự.

F. Dược phẩm

Dược phẩm chứa kháng thể kháng PD1 như được nêu trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn kháng thể có mức độ tinh khiết mong muốn này với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), ở dạng chế phẩm được làm khô lạnh hoặc dung dịch chứa nước. Chất mang dược dụng thường là không độc đối với đối tượng nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadexyl dimethylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit có phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như poly(vinylpyrrolidon); axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; đôi ion tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen

glycol (PEG). Các chất mang được dụng lấy làm ví dụ trong bản mô tả này còn bao gồm chất phân tán thuốc trong kẽ như hyaluronidaza glycoprotein dễ tan có hoạt tính trung tính (sHASEGP), ví dụ, PH-20 hyaluronidaza glycoprotein dễ tan của người, như rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Các sHASEGP và phương pháp sử dụng lấy làm ví dụ cụ thể, bao gồm rhuPH20, được mô tả trong các công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các chế phẩm kháng thể được làm khô lạnh lấy làm ví dụ được mô tả trong patent Mỹ số 6267958. Các chế phẩm kháng thể chứa nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong patent Mỹ số 6171586 và WO 2006/044908, chế phẩm trong WO 2006/044908 chứa chất đệm histidin-axetat.

Dược phẩm nêu trong bản mô tả này có thể còn chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính khi cần đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là các thành phần có hoạt tính bổ sung mà không gây ảnh hưởng có hại cho nhau. Ví dụ, có thể mong muốn là tiếp tục tạo ra chúng. Các thành phần hoạt tính này có mặt một cách thích hợp ở dạng kết hợp với lượng có hiệu quả đối với mục đích dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được giữ trong vi nang được tạo ra, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc polyme hóa bề mặt phân cách, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metyl metacrylat), một cách tương ứng, trong hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và viên nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật như vậy được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980).

Dược phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về dược phẩm giải phóng kéo dài bao gồm cơ chất bán thấm gồm polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, cơ chất này ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng hoặc vi nang.

Dược phẩm để sử dụng *in vivo* thường là vô trùng. Tính vô trùng có thể được tạo ra dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng.

G. Phương pháp trị liệu và chế phẩm

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD1 (hoặc protein gắn kết kháng nguyên) được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong phương pháp trị liệu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 hoặc ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh ung thư, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng có tác dụng của kháng thể kháng PD1.

Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng làm chất kích thích miễn dịch/ hoặc kích thích sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma). Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng trong phương pháp kích thích miễn dịch/ hoặc kích thích sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng có tác dụng của kháng thể kháng PD1 để kích thích miễn dịch/ hoặc kích thích sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma).

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng làm chất kích thích miễn dịch/ hoặc kích thích sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha). Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 để sử dụng trong phương pháp kích thích miễn dịch/ hoặc kích thích sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng có tác dụng của kháng thể kháng PD1 để kích thích miễn dịch/ hoặc kích thích sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha).

Tốt hơn là “cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là người. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng PD1 trong sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này được dùng để điều trị bệnh ung thư. Theo một phương án khác, thuốc này được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh ung thư, bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh ung thư này

dùng lượng có tác dụng của thuốc đó. Theo một phương án khác, thuốc này được sử dụng để cảm ứng sự phân giải qua trung gian tế bào đối với các tế bào ung thư. Theo một phương án khác, thuốc này được sử dụng trong phương pháp cảm ứng sự phân giải qua trung gian tế bào đối với các tế bào ung thư ở cá thể mắc bệnh ung thư, bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng có tác dụng của thuốc này để gây ra sự chết theo chương trình ở tế bào ung thư/ hoặc để ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh ung thư này dùng lượng có tác dụng của kháng thể kháng PD1. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cảm ứng sự phân giải qua trung gian tế bào đối với các tế bào ung thư ở cá thể mắc bệnh ung thư. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng có tác dụng của kháng thể kháng PD1 để cảm ứng sự phân giải qua trung gian tế bào đối với các tế bào ung thư ở cá thể mắc bệnh ung thư. Theo một phương án, “cá thể” là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD1 được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu nêu trên. Theo một phương án, được phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD1 được đề cập trong bản mô tả này và chất mang được dùng.

Kháng thể theo sáng chế (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong phổi và trong mũi, và nếu cần để điều trị khu trú, sử dụng trong thương tổn. Việc truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng hoặc dưới da. Việc dùng liều có thể là theo đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc liệu việc sử dụng này là ngắn ngày hay cả đời. Các lịch trình dùng liều khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng một lần hoặc sử dụng nhiều lần ở

các thời điểm khác nhau, dùng liều cao (bolus) và truyền theo xung được dự tính đến trong bản mô tả này.

Kháng thể theo sáng chế được phối trộn, định liều và sử dụng theo cách thức phù hợp với tiêu chuẩn thực hành y tế tốt (GMP: good medical practice). Các yếu tố cần xem xét trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể cần điều trị, động vật có vú cụ thể cần điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây ra rối loạn, vị trí đưa chất vào cơ thể, phương pháp sử dụng, lịch trình sử dụng và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. Kháng thể không cần phải, nhưng tùy ý được phối trộn với một hoặc nhiều chất hiện đang được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang quan tâm. Lượng có tác dụng của các chất khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc kiểu điều trị, và các yếu tố khác nêu ở trên. Các chất này thường được sử dụng ở cùng liều lượng và đường sử dụng như được nêu trong bản mô tả này, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng nêu trong bản mô tả này, hoặc ở liều lượng bất kỳ và theo đường bất kỳ mà được xác định là thích hợp dựa vào kinh nghiệm/lâm sàng.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần điều trị, loại kháng thể, mức độ trầm trọng và chu trình của bệnh, liệu kháng thể được sử dụng nhằm mục đích ngăn ngừa hay trị liệu, liệu pháp trị liệu đã dùng trước đó, tiền sử lâm sàng và đáp ứng của bệnh nhân với kháng thể, và quyết định của bác sĩ điều trị. Kháng thể được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc trong một đợt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ trầm trọng của bệnh, liều lượng kháng thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,5 mg/kg - 10 mg/kg) có thể là liều lượng ứng viên ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, cho dù, ví dụ, bằng cách sử dụng riêng biệt một hoặc nhiều lần, hay bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu ở trên. Để sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường sẽ được duy trì cho đến khi có được sự ức chế triệu chứng bệnh mong muốn. Một liều lượng lấy làm ví dụ của kháng thể sẽ nằm trong khoảng

từ 0,05 mg/kg đến 10 mg/kg. Vì vậy, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều này có thể được sử dụng một cách ngắt quãng, ví dụ một tuần một lần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận khoảng từ hai đến hai mươi hoặc, ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều nạp ban đầu cao, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Chế độ dùng liều lấy làm ví dụ bao gồm việc dùng liều nạp kháng thể ban đầu khoảng 4 mg/kg, sau đó dùng liều duy trì kháng thể hằng tuần khoảng 2 mg/kg. Tuy nhiên, các chế độ dùng liều khác cũng có thể hữu ích. Tiến độ của liệu pháp này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông dụng.

Cần phải hiểu rằng chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu ở trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế thay thế cho hoặc bổ sung cho kháng thể kháng PD1.

Cần phải hiểu rằng chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu ở trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế thay thế cho hoặc bổ sung cho kháng thể kháng PD1.

II. Vật phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến vật phẩm sản xuất chứa các nguyên liệu hữu ích cho điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn như được nêu trên. Vật phẩm sản xuất chứa vật chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng nằm trên hoặc gắn liền với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa đựng chế phẩm mà bản thân nó hoặc ở dạng kết hợp với một chế phẩm khác có tác dụng điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý, và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút đậy có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm

này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý được lựa chọn. Ngoài ra, vật phẩm sản xuất có thể chứa (a) vật chứa thứ nhất chứa chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này chứa kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai chứa chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này chứa chất trị liệu khác nữa có hoạt tính gây độc tế bào hoặc có hoạt tính khác. Vật phẩm sản xuất theo phương án này của sáng chế có thể còn chứa tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm sản xuất có thể còn chứa vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm được dụng, như nước kim khuẩn dùng cho tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và quan điểm của người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, chất đệm, kim tiêm và bơm tiêm.

Cần phải hiểu rằng vật phẩm sản xuất bất kỳ trong số các vật phẩm sản xuất nêu trên có thể chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế thay thế cho hoặc bổ sung cho kháng thể kháng PD1.

Mô tả trình tự axit amin

SEQ ID NO: 1	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0103
SEQ ID NO: 2	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0103
SEQ ID NO: 3	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0103
SEQ ID NO: 4	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0103
SEQ ID NO: 5	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0103
SEQ ID NO: 6	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0103
SEQ ID NO: 7	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0103
SEQ ID NO: 8	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0103
SEQ ID NO: 9	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0098
SEQ ID NO: 10	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0098
SEQ ID NO: 11	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0098

SEQ ID NO: 12	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0098
SEQ ID NO: 13	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0098
SEQ ID NO: 14	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0098
SEQ ID NO: 15	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0098
SEQ ID NO: 16	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0098
SEQ ID NO: 17	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0050
SEQ ID NO: 18	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0050
SEQ ID NO: 19	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0050
SEQ ID NO: 20	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0050
SEQ ID NO: 21	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0050
SEQ ID NO: 22	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0050
SEQ ID NO: 23	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0050
SEQ ID NO: 24	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0050
SEQ ID NO: 25	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0069
SEQ ID NO: 26	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0069
SEQ ID NO: 27	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0069
SEQ ID NO: 28	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0069
SEQ ID NO: 29	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0069
SEQ ID NO: 30	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0069
SEQ ID NO: 31	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0069
SEQ ID NO: 32	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0069
SEQ ID NO: 33	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0073
SEQ ID NO: 34	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0073
SEQ ID NO: 35	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0073
SEQ ID NO: 36	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0073

SEQ ID NO: 37	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0073
SEQ ID NO: 38	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0073
SEQ ID NO: 39	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0073
SEQ ID NO: 40	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0073
SEQ ID NO: 41	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0078
SEQ ID NO: 42	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0078
SEQ ID NO: 43	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0078
SEQ ID NO: 44	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0078
SEQ ID NO: 45	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0078
SEQ ID NO: 46	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0078
SEQ ID NO: 47	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0078
SEQ ID NO: 48	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0078
SEQ ID NO: 49	HVR-H1 chuỗi nặng, PD1-0102
SEQ ID NO: 50	HVR-H2 chuỗi nặng, PD1-0102
SEQ ID NO: 51	HVR-H3 chuỗi nặng, PD1-0102
SEQ ID NO: 52	HVR-L1 chuỗi nhẹ, PD1-0102
SEQ ID NO: 53	HVR-L2 chuỗi nhẹ, PD1-0102
SEQ ID NO: 54	HVR-L3 chuỗi nhẹ, PD1-0102
SEQ ID NO: 55	VH miền biến đổi chuỗi nặng, PD1-0102
SEQ ID NO: 56	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ, PD1-0102
SEQ ID NO: 57	VH miền biến đổi chuỗi nặng - biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103_01
SEQ ID NO: 58	VL miền biến đổi chuỗi nhẹ - biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103_01

- SEQ ID NO: 59 VL miền biến đổi chuỗi nhẹ - biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103_02
- SEQ ID NO: 60 VL miền biến đổi chuỗi nhẹ - biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103_03
- SEQ ID NO: 61 VL miền biến đổi chuỗi nhẹ - biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103_04
- SEQ ID NO: 62 vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa của người
- SEQ ID NO: 63 vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda của người
- SEQ ID NO: 64 vùng hằng định chuỗi nặng của người được lấy từ IgG1
- SEQ ID NO: 65 vùng hằng định chuỗi nặng của người được lấy từ IgG1 có các đột biến L234A và L235A
- SEQ ID NO: 66 vùng hằng định chuỗi nặng của người được lấy từ IgG1 có các đột biến L234A, L235A và P329G
- SEQ ID NO: 67 vùng hằng định chuỗi nặng của người được lấy từ IgG4
- SEQ ID NO: 68 trình tự PD1 của người lấy làm ví dụ (không có trình tự tín hiệu)
- SEQ ID NO: 69 miền ngoại bào (ECD) PD1 của người
- SEQ ID NO: 70 trình tự PD1 của người lấy làm ví dụ (bao gồm trình tự tín hiệu)
- SEQ ID NO: 71: HVR1 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 bao gồm PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315
- SEQ ID NO: 72: HVR2 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 bao gồm PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

- SEQ ID NO: 73: HVR3 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 bao gồm PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315
- SEQ ID NO: 74: LVR1 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 bao gồm PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315
- SEQ ID NO: 75: LVR2 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 bao gồm PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315
- SEQ ID NO: 76: LVR3 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 bao gồm PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315
- SEQ ID NO: 77: mảnh của FR-H3 chứa trình tự axit amin RDN ở các vị trí là 71, 72, 73 theo hệ thống đánh số Kabat

Các trình tự axit amin của các miền VH và VL bao gồm các HVR được đánh dấu (các HVR được thể hiện bằng các chữ cái in đậm và được gạch chân) của các kháng thể kháng PD1, bao gồm PD1-0016 (và các biến thể được biến đổi giống như của người của nó là PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315), PD1-0098, PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078 và PD1-0102 được liệt kê dưới đây:

Kháng thể kháng PD1 PD1-0103:

VH PD1-0103:

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSSYTMSWVRQTPEKRLDWVATI
SGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLEMSSLMSEDTALYYCVLLTG
RVYFALDSWGQGTSVTVSS

VL PD1-0103:

KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWYQQRPGQSPKLLIY
RSSTLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGG
 GTKLEIK

Biên thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 kháng PD1 PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315:

VH PD1-0103-0312= VH PD1-0103-0313= VH PD1-0103-0314= VH PD1-0103-0315:

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVAT
 ISGGGRDIYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTG
RVYFALDSWGQGTLVTVSS

VL PD1-0103-0312:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLI
 YRSSTLESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFG
 QGTKVEIK

VL PD1-0103-0313:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQQRPGQSPRLLI
 YRSSTLESGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQNYDVPWTFG
 QGTKVEIK

VL PD1-0103-0314:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPRLLIY
RSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGGG
 TKVEIK

VL PD1-0103-0315:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPRLLIY
RSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGGG
 TKVEIK

Kháng thể kháng PD1 PD1-0098:

VH PD1-0098:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGDKLEWLG
YITYSGFTNYPNPSLKSRISISRDTSKNQFFLQLNSVATEDTATYYCARWHGS
APWYFDYWGRGTTTLTVSS

VL PD1-0098:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPNL
LIYKVSRRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHFPLTF
GAGTKLELK

VH: 0050

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMG
YITYTGRTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAREMDY
YGSTLDYWGGGTTTLTVSS

VL: 0050

KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRASESVDRYGNSFIHWYQQKPGQPPKVLI
YRASNLESGFPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPYTFG
SGTKLEIK

VH: 0069

QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHARTLEWIG
VISTYSGDTNYNQKFKDKATMTVDKSSSTAYLELARMTSEDSAIYYCARL
GITTGFAYWGQGTLVTVSA

VL: 0069

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASSKGVSTSSYSFMHWYQQKPRQPPKLLI
KYASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCHHSREFPWTFG
GGTKLEIK

VH: 0073

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWIRQTPEKGLEWVAT
ISGGGRDTYYPDSVKGRFTISRDNVKNNLYLQMSSLRSEDATFYYCASYYY
GIDYWGQGTSVTVSS

VL: 0073

DIVMTQPHKFMSTSVGDRVRITCKASSQDVTTAVAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASTRHTGVPDRFTGSGSGTEFTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSIPWTFGGG
TKLEIK

VH: 0078

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSTWMHWVKQRPGQGLEWI
GAIDPSDSYTTYNQKFKGKATLTVDTSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRS
PFDYWGQGTTTLTVSS

VL: 0078

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASSQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYS
ASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFAISSVQAEDLAVYYCQQHYSHPFTFGSG
TKLEIK

VH: 0102

DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMG
FIHSSGDTNYNPSLKSRI SFTRDT SKNQFFLQLSSLTDEDTATYYCATYRNW
YFDVWGAGTTVTVSS

VL: 0102

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCKSSSQSLLNSGTQKNYLTWYQQKPGQPP
KLLIYWASTRESGVPNRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLSVYYCQSDYTFPL
TFGGGKLELK

Các phương án cụ thể của sáng chế được liệt kê dưới đây:

1. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này gắn kết vào chuỗi đường (lõi) tại Asn58 của PD1 đã được glycosyl hóa của người có SEQ ID NO: 70 mà được glycosyl hóa tại Asn58.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn gắn kết vào một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí 60 đến 64, 68, 78 đến 84, 126 đến 134 của PD1 của người.
3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này gắn kết bằng chuỗi nặng của nó vào chuỗi đường tại Asn58.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó kháng thể này gắn kết vào một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí 61, 62, 64, 83, 126, 128, 132, 134 của PD1 của người.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó kháng thể này gắn kết vào các axit amin ở các vị trí 61, 62, 64, 83, 126, 128, 132, 134 của PD1 của người.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó kháng thể này gắn kết vào các axit amin ở các vị trí 60, 61, 62, 63, 64, 68, 78, 82, 83, 84, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 133, 134 của PD1 của người.
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này gắn kết vào GlNAc thứ nhất và thứ hai, FUC, BMA và MAN trong chuỗi đường (lõi) tại Asn58 của PD1 đã được glycosyl hóa của người có SEQ ID NO: 70 mà được glycosyl hóa tại Asn58.
8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này thể hiện sự gắn kết vào PD1 của người có SEQ ID NO: 70 không được glycosyl hóa tại Asn58 giảm đi so với sự gắn kết vào PD1 của người được glycosyl hóa tại Asn58.
9. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa
 - (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:71; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:72; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:73; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:74; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:75; (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:76 và (g) FR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77 (của RDN) ở các vị trí là 71, 72 và 73 theo hệ thống đánh số Kabat

10. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người theo điểm 9, trong đó kháng thể này

A)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc B)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58.
- ii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59.
- iii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60.
- iv) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

Các phương án cụ thể của sáng chế được liệt kê dưới đây:

1. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa

A) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc

B) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:11; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14; hoặc

C) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:19; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (e) HVR-L2 chứa

trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22; hoặc

D) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:27; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30; hoặc

E) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:35; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38; hoặc

F) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:43; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46; hoặc

G) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:51; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

2. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa

A) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:1, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:2 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:3; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:4; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:5 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:6; hoặc

B) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:9, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:10 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:11; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:12; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:13 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:14; hoặc

C) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:17, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:18 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:19; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:20; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:21 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:22; hoặc

D) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:25, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:26 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:27; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:28; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:29 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:30; hoặc

E) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:33, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:34 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:35; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:36; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:37 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:38; hoặc

F) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:41, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:42 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:43; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:44; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:45 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:46; hoặc

G) (a) miền VH chứa (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:49, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:50 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:51; và (b) miền VL chứa (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:52; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:53 và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO:54.

3. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này

A)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc B)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58.
- ii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59.
- iii) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60.
- iv) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

hoặc C)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:15 và trình tự VL là SEQ ID NO:16;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc D)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:23 và trình tự VL là SEQ ID NO:24;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc E)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:31 và trình tự VL là SEQ ID NO:32;
- ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc F)

- i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:39 và trình tự VL là SEQ ID NO:40;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc G)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:47 và trình tự VL là SEQ ID NO:48;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i);

hoặc H)

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:55 và trình tự VL là SEQ ID NO:56;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

4. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này

i) chứa trình tự VH là SEQ ID NO:7 và trình tự VL là SEQ ID NO:8;

ii) hoặc biến thể được biến đổi giống như của người của VH và VL của kháng thể nêu trong i).

5. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:58.

6. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:59.

7. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:60.

8. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH là SEQ ID NO:57 và trình tự VL là SEQ ID NO:61.

9. Kháng thể kháng PD1 theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này được đặc trưng một cách độc lập bởi một hoặc nhiều tính chất nêu dưới đây: kháng thể kháng PD-1 này

- i) cạnh tranh với kháng thể kháng PD-1 chứa VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO:7 và VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO:8 để gắn kết vào PD-1, và/hoặc
- ii) gắn kết vào PD-1 của người và của khỉ đuôi dài; và/hoặc
- iii) làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL; và/hoặc
- iv) làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL.

10. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1, trong đó kháng thể này làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 250% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR).

11. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1, trong đó kháng thể này làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn (theo một phương án được ưu tiên, đến 90% hoặc hơn, theo một phương án được ưu tiên, đến 95% hoặc hơn) ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR).

12. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD-1 của người, trong đó kháng thể này:

- i) cạnh tranh với kháng thể kháng PD1 chứa VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO:7 và VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO:8 để gắn kết vào PD-1, và/hoặc
- ii) gắn kết vào PD-1 của người và của khỉ đuôi dài; và
- iii) làm tăng sự tiết interferon-gamma (IFN-gamma) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 85% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL; và
- iv) làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) bởi các tế bào T đã được kích thích dị sinh đến 200% hoặc hơn ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL.

13. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

14. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể của người, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể thể khảm.
15. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể gắn kết vào PD1.
16. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1 có chiều dài đầy đủ.
17. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1 có chiều dài đầy đủ có các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).
18. Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.
19. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo phương án 19.
20. Phương pháp tạo ra kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo phương án 20 sao cho kháng thể được tạo ra.
21. Phương pháp theo phương án 21, còn bao gồm bước thu hồi kháng thể từ tế bào chủ.
22. Dược phẩm chứa kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 18 và chất mang dược dụng.
23. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 18 để sử dụng làm thuốc.
24. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 18 để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư.
25. Sử dụng kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 18 trong sản xuất thuốc.
26. Sử dụng theo phương án 26, trong đó thuốc được dùng để điều trị bệnh ung thư.

27. Phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh ung thư, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng có tác dụng của kháng thể theo phương án 1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần phải hiểu rằng nhiều phương án khác nhau khác cũng có thể được thực hiện dựa vào phần mô tả chung nêu trên.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết phần nào bằng cách minh họa và bằng các ví dụ nhằm mục đích giúp hiểu rõ sáng chế, nhưng phần mô tả và các ví dụ này không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Nội dung bộc lộ của tất cả các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa toàn bộ vào bản mô tả này một cách rõ ràng bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 1:

Tạo kháng thể kháng PD-1

Gây miễn dịch ở chuột nhắt

Các con chuột nhắt NMRI được gây miễn dịch về mặt di truyền, bằng cách sử dụng vector biểu hiện plasmid mã hóa PD-1 có chiều dài đầy đủ của người, bằng cách sử dụng dưới da 100 ug vector ADN (plasmid15300_hPD1-fl), sau đó xung điện (2 xung vuông 1000 V/cm, thời gian 0,1 mili giây, khoảng cách 0,125 giây; sau đó đến 4 xung vuông 287,5 V/cm, thời gian 10 mili giây, khoảng cách 0,125 giây). Các con chuột nhắt này nhận 6 lần gây miễn dịch liên tiếp vào các ngày 0, 14, 28, 42, 56, 70 và 84. Máu được lấy vào các ngày 36, 78 và 92 và huyết thanh được chuẩn bị, huyết thanh này được sử dụng để xác định độ chuẩn bằng ELISA (xem dưới đây). Các con chuột nhắt có độ chuẩn cao nhất được chọn để tiêm nhắc lại vào ngày 96, bằng cách tiêm trong tĩnh mạch 50 ug thể khảm tái tổ hợp Fc của người PD1 của người, và các kháng thể đơn dòng được phân lập bằng công nghệ tế bào lai, bằng cách dung hợp các tế bào lách vào dòng tế bào u tủy 3 ngày sau khi tiêm nhắc lại. Xác định độ chuẩn huyết thanh (ELISA).

Thể khảm tái tổ hợp Fc của người PD1 của người được giữ cố định trên đĩa NUNC Maxisorp loại 96 lỗ ở nồng độ là 0,3 ug/mL, 100 uL/lỗ, trong PBS, sau đó:

phong bề đĩa đó bằng Crotein C 2% trong PBS, 200 $\mu\text{L/lỗ}$; cấp các dịch pha loãng theo dãy của kháng huyết thanh, lặp lại hai lần, trong Crotein C 0,5% trong PBS, 100 $\mu\text{L/lỗ}$; phát hiện bằng kháng thể dê kháng chuột nhất được liên hợp với HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000). Đối với tất cả các bước, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C . Giữa tất cả các bước, các đĩa được rửa 3 lần bằng Tween 20 0,05% trong PBS. Tín hiệu được làm hiện bằng cách thêm cơ chất BM Blue POD tan được (Roche), 100 $\mu\text{L/lỗ}$; và dừng bằng cách thêm HCl 1 M, 100 $\mu\text{L/lỗ}$. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 450 nm, dựa vào tham chiếu là bước sóng 690 nm. Độ chuẩn được định nghĩa là độ pha loãng của kháng huyết thanh tạo ra tín hiệu nửa tối đa.

Ví dụ 2:

Xác định đặc điểm của kháng thể kháng PD1

Sự gắn kết của kháng thể kháng PD1 vào PD1 của người

ELISA đối với huPD1 (PD1 của người)

Các đĩa Nunc Maxisorp đã được phủ streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ PD1-ECD-AviHis đã được biotinyl hóa với thể tích là 25 $\mu\text{L/lỗ}$ và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3×90 $\mu\text{L/lỗ}$ bằng dung dịch đệm PBST), 25 μL mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể tham chiếu (kháng thể kháng PD1 của người; Roche/kháng thể kháng PD1 ở chuột nhất; Biolegend; cat.:329912) được thêm vào và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3×90 $\mu\text{L/lỗ}$ bằng dung dịch đệm PBST), kháng thể dê kháng H+L-POD của người (JIR, JIR109-036-088)/kháng thể cừu kháng POD của chuột nhất (GE Healthcare; NA9310) với thể tích là 25 $\mu\text{L/lỗ}$ được thêm ở tỷ lệ pha loãng 1:2000/1:1000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3×90 $\mu\text{L/lỗ}$ bằng dung dịch đệm PBST), cơ chất TMB (Roche Catalô số 11835033001) với thể tích là 25 $\mu\text{L/lỗ}$ được thêm vào và được ủ cho đến khi OD = 2 – 3. Phép đo diễn ra ở bước sóng 370/492 nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị EC50 [ng/mL] trong bảng 2 và bảng 3 tóm tắt dưới đây.

ELISA tế bào đối với PD1

Dòng tế bào CHO-K1 bám dính được chuyển nhiễm ổn định với plasmid 15311_hPD1-fl_pUC_Neo mã hóa PD1 có chiều dài đầy đủ của người và chọn lọc bằng G418 (chỉ thị kháng neomycin trên plasmid) được gieo với nồng độ là $0,01 \times 10^6$ tế bào/lỗ trong các đĩa đáy phẳng loại 384 lỗ và được cho sinh trưởng qua đêm.

Ngày tiếp theo, mẫu PD1 hoặc kháng thể tham chiếu là kháng thể kháng PD1 của người (Roche)/kháng thể kháng PD1 ở chuột nhắt (Biolegend; cat.:329912) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C (để tránh nội hóa). Sau khi rửa cẩn thận (1×90 μL /lỗ bằng PBST), các tế bào được cố định bằng cách thêm 30 μL glutaraldehyt 0,05% (Sigma, Cat.No: G5882, 25%) loãng trong 1x dung dịch đệm PBS vào mỗi lỗ và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3×90 μL /lỗ bằng PBST), kháng thể thứ cấp với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào để phát hiện: kháng thể dê kháng H+L-POD của người (JIR, JIR109-036-088)/kháng thể cừu kháng POD của chuột nhắt (GE NA9310), sau đó ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3×90 μL /lỗ bằng PBST), dung dịch cơ chất TMB (Roche 11835033001) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào và được ủ cho đến khi OD = 1,0 – 2,0. Các đĩa được đo ở bước sóng 370/492 nm.

Các kết quả ELISA tế bào được liệt kê dưới dạng giá trị “EC50 CHO-PD1” [ng/mL] trong bảng 3 tóm tắt dưới đây.

ELISA đối với cynoPD1 (PD1 của khỉ đuôi dài)

Các đĩa Nunc Maxisorp đã được phủ streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ cynoPD1-ECD-Biotin đã được biotinyl hóa với thể tích là 25 μL /lỗ và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3×90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), 25 μL mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể tham chiếu (kháng thể kháng PD1 của người; Roche) được thêm vào và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3×90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), kháng thể dê kháng H+L-POD của người (JIR, JIR109-036-088) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào ở tỷ lệ pha loãng 1:1000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3×90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), cơ chất TMB (Roche, 11835033001) với

thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào và được ủ cho đến khi OD = 2 – 3. Phép đo diễn ra ở bước sóng 370/492 nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị EC50 [ng/mL] trong bảng 2 và bảng 3 tóm tắt dưới đây.

Thử nghiệm thay thế phối tử PD-L1

Các đĩa Nunc Maxisorp đã được phủ streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ bằng PD1-ECD-AviHis đã được biotinyl hóa với thể tích là 25 μL /lỗ và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), 25 μL mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể tham chiếu (kháng thể kháng PD1 ở chuột nhắt; Biolegend; cat.:329912) được thêm vào và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), PD-L1 (thể khản tái tổ hợp Fc B7-H1/PD-L1 của người; 156-B7, R&D) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), kháng thể đê kháng H+L-POD của người (JIR, 109-036-088) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào ở tỷ lệ pha loãng 1:1000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), cơ chất TMB (Roche, 11835033001) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào và được ủ cho đến khi OD = 2 – 3. Phép đo diễn ra ở bước sóng 370/492 nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị IC50 [ng/mL] trong bảng 2 tóm tắt dưới đây.

Thử nghiệm thay thế phối tử PD-L2

Các đĩa Nunc Maxisorp đã được phủ streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ PD1-ECD-AviHis đã được biotinyl hóa với thể tích là 25 μL /lỗ và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), 25 μL mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể tham chiếu (kháng thể kháng huPD1 ở chuột nhắt; Roche) được thêm vào và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μL /lỗ bằng dung dịch đệm PBST), PD-L2 (thể khản tái tổ hợp Fc B7-DC/PD-L2 của người; 1224-PL-100, R&D) với thể tích là 25 μL /lỗ được thêm vào

và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), kháng thể dê kháng H+L-POD của người (JIR, 109-036-088) với thể tích là 25 μ L/lỗ được thêm vào ở tỷ lệ pha loãng 1:2000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), cơ chất TMB (Roche, 11835033001) với thể tích là 25 μ L/lỗ được thêm vào và được ủ cho đến khi OD = 2 – 3. Phép đo diễn ra ở bước sóng 370/492 nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị IC₅₀ [ng/mL] trong bảng 2 tóm tắt dưới đây.

ELISA lập bản đồ epitop/thử nghiệm cạnh tranh gắn kết

Các đĩa Nunc Maxisorp (Nunc #464718) được phủ kháng thể bắt giữ (kháng thể dê kháng IgG của chuột nhắt; JIR; 115-006-071) với thể tích là 25 μ L/lỗ và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), các đĩa được phong bế trong 1 giờ bằng BSA 2% chứa dung dịch đệm PBS ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), 25 μ L mẫu kháng PD1 ở chuột nhắt được thêm vào và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), kháng thể bắt giữ được phong bế bằng IgG của chuột nhắt (JIR; 015-000-003) với thể tích là 30 μ L/lỗ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Cùng lúc đó, PD1-ECD-AviHis đã được biotinyl hóa được ủ trước với mẫu kháng thể thứ hai trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa đĩa thử nghiệm (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), hỗn hợp kháng thể PD1 được chuyển sang đĩa thử nghiệm và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), streptavidin POD (Roche, #11089153001) với thể tích là 25 μ L/lỗ được thêm vào ở tỷ lệ pha loãng 1:4000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90 μ L/lỗ bằng dung dịch đệm PBST), cơ chất TMB (Roche, #11089153001) với thể tích là 25 μ L/lỗ được thêm vào và được ủ cho đến khi OD = 1,5 – 2,5. Phép đo diễn ra ở bước sóng 370/492 nm. Các nhóm epitop được xác định bằng cách phân nhóm theo thứ bậc dựa vào kháng thể tham chiếu.

Bảng 2: Sự gắn kết, ức chế PD-L1 và các nhóm vùng epitop của các kháng thể lấy làm ví dụ (ELISA)

Kháng thể	EC50 huPD1 theo ELISA [ng/mL]	EC50 cyPD1 theo ELISA [ng/mL]	IC50 ức chế PD-L1 theo ELISA [ng/mL]	IC50 ức chế PD-L2 theo ELISA [ng/mL]	Nhóm vùng epitop (theo thử nghiệm cạnh tranh)
PD1- 0050	17,9	9,8	128	34	1
PD1- 0069	45,7	22,7	225	89	6
PD1- 0073	15,1	8,3	124	65	5
PD1- 0078	26,3	22,4	x	86	2
PD1- 0098	50,8	54,6	174	45	5
PD1- 0102	34,2	52,7	>35,5 µg/mL	140	4
PD1-0103	33,7	36,9	182	51	5

Bảng 3: Sự gắn kết sinh hóa và sự gắn kết tế bào của các kháng thể PD1 được biến đổi giống như của người thu được từ kháng thể chuột nhất bố mẹ PD1-0103 (ELISA).

Kháng thể được biến đổi giống như của người	EC50 huPD1 theo ELISA [ng/mL]	EC50 cyPD1 theo ELISA [ng/mL]	EC50 CHO-PD1 theo ELISA [ng/mL]
PD1-0103-0312	11	8,3	10,1
PD1-0103-0313	15	11	10,8
PD1-0103-0314	11	8,3	7,7
PD1-0103-0315	10	7,9	7,3

Xác định đặc điểm của các kháng thể kháng PD-1 được biến đổi giống như của người bằng Biacore

Thử nghiệm dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để xác định các thông số động học của sự gắn kết giữa một số yếu tố gắn kết PD1 của chuột cũng như các tham chiếu gắn kết PD1 của người có bán trên thị trường. Theo đó,

kháng thể kháng IgG của người được giữ cố định bằng cách ghép cặp amin vào bề mặt của chip cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó, các mẫu được bắt giữ và huPD1-ECD được gắn kết vào chúng. Bề mặt chip cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Cuối cùng hằng số cân bằng và các hằng số tốc độ động học thu được bằng cách khớp dữ liệu vào mô hình tương tác Langmuir 1:1.

Khoảng 2000 đơn vị đáp ứng (RU) của 20 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể kháng IgG của người (GE Healthcare #BR-1008-39) được ghép cặp lên các tế bào dòng chảy 1 và 2 (theo cách khác: 3 và 4) của chip cảm biến CM5 trong Biacore T200 ở độ pH=5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare.

Mẫu và dung dịch đệm chạy là HBS-EP+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH=7,4). Nhiệt độ tế bào dòng chảy được thiết lập đến 25°C và nhiệt độ buồng mẫu được thiết lập đến 12°C. Hệ thống này được môi bằng dung dịch đệm chạy.

Các mẫu được tiêm trong 20 giây với nồng độ là 10 nM và được gắn kết vào tế bào dòng chảy thứ hai. Sau đó, tập hợp đầy đủ các nồng độ PD1-ECD của người (144 nM, 48 nM, 16 nM, 5,33 nM, 1,78 nM, 0,59 nM, 0,20 nM và 0 nM) được tiêm vào mỗi mẫu trong 120 giây, sau đó đến thời gian phân ly là 30/300 giây và hai bước tái tạo trong 20 giây bằng MgCl_2 3 M, trong đó bước cuối bao gồm “bước rửa bổ sung sau khi tiêm” bằng dung dịch đệm chạy.

Cuối cùng, dữ liệu tham chiếu kép được khớp vào mô hình tương tác Langmuir 1:1 bằng phần mềm đánh giá Biacore T200. Các giá trị K_D , k_a và k_d thu được được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: Các hằng số tốc độ động học và hằng số cân bằng đối với PD1-0103 thể khảm và các PD1-Ab được biến đổi giống như của người được xác định bằng Biacore

Phối tử	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [nM]
PD1-0103 thể khảm	3,86E+05	3,07E-04	0,8
PD1-0103-0312	1,95E+05	3,45E-04	1,8
PD1-0103-0313	1,60E+05	3,67E-04	2,3
PD1-0103-0314	1,87E+05	2,79E-04	1,5
PD1-0103-0315	1,89E+05	2,91E-04	1,5

Như được thể hiện trong bảng 4, tất cả các biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 thể khảm (xem ví dụ 6 về việc tạo ra chúng) đều thể hiện các tính chất động học tương tự với kháng thể bố mẹ (PD1-0103 thể khảm).

Các tính chất động học

Cảm biến CM5 sê-ri S được gắn vào hệ thống Biacore 4000 và các điểm phát hiện được chỉ định bằng phương pháp thủy động theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kháng thể đa dòng kháng IgG của thỏ <IgGFC γ M>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) được giữ cố định ở mức 10000 Ru trên các điểm phát hiện 1 và 5 trong các tế bào dòng chảy 1, 2, 3 và 4. Quá trình ghép cặp được thực hiện thông qua hóa học EDC/NHS theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các điểm còn lại trong các tế bào dòng chảy đóng vai trò làm điểm tham chiếu. Dung dịch đệm chạy mẫu là dung dịch đệm hệ thống được bổ sung carboxymetyldextran 1 mg/mL.

Theo một phương án, thử nghiệm này được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Theo một phương án khác, thử nghiệm này được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. 50 nM của mỗi kháng thể đơn dòng chuột được bắt giữ trên bề mặt cảm biến bằng việc tiêm trong 1 phút với tốc độ là 10 μ L/phút. Sau đó, các kháng nguyên tương ứng được tiêm với dãy nồng độ là 100 nM, 2x 33 nM, 11 nM, 4 nM, 1 nM và dung dịch đệm hệ thống 0 nM với tốc độ là 30 μ L/phút trong khoảng thời gian pha kết hợp dài 4 phút. Sự phân ly được theo dõi trong 4 phút nữa. Hệ bắt giữ được tái tạo bằng cách tiêm glyxin 10 mM, độ pH=1,5 trong 3 phút với tốc độ là 30 μ L/phút. Dữ liệu động

học liên quan được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Lập bản đồ epitop

Thiết bị Biacore 4000 được gắn cảm biến Biacore CAP và được chuẩn bị như theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Dung dịch đệm chạy thiết bị là HBS-ET (HEPES 10 mM, độ pH=7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0,005% trọng lượng/thể tích). Thiết bị được chạy ở nhiệt độ 25°C.

Tất cả các mẫu đều được pha loãng trong dung dịch đệm hệ thống. Kháng nguyên PD1-ECD-AviHis 35 kDa đã được biotinyl hóa được bắt giữ ở mức 200 RU trên bề mặt cảm biến CAP bằng việc tiêm trong 1 phút với tốc độ là 30 μ L/phút trong các tế bào dòng chảy 1, 2, 3 và 4 ở các điểm 1 và 5. Các điểm 2, 3 và 4 đóng vai trò làm điểm tham chiếu. Theo một phương án khác, kháng nguyên PD1-ECD-AviHis 35 kDa đã được biotinyl hóa được bắt giữ ở mức 200 RU trên cảm biến CAP theo cách giống như vậy.

Sau đó, kháng thể sơ cấp được tiêm ở nồng độ 100 nM trong 3 phút với tốc độ là 30 μ L/phút, sau đó tiêm kháng thể thứ cấp ở nồng độ 100 nM trong 3 phút với tốc độ là 30 μ L/phút. Kháng thể sơ cấp được tiêm cho đến khi bão hòa hoàn toàn kháng nguyên đã được trình diện bề mặt. Tại thời điểm kết thúc của các pha tiêm kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp, các điểm báo cáo “gắn kết muộn” (BL: Binding Late) được thiết lập để theo dõi đáp ứng gắn kết của các kháng thể tương ứng. Tỷ số mol, là thương số giữa đáp ứng gắn kết của kháng thể thứ cấp “BL2” và đáp ứng của kháng thể sơ cấp “BL1” được tính toán. Tỷ số mol này được sử dụng làm chỉ số cho khả năng tiếp cận kháng nguyên của kháng thể thứ cấp, khi kháng nguyên này đã tạo phức với kháng thể sơ cấp.

Các phức hợp này được loại bỏ hoàn toàn ra khỏi bề mặt cảm biến bằng cách tiêm dung dịch đệm tái tạo chứa guanidin-HCL 2M và NaOH 250 mM trong 2 phút với tốc độ là 30 μ L/phút theo khuyến nghị của nhà sản xuất, sau đó tiêm dung dịch đệm hệ thống trong 1 phút với tốc độ là 30 μ L/phút.

Ví dụ 3:

Tác dụng của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau đối với sự sản xuất xytokin trong phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR)

3A) Phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) là thử nghiệm tế bào miễn dịch đo sự hoạt hóa các lympho bào từ một cá thể (cá thể cho X) đến các lympho bào từ một cá thể khác (cá thể cho Y). Phản ứng lympho bào hỗn hợp được sử dụng để chứng minh tác dụng của việc phong bế con đường PD1 đối với các lympho bào tác động. Các tế bào T trong thử nghiệm này được thử nghiệm về sự hoạt hóa và sự tiết IFN-gamma của chúng khi có mặt hoặc không có mặt các mAb kháng PD1.

Để thực hiện MLR dị sinh, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ ít nhất bốn cá thể cho khỏe mạnh thuộc typ HLA chưa biết được phân lập bằng cách ly tâm dựa vào gradien tỷ trọng sử dụng Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). Một cách ngắn gọn, các mẫu máu đã được bổ sung heparin được pha loãng bằng ba lần thể tích PBS và các lượng nhỏ 25 mL của máu đã được pha loãng được phân lớp trong các ống Leukosep dung tích 50 mL. Sau khi ly tâm tại tốc độ 800 x g trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (không phá vỡ), các phân đoạn chứa lympho bào được thu lại, rửa trong PBS và sử dụng trực tiếp trong thử nghiệm chức năng hoặc được tái tạo huyền phù trong môi trường cấp đông (DMSO 10%, FCS 90%) ở mật độ là $1,0E+07$ tế bào/mL và được lưu trữ trong nitơ lỏng. Các phản ứng MLR hai chiều riêng lẻ được thiết lập bằng cách trộn các PBMC từ hai cá thể cho khác nhau với tỷ lệ tế bào kích thích/đáp ứng là 1:1 và các công đoạn cấy đồng thời được thực hiện ít nhất hai lần lặp lại trong các đĩa đáy phẳng loại 96 lỗ trong 6 ngày ở nhiệt độ 37°C, CO2 5%, với sự có mặt hoặc không có mặt của khoảng giá trị nồng độ khác nhau của các kháng thể đơn dòng kháng PD1 đã được tinh chế: PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103. Để dùng làm kháng thể kháng PD1 tham chiếu, kháng thể chứa các miền VH và VL của nivolumab (còn được gọi là MDX-5C4 hoặc MDX-1106) hoặc pembrolizumab (còn được gọi là MK-3475 hoặc Org 1.09A) được tổng hợp và tách dòng với khung chính IgG1 của người (có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)). Không có kháng thể nào hoặc kháng thể đối chứng isotyp nào được sử dụng làm đối chứng âm và rec hu

IL-2 (20 EU/mL) được sử dụng làm đối chứng dương. Sau ngày 6, 100 µL môi trường được lấy ra từ mỗi giống cây để đo xytokin. Mức IFN-gamma được đo bằng cách sử dụng bộ kit OptEIA ELISA (BD Biosciences).

Các kết quả được thể hiện trong bảng 5 (giải phóng/tiết IFN-g). Các kháng thể đơn dòng kháng PD1 thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết IFN-gamma theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Giá trị % tăng tiết IFNg được tính toán đối với sự sản xuất IFN-g của MLR trong điều kiện không bổ sung bất kỳ mAb phong bế nào (sự kích thích dị sinh cơ sở tạo ra giá trị IFNg dưới dạng E-c) và MLR trong điều kiện có bổ sung 20 EU/mL rec hu IL-2 (đối chứng dương = giá trị IFNg 100% dưới dạng E+c) và được tính toán theo công thức: Sự kích thích tương đối [%] = $((E_{\text{sample}} - E_{\text{c}}) / (E_{\text{+c}} - E_{\text{c}})) \times 100$

Bảng 5: Tỷ lệ phần trăm tiết IFN gamma sau khi kích thích dị sinh và điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 so với tác dụng của việc điều trị bằng IL-2 tái tổ hợp của người (20 EU/mL) (= tăng 100%) với vai trò làm đối chứng dương

	Nồng độ (µg/mL)	1:12	1:120	1:1200	Tác dụng trong MLR
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

Một số kháng thể phong bế PD1 là PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103 thể hiện hoạt tính điều biến miễn dịch mạnh thông qua việc làm tăng sự tiết interferon gamma (IFN-g) (dữ liệu không được thể hiện đối với tất cả các kháng thể).

3B) Trong thử nghiệm khác, PD1-0103 thể khảm (isotyp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) được đánh giá. Sự phong bế PD1 bằng PD1-0103 thể khảm làm tăng mạnh sự tiết IFN-gamma bởi các tế bào T sơ cấp của người đã được kích thích dị sinh. PD1-0103 thể khảm có hoạt lực hơn so với các kháng thể kháng PD1 tham chiếu (xem Fig.1).

Để so sánh, các kháng thể kháng PD1 tham chiếu chứa các miền VH và VL của nivolumab (còn được gọi là MDX5C4 hoặc MDX-1106) và pembrolizumab (còn

được gọi là MK-3475 hoặc Org 1.09A) được tổng hợp và được tách dòng với khung chính IgG1 của người (có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) được sử dụng.

3C) Trong các thử nghiệm bổ sung, hoạt tính điều biến miễn dịch của các biến thể được biến đổi giống như của người của kháng thể kháng PD-1 PD1-0103 (các kháng thể được biến đổi giống như của người PD1-0103-0312, PD1-0103-0314 trên Fig.2 và Fig.3, xem thêm ví dụ 6 dưới đây) a) sự giải phóng (tiết) IFN; b) sự giải phóng (tiết) TNF-alpha được đánh giá trong MLR như nêu ở trên. Tác dụng của kháng thể PD1-0103 thể khảm và các biến thể được biến đổi giống như của người của nó được so sánh với các kháng thể kháng PD1 tham chiếu chứa các miền VH và VL của nivolumab (còn được gọi là MDX5C4 hoặc MDX-1106) và pembrolizumab (còn được gọi là MK-3475 hoặc Org 1.09A) với khung chính IgG1 của người (có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)). Sau 6 ngày nuôi cấy MLR, 50 μ L dịch nổi bề mặt được lấy ra và các xytokin được đo trong giống cấy đơn lẻ bằng cách sử dụng thử nghiệm xytokin Th1/Th2 của người Bio-Plex Pro™ (Bio-Rad Laboratories Inc.). (dữ liệu không được thể hiện đối với tất cả các xytokin).

Kháng thể PD1-0103 thể khảm và các biến thể được biến đổi giống như của người của nó (PD1-0103_0312 và PD1-0103_0314) có hoạt lực hơn so với các kháng thể kháng PD1 tham chiếu trong việc làm tăng sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết IFN-gamma (xem Fig.2).

Ngoài ra, kháng thể PD1-0103 thể khảm và các biến thể được biến đổi giống như của người của nó làm tăng sự tiết yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) (xem Fig.3) và IL-12 (dữ liệu không được thể hiện) bởi các tế bào trình diện kháng nguyên và làm tăng khả năng kích thích tế bào T của các bạch cầu đơn nhân to/đại thực bào hoặc các tế bào trình diện kháng nguyên.

Ví dụ 4:

Tác dụng của việc phong bế kháng thể kháng PD-1 đối với sự tiết IFN- γ và sự giải phóng granzym B gây độc tế bào bởi các tế bào CD4 T của người được nuôi cấy đồng thời với các tế bào đuôi gai thuần thực dị sinh

Để nghiên cứu thêm tác dụng của việc điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 trong môi trường dị sinh, các tác giả sáng chế đã phát triển thử nghiệm trong đó các tế bào CD4 T mới được tinh chế được nuôi cấy đồng thời trong 5 ngày với sự có mặt của tế bào đuôi gai thuần thực dị sinh (mDC) có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân to. Các bạch cầu đơn nhân to được phân lập từ các PBMC mới một tuần trước đó thông qua sự bám dính vào chất dẻo, sau đó loại bỏ các tế bào không bám dính. Sau đó, các tác giả sáng chế tạo ra các DC chưa thuần thực từ các bạch cầu đơn nhân to bằng cách nuôi cấy chúng trong 5 ngày trong môi trường chứa GM-CSF (50 ng/mL) và IL-4 (100 ng/mL). Để cảm ứng sự thuần thực các iDC, các tác giả sáng chế bổ sung TNF- α , IL-1 β và IL-6 (mỗi loại 50 ng/mL) vào môi trường nuôi cấy trong 2 ngày nữa. Sau đó, các tác giả sáng chế đánh giá sự thuần thực của các DC bằng cách đo mức biểu hiện bề mặt của chúng của phức hợp tương thích mô chính lớp II (MHCII), CD80, CD83 và CD86 bằng kỹ thuật phân tích tế bào theo dòng chảy (LSRFortessa, BD Biosciences).

Vào ngày phản ứng lympho bào hỗn hợp tối thiểu (mMLR), các tế bào CD4 T được làm giàu bằng bộ kit MicroBead (Miltenyi Biotec) từ 108 PBMC thu được từ cá thể cho không liên quan. Trước khi nuôi cấy, các tế bào CD4 T được đánh dấu bằng carboxy-florescein-suxinimidyl este (CFSE) 5 μ M. Sau đó, 105 tế bào CD4 T được đặt vào đĩa loại 96 lỗ cùng với các allo-DC thuần thực (5:1) với sự có mặt hoặc không có mặt của kháng thể phong bế kháng PD1 (PD1-0103, PD1-0103 thể khảm, hoặc các kháng thể được biến đổi giống như của người PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, được viết tắt là 0312, 0313, 0314, 0315 trên Fig.4A và Fig.4 B), ở nồng độ là 10 μ g/mL nếu không được chỉ khác đi trên các hình vẽ.

Năm ngày sau đó, các tác giả sáng chế thu dịch nổi bề mặt của giống cấy tế bào, được sử dụng sau đó để đo lượng IFN-gamma bằng ELISA (R&D Systems), và

để yên các tế bào ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ nữa với sự có mặt của Golgi Plug (Brefeldin A) và Golgi Stop (Monensin). Sau đó, các tế bào này được rửa, được nhuộm trên bề mặt bằng kháng thể kháng CD4 của người và thuốc nhuộm có thể cố định được Live/Dead Aqua (Invitrogen) trước khi được giữ cố định/thẩm thấu bằng dung dịch đệm Fix/Perm (BD Bioscience). Các tác giả sáng chế thực hiện bước nhuộm nội bào đối với granzym B (BD Bioscience), IFN-gamma và IL-2 (cả hai đều từ eBioscience). Các kết quả được thể hiện trên Fig.4A và Fig.4B.

Các tác giả sáng chế cũng thử nghiệm các nồng độ khác nhau của các biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103 (các kháng thể được biến đổi giống như của người PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, được viết tắt là 0312, 0313, 0314, 0315 trên các hình vẽ, xem thêm ví dụ 6 dưới đây) và phát hiện thấy là chúng tốt ngang nhau trong việc làm tăng granzym B và interferon gamma. DP47 là IgG không gắn kết của người có đột biến LALA trong phần Fc để tránh bị nhận diện bởi FcγR và được sử dụng làm đối chứng âm.

Ví dụ 5:

Các dẫn xuất kháng thể thể khảm

Các kháng thể PD1 thể khảm được tạo ra bằng cách khuếch đại các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể của chuột nhắt kháng PD1 là PD1-0098, PD1-0103 bằng PCR và tách dòng chúng vào trong các vector biểu hiện chuỗi nặng dưới dạng các protein dung hợp với khung chính IgG1 của người/CH1-vùng bản lề-CH2-CH3 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) (leuxin 234 thành alanin, leuxin 235 thành alanin, prolin 329 thành glyxin) phá hủy các chức năng tác động và vào trong các vector biểu hiện chuỗi nhẹ dưới dạng các protein dung hợp với C-kappa của người. Sau đó, các plasmit LC và HC được chuyển nhiễm đồng thời vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ các dịch nổi bề mặt bằng các phương pháp tinh chế kháng thể tiêu chuẩn. Các kháng thể PD1 thể khảm được đặt tên lại là PD1-0098 thể khảm (chỉ PD1-0098) và PD1-0103 thể khảm (chỉ PD1-0103). Để so sánh, các kháng thể kháng PD1 tham chiếu chứa các miền VH và VL của nivolumab (còn được gọi là MDX-5C4 hoặc MDX-1106) và pembrolizumab (còn được gọi là MK-3475 hoặc Org 1.09A) được tổng hợp và tách

dòng với khung chính IgG1 của người (có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) được sử dụng.

Ví dụ 6:

Tạo, biểu hiện và tinh chế các biến thể được biến đổi giống như của người của kháng thể kháng PD1 PD-0103 (huMab PD-0103) và xác định đặc điểm

Biến đổi các miền VH và VL của kháng thể kháng PD1 của chuột 0103 trở thành giống như của người

Các biến thể kháng thể kháng PD1 được biến đổi giống như của người được tạo ra trên cơ sở trình tự axit amin của các miền VH và VL của chuột của kháng thể kháng PD1 của chuột 0103 (SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8).

Biến thể VH được biến đổi giống như của người là dựa trên dòng mầm của người IMGT_hVH_3_23 ở dạng tổ hợp với dòng mầm yếu tố J của người IGHJ5-01 có một vài đột biến. (tạo ra SEQ ID NO: 57).

Các biến thể được biến đổi giống như của người của VL là dựa trên các dòng mầm của người IMGT_hVK_4_1, IMGT_hVK_2_30, IMGT_hVK_3_11 và IMGT_hVK_1_39 ở dạng tổ hợp với dòng mầm yếu tố J của người IGKJ1-01. Các đột biến khác nhau tạo ra các biến thể được biến đổi giống như của người có SEQ ID NO: 58 đến SEQ ID NO: 61.

Các trình tự axit amin được biến đổi giống như của người đối với các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của PD1-0103 được dịch mã ngược thành ADN và cADN thu được được tổng hợp (GenArt) và sau đó được tách dòng vào trong các vector biểu hiện chuỗi nặng dưới dạng các protein dung hợp với khung chính IgG1 của người/CH1-vùng bản lề-CH2-CH3 của người có các đột biến LALA và PG (leuxin 234 thành Alanin, leuxin 235 thành Alanin, prolin 329 thành glyxin) phá hủy các chức năng tác động hoặc vào trong các vector biểu hiện chuỗi nhẹ dưới dạng các protein dung hợp với C-kappa của người. Sau đó, các plasmit LC và HC được chuyển nhiễm đồng thời vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ các dịch nổi bề mặt bằng các phương pháp tinh chế kháng thể tiêu chuẩn. Các kháng thể PD1 được biến đổi giống như của người thu được được đặt tên như sau:

Bảng 6: Các trình tự VH và VL của các kháng thể biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103

Kháng thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103	Biến thể được biến đổi giống như của người của VH/SEQ ID NO:	Biến thể được biến đổi giống như của người của VL/SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58
PD1-0103-0313	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 59
PD1-0103-0314	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 60
PD1-0103-0315	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 61

Bảng 7: Các trình tự HVR của các kháng thể biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103

Kháng thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103	HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 của biến thể được biến đổi giống như của người/SEQ ID NO:	HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 của biến thể được biến đổi giống như của người/SEQ ID NO:
PD-0103-0312	Các SEQ ID NO: 1, 2 và 3	Các SEQ ID NO: 4, 5 và 6
PD-0103-0313	Các SEQ ID NO: 1, 2 và 3	Các SEQ ID NO: 4, 5 và 6
PD-0103-0314	Các SEQ ID NO: 1, 2 và 3	Các SEQ ID NO: 4, 5 và 6
PD-0103-0315	Các SEQ ID NO: 1, 2 và 3	Các SEQ ID NO: 4, 5 và 6

Các biến thể kháng thể PD1-0103 được biến đổi giống như của người và PD1-0103 thể khảm bố mẹ được xác định đặc điểm như được mô tả dưới đây. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8: Tóm tắt các kết quả đối với các biến thể kháng thể PD1-0103 được biến đổi giống như của người và PD1-0103 thể khảm bố mẹ

Thử nghiệm	PD1-0103 thể khảm	PD-0103- 0312	PD-0103- 0313	PD-0103- 0314	PD-0103- 0315
Ái lực K_D 37°C [nM] *)	2,0/0,8	1,5/1,8	1,9/2,3	1,6/1,5	1,7/1,5
ELISA EC50 [nM]	0,2	0,1	0,07	0,07	0,06
CHO-PD1 EC50	+	+	+	+	+
IC50 PD-L1, 2 [nM]	1,35	tbd	tbd	tbd	tbd
Thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp	+++	+++	+++	++++	++
Khả năng phản ứng chéo với khi đuôi dài (EC50 [nm])	+	0,08	0,06	0,05	0,04

Ví dụ 7:

Hoạt lực trung hòa của các kháng thể PD-1

Để thử nghiệm hiệu lực trung hòa của các kháng thể PD-1 được sản xuất nội bộ trong việc bắt chước sự phục hồi đáp ứng của tế bào T bị ức chế *in vitro*, thử nghiệm chỉ thị PD1/PD-L1 có bán trên thị trường (Promega) được sử dụng. Hệ này bao gồm các tế bào PD1+ NFAT Jurkat và tế bào đối PD-L1+ CHO mà cũng tạo ra tín hiệu hoạt hóa. Về nguyên lý, hệ chỉ thị này được dựa trên ba bước: (1) hoạt hóa NFAT được điều tiết bởi TCR, (2) ức chế tín hiệu NFAT sau khi hoạt hóa bởi trực PD-1/PD-L1 và (3) thu hồi tín hiệu NFAT bằng các kháng thể phong bế PD-1.

Nguyên liệu và phương pháp

- Môi trường PD-L1: PAN Biotech (#P04-03609); FBS (10%) và L-Gln (4 mM)
- Môi trường thử nghiệm: RPMI 1640 (#31870; Invitrogen), HEPES 25 mM, L-Gln 2 mM, FBS (2%)

- Các tế bào được sử dụng trong thử nghiệm này (cả hai loại tế bào đều được mua từ Promega):

Tế bào PD-L1+ CHO (số mẻ #139147): $2-3 \times 10^4$ tế bào/96 lỗ

Tế bào PD-1+ NFAT Jurkat (số mẻ #133024): $3,5 \times 10^4$ tế bào/lỗ

Vào ngày 1, các tế bào PD-L1+ được rã đông, được gieo với nồng độ tế bào đã định trong môi trường nêu trên và được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%. Vào ngày tiếp theo, môi trường được lấy ra và các tế bào PD-L1+ được ủ với các kháng thể đã được chuẩn bị với các nồng độ đã định (trong môi trường thử nghiệm). Cùng lúc đó, các tế bào PD-1+ NFAT Jurkat được rã đông và số lượng tế bào nêu trên được chuyển vào và được nuôi cấy đồng thời với các tế bào PD-L1+. Sau khi ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%, cơ chất Bio-Glo được làm ấm đến nhiệt độ phòng (1-2 giờ trước khi bổ sung). Đã nuôi cấy tế bào được lấy ra khỏi thiết bị ủ và được điều chỉnh đến nhiệt độ phòng (10 phút) trước khi bổ sung $80 \mu\text{L}$ dung dịch Bio-Glo vào mỗi lỗ, được ủ trong 5-10 phút trước khi đo độ phát quang bằng thiết bị đọc Tecan Infinite theo khuyến nghị sử dụng bộ kit của nhà sản xuất. Các kết quả có thể được thấy trên Fig.5A và Fig.5B trong đó sự phục hồi sự ức chế được điều tiết bởi PD-1/PD-L1 đối với tín hiệu NFAT bởi các kháng thể PD-1 khác nhau sau khi kích thích TCR được thể hiện: Fig.5A: PD1_0103 thể khám cho thấy hiệu quả tốt hơn có thể lặp lại so với kháng thể tham chiếu. Để làm kháng thể tham chiếu, kháng thể kháng PD1 chứa các miền VH và VL của nivolumab (còn được gọi là MDX-5C4 hoặc MDX-1106) được tổng hợp và tách dòng với khung chính IgG1 của người (có các đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)). Fig.5B: Bốn biến thể được biến đổi giống như của người của PD1_0103 thể hiện hoạt lực *in vitro* tương tự với kháng thể dẫn đầu và cũng tốt hơn đôi chút so với kháng thể tham chiếu.

Ví dụ 8:

Kết tinh Fab PD1-0103 với miền ngoại bào PD-1:

Để tạo phức hợp, Fab PD1-0103 được trộn ở lượng dư mol là 1,1 với miền ngoại bào PD-1. Sau khi ủ trên nước đá trong 1 giờ, phức hợp này được loại nhóm

glycosyl bằng bước PNGaza để loại bỏ các glycan mà không tham gia vào quá trình tạo thành phức hợp. Bước sàng lọc kết tinh đối với các tinh thể phức hợp của mảnh Fab PD1-0103 (với CH1 và CL của người) với PD-1 ECD được thực hiện ở nồng độ là 15 mg/mL. Các giọt kết tinh được tạo ra ở nhiệt độ 21°C bằng cách trộn 0,1 μ L dung dịch protein với 0,1 μ L dung dịch chứa trong các thí nghiệm giọt ngồi khuếch tán hơi. Các tinh thể xuất hiện trong các điều kiện khác nhau chứa PEG làm chất làm kết tủa. Các tinh thể được sử dụng để xác định cấu trúc xuất hiện trong vòng 4 ngày trong PEG1500 30% và phát triển đến kích cỡ cuối cùng là 0,03 x 0,06 x 0,02 μ m trong 7 ngày.

Các tinh thể được chuyển vào dung dịch chứa có bổ sung glyxerol 20% làm chất bảo quản lạnh và sau đó được làm lạnh nhanh trong N₂ lỏng. Các hình ảnh nhiễu xạ được thu thập bằng thiết bị phát hiện Pilatus 6M ở nhiệt độ là 100K tại dòng chùm X10SA của thiết bị Swiss Light Source và được xử lý bằng gói XDS [Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystal of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26, 795-800 (1993)]. Dữ liệu từ một tinh thể được hợp nhất để thu được tập hợp dữ liệu độ phân giải 1,9 Å trong nhóm không gian P1 với hai phân tử phức hợp trên mỗi đơn vị không đối xứng về mặt tinh thể học (xem bảng 1).

Cấu trúc này được xác định bằng phương pháp thay thế phân tử bằng cách sử dụng các chỉ số phối trí của mảnh Fab từ PDB-ID 3UTZ làm mô hình tìm kiếm. PDB-ID 3RRQ được sử dụng làm các chỉ số phối trí tìm kiếm cho PD-1 ECD. Fab được phân chia thành miền hằng định và miền biến đổi, và cả hai tìm kiếm riêng biệt trong chương trình CCP4 PHASER CCP4 đều được thực hiện [CCP4 (Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D*, 760-763 (1994)] để giải thích cho các thay đổi có thể có ở góc khuỷu. Mô hình này được xây dựng lại trong COOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, WG. & Cowtan, K. Features and development of COOT. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 486-501 (2010)) và được tinh chỉnh bằng chương trình CCP4 REFMAC. Các bước tinh chỉnh cuối cùng được thực hiện bằng chương trình BUSTER (Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek

W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vornrhein C., Womack T.O. (2016). BUSTER version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.).

Bảng 9: Tập hợp dữ liệu và số liệu thống kê tinh chỉnh cấu trúc đối với tinh thể Fab PD1-0103-PD-1 ECD

Tập hợp dữ liệu	
Bước sóng (Å)	1,0
Độ phân giải ¹ (Å)	48,27 - 1,90 (1,99 - 1,90)
Nhóm không gian	P1
Ô mạng đơn vị (Å, °)	66,37 69,82 86,09 99,17 98,01 119,40
Phản xạ tổng số	170515 (20750)
Phản xạ độc nhất	97997 (12250)
Độ bội	1,72 (1,66)
Độ hoàn chỉnh (%)	0,97 (0,96)
I/σ(I) trung bình	8,02 (0,86)
Hệ số B Wilson	30,30
R-meas	0,093 (0,610)
CC1/2	0,999 (0,290)
Tinh chỉnh	
Phản xạ dùng trong tinh chỉnh	97986 (6792)
Phản xạ dùng cho R-tự do	4754 (355)
R-làm việc ³	0,1899 (0,2290)
R-tự do ⁴	0,2291 (0,2628)
Số lượng nguyên tử không phải là hydro	9235
Đại phân tử	8199
Hydrat cacbon	162
Gốc protein	1068
Liên kết RMS (Å)	0,013
Góc RMS (°)	1,81
Ramachandran ưu tiên (%)	97
Ramachandran cho phép (%)	2,9
Ramachandran bên ngoài (%)	0,38
Rotamer bên ngoài (%)	2,1
Điểm số va chạm (Clashscore)	2,60
Hệ số B trung bình (Å ²)	36,98
Đại phân tử	36,01
Hydrat cacbon	49,62
Dung môi	38,12

¹ Các giá trị trong dấu ngoặc đơn dùng để chỉ các phân khoảng có độ phân giải cao nhất.

² $R_{\text{hợp nhất}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ trong đó I là cường độ.

³ $R_{\text{làm việc}} = \Sigma |F_o - \langle F_c \rangle| / \Sigma F_o$ trong đó F_o là biên độ hệ số cấu trúc quan sát được và F_c là biên độ hệ số cấu trúc theo tính toán.

⁴ $R_{\text{tự do}}$ được tính toán dựa trên 5% trong dữ liệu tổng số được bỏ qua trong quá trình tinh chỉnh.

Xác định cấu trúc của Fab PD1-0103 trong phức hợp với miền ngoại bào PD-1

Để xác định đặc điểm của epitop và paratop một cách chi tiết, các tác giả sáng chế đã xác định cấu trúc tinh thể của miền ngoại bào PD-1 trong phức hợp với Fab PD1-0103 đến độ phân giải là 1,9Å. Cấu trúc này cho thấy là Fab PD1-0103 nhận diện epitop được tạo thành bởi các vùng vòng BC và FG và bởi các gốc của sợi β CC'FG của phiên β mặt trước của miền PD-1 Ig typ V. Ngoài ra, epitop này bao gồm nhánh glycosyl hóa liên kết N ở vị trí Asn58 mà là một phần của vòng BC của PD-1. Tất cả các CDR ngoại trừ CDR2 của chuỗi nhẹ của Fab PD1-0103 đều góp phần vào paratop.

Diện tích bề mặt là 1063Å² của PD-1 được bao phủ bởi Fab PD1-0103 với 743 Å² do chuỗi nặng góp phần và 320 Å² do chuỗi nhẹ đóng góp phần. Việc phân tích bề mặt chung gắn kết bằng chương trình PISA cho thấy mô hình tương tác của Fab PD1-0103 với PD-1 ECD thông qua 6 liên kết hydro và lực Van der Waal. Các liên kết hydro chuỗi bên được tạo thành giữa các gốc của CDR1 (Thr33) và CDR2 (Ser52, Arg56, Asp57) của chuỗi nặng với Glu61 và Ser62 của vòng BC của PD-1. Các điểm tiếp xúc Van der Waals được điều khiển chủ yếu bởi CDR3 của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, cụ thể là Phe105 của HCDR3, và bởi Tyr32 của HCDR1 ở khoảng cách gần với các gốc Val64 của vòng BC, Pro83 và với Ile126 và Leu128 của vòng FG. Ngoài ra, các điểm tiếp xúc Van der Waals còn được quan sát thấy giữa các gốc của vòng FG Pro130, Ala132, Ile134 với CDR2 của chuỗi nặng và CDR3 của chuỗi nhẹ của Fab PD1-0103. Chuỗi nhẹ của Fab PD1-0103 tiếp xúc theo cách độc chiếm vòng FG của PD-1. Không có điểm tiếp xúc nào được tạo ra bởi CDR2 của chuỗi nhẹ để tạo thành phức hợp.

Nhánh glycosyl hóa liên kết N ở vị trí Asn58 của PD-1 là một phần của epitop và chỉ tương tác với duy nhất các gốc của chuỗi nặng của Fab PD1-0103.

Nhánh chuỗi đường lõi (glycosyl hóa liên kết N) ở vị trí Asn58 của PD-1 có cấu trúc nêu dưới đây đối với các monosacarit

Asn58-N-GlcNAc(FUC) – GlcNAc- – BMA – MAN (xem Fig.9) trong đó các ký hiệu viết tắt dưới đây được sử dụng.

[GlcNAc]= NGA = N-acetyl-beta-D-galactosamin = 2-(axetyl-amino)-2-deoxy-beta-D-galactopyranoza

[FUC] = alpha-L-fucoza

[BMA] = beta-D-mannopyranoza

[MAN] = alpha-D-mannopyranoza

GlcNAC đầu tiên trong chuỗi đường được fucosyl hóa, được viết tắt là GlcNAc(FUC).

Trong cấu trúc này, các glycan lõi được xác định rõ trong mật độ điện tử ngoại trừ một đơn vị mannoza. Gốc fucoza gắn đầu nhọn vào khoang ưa nước tạo thành bởi PD-1 với CDR1 và CDR2. Sự gắn kết của fucoza được điều phối bởi mạng lưới liên kết hydro với Ser30 và Ser31 của CDR1 cùng với Glu61 và Gln99 của PD-1. Các điểm tiếp xúc khác được tạo ra bằng liên kết hydro của GlcNAC đầu tiên với Arg56 và các gốc khung Arg72, Asp73, Asn74 với Man.

Bảng 10: Danh sách các điểm tiếp xúc PD1 – chuỗi nhẹ Fab PD1-0103

Các điểm tiếp xúc được nhận biết theo điểm cắt khoảng cách là 5Å

PD1	HC của PD-103
Ser60	Asp57, Tyr59
Glu61	Thr33, Ser52, Gly53, Gly54, Arg56, Asp57
Ser62	Thr33, Ser52, Asp57, Phe105
Phe63	Phe105
Val64	Gly101, Arg102, Phe105
Tyr68	Tyr104
Lys78	Arg102
Phe82	Ser31
Pro83	Ser31, Tyr32
Glu84	Tyr32
Ile126	Gly101, Tyr104, Phe105
Ser127	Phe105
Leu128	Tyr59, Leu99, Phe105
Pro130	Tyr59
Ile134	Tyr104

Bảng 11: Danh sách các điểm tiếp xúc PD1 – chuỗi nhẹ Fab PD1-0103

Các điểm tiếp xúc được nhận biết theo điểm cắt khoảng cách là 5Å

PD-1	LC của PD-103
Ile126	Phe36
Leu128	Asn95, Trp100
Pro130	Asn95, Tyr96, Asp97, Val98
Lys131	Tyr96, Asp97
Ala132	Asn95, Tyr96, Asp97, Thr31, Phe36
Gln133	Thr31
Ile134	Thr31, Ser32, Asn34, Phe36

Bảng 12: Danh sách các điểm tiếp xúc PD1 của chuỗi đường lõi tại Asn58 – chuỗi nặng Fab PD1-0103

Các điểm tiếp xúc được nhận biết theo điểm cắt khoảng cách là 5Å

PD1 – N-glycosyl hóa tại Asn58 (chuỗi đường lõi)	HC của PD-103
GlcNAc thứ nhất	Arg56, Asp57
FUC	Ser30, Ser31, Tyr32, Gly53, Gly54,
GlcNAc thứ hai	Gly54, Gly55, Arg56
BMA	Gly54, Asn74
MAN	Gly53, Gly54, Gly55, Arg72, Asp73, Asn74

Tóm tắt

- Epitop trên PD1 giống như bề mặt phẳng
-> sự gắn kết chủ yếu do phiến β mặt trước và CDR3 của PD1
- Sự tương tác bao gồm tiếp xúc phân cực và tiếp xúc van der Waals
- Diện tích bề mặt tương tác lớn của PD1 với chuỗi nặng của Fab
- Glycosyl hóa ở vị trí Asn58 tham gia vào sự gắn kết của PD1 với mảnh Fab
- Đơn vị fucosa chiếm khoang tạo thành bởi PD1 và chuỗi nặng của Fab PD1-0103

Ví dụ 9:

Sự gắn kết của kháng thể vào PD1 của người mà không được glycosyl hóa tại Asn58 giảm đi so với sự gắn kết vào PD1 của người mà được glycosyl hóa tại Asn58 (xác định đặc điểm của các kháng thể kháng PD-1 đối với PD1 tái tổ hợp được glycosyl hóa và không được glycosyl hóa bằng Biacore)

Thử nghiệm dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để xác định các thông số động học của sự gắn kết giữa PD1 đã được glycosyl hóa và PD1

tái tổ hợp của người không được glycosyl hóa. Theo đó, kháng thể kháng IgG của người được giữ cố định bằng cách ghép cặp amin vào bề mặt của chip cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó, các mẫu được bắt giữ và huPD1-ECD được gắn kết vào chúng. Bề mặt chip cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Cuối cùng hằng số cân bằng và các hằng số tốc độ động học thu được bằng cách khớp dữ liệu vào mô hình tương tác Langmuir 1:1.

Khoảng 2000 đơn vị đáp ứng (RU) của 20 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể kháng IgG của người (GE Healthcare #BR-1008-39) được ghép cặp lên các tế bào dòng chảy 1 và 2 (theo cách khác: 3 và 4) của chip cảm biến CM5 trong Biacore T200 ở độ pH=5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare.

Mẫu và dung dịch đệm chạy là HBS-EP+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH=7,4). Nhiệt độ tế bào dòng chảy được thiết lập đến 25°C và nhiệt độ buồng mẫu được thiết lập đến 12°C. Hệ thống này được điều khiển bằng dung dịch đệm chạy.

Các mẫu được tiêm trong 20 giây với nồng độ là 10 nM và được gắn kết vào tế bào dòng chảy thứ hai. Sau đó, tập hợp đầy đủ các nồng độ PD1-ECD của người (đã được glycosyl hóa hoặc không được glycosyl hóa) (200 nM, 66,6 nM, 22,2 nM, 7,4 nM, 2,46 nM và 0 nM) được tiêm vào mỗi mẫu trong 200 giây, sau đó là thời gian phân ly là 0/2000 giây (66,6 nM & 22,2 nM) và hai bước tái tạo trong 20 giây bằng MgCl_2 3 M, trong đó bước cuối bao gồm “bước rửa bỏ sung sau khi tiêm” bằng dung dịch đệm chạy.

Cuối cùng, dữ liệu tham chiếu kép được khớp vào mô hình tương tác Langmuir 1:1 bằng phần mềm đánh giá Biacore T200. Các giá trị K_D , k_a và k_d thu được được thể hiện trong bảng 13.

Bảng 13: Các hằng số tốc độ động học và hằng số cân bằng được xác định bằng Biacore.

Phối tử	Mẫu	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
PD1-0103-0312	PD1 không được glycosyl hóa tại Asn58	3,36E+05	2,70E-02	8,02E-08
PD1-0103-0312	PD1 đã được glycosyl hóa tại Asn58	7,77E+05	7,46E-05	9,61E-11
pembrolizumab	PD1 không được glycosyl hóa tại Asn58	1,51E+06	2,46E-03	1,63E-09
pembrolizumab	PD1 đã được glycosyl hóa tại Asn58	1,87E+06	4,50E-03	2,41E-09
nivolumab	PD1 không được glycosyl hóa tại Asn58	5,49E+05	3,66E-03	6,66E-09
nivolumab	PD1 đã được glycosyl hóa tại Asn58	4,44E+05	1,63E-03	3,68E-09

Có sự khác biệt rõ ràng giữa sự gắn kết của PD-103-0312 vào PD-1 không được glycosyl hóa và PD-1 đã được glycosyl hóa, trái ngược với pembrolizumab và nivolumab (xem thêm Fig.13A và Fig.13B).

Ví dụ 10:

Công dụng chống khối u *in vivo* của các kháng thể PD1 ở dạng tổ hợp với kháng thể đặc hiệu kép tế bào T chống lại CEA

Động vật được biến đổi giống như người được tạo ra bằng cách điều hòa các con chuột nhắt NOG, sau đó chuyển giao nuôi các tế bào gốc tạo máu của người. Các con chuột nhắt thu được thể hiện tỷ lệ khảm giữa bạch cầu của người và bạch cầu của chuột nhắt nằm trong khoảng từ 20 đến 85% các tế bào có nguồn gốc từ người. Trong mô hình này, các tế bào T có chức năng và có thể được hoạt hóa để tiêu diệt các tế bào khối u bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết vào CEA và CD3 (được mô tả trong WO2014/131712). Các con chuột nhắt được biến đổi giống như người này sau đó được tiêm một triệu tế bào khối u dương tính với CEA, canxinom dạ dày MKN45, theo đường dưới da ở vị trí bên hông. Sự phát triển khối u có thể được đánh giá bằng cách đo trực 3 chiều của khối u bằng thước kẹp điều khiển bởi người đo, 3 lần một tuần (Fig.14A và Fig.14B). Vào ngày 9 sau khi tiêm khối u, các con chuột nhắt này

được chọn ngẫu nhiên dựa vào kích thước khối u để có các nhóm chuột nhất đồng nhất và bắt đầu quá trình điều trị trị liệu. Ngoài trừ các nhóm được điều trị bằng chất dẫn (Fig.xA và Fig.XB, các hình tròn), tất cả các nhóm chuột nhất đều được cho sử dụng CEACD3TCB trong tĩnh mạch với liều là 2,5 mg/kg hai lần một tuần. Ngoài ra, mỗi nhóm chuột nhất cũng được điều trị bằng một đôi tác kết hợp: kháng thể kháng PD1 (PD1-0103-0312) với liều là 0,15 mg/kg mỗi tuần (Fig.14A, các hình vuông) hoặc 1,5 mg/kg mỗi tuần (Fig.14B, các hình vuông) trong màng bụng; nivolumab với liều là 0,15 mg/kg mỗi tuần (Fig.14A, các hình thoi) hoặc 1,5 mg/kg mỗi tuần (Fig.14B, các hình thoi) trong màng bụng. Giá trị trung bình của kích thước khối u trong một nhóm điều trị được thể hiện theo thời gian. Mỗi nhóm bao gồm 9-10 con chuột nhất và tiếp tục đo cho đến khi có ít nhất 3 con chuột nhất mỗi nhóm. Diện tích dưới đường cong đã được chuẩn hóa (SAUC) được tính toán và phân tích ANOVA một chiều được sử dụng để tính mức ý nghĩa thống kê.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này
 - i) chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:58, hoặc
 - ii) chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:59, hoặc
 - iii) chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:60, hoặc
 - iv) chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:61.
2. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:58.
3. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:59.
4. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:60.
5. Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, trong đó kháng thể này chứa trình tự VH của SEQ ID NO:57 và trình tự VL của SEQ ID NO:61.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1 có chiều dài đầy đủ có các đột biến L234A, L235A và P329G theo cách đánh số chỉ số EU.
7. Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.
8. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 7.
9. Phương pháp tạo ra kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 8 sao cho kháng thể được tạo ra.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi kháng thể từ tế bào chủ.
11. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và chất mang dược dụng.

Fig. 1

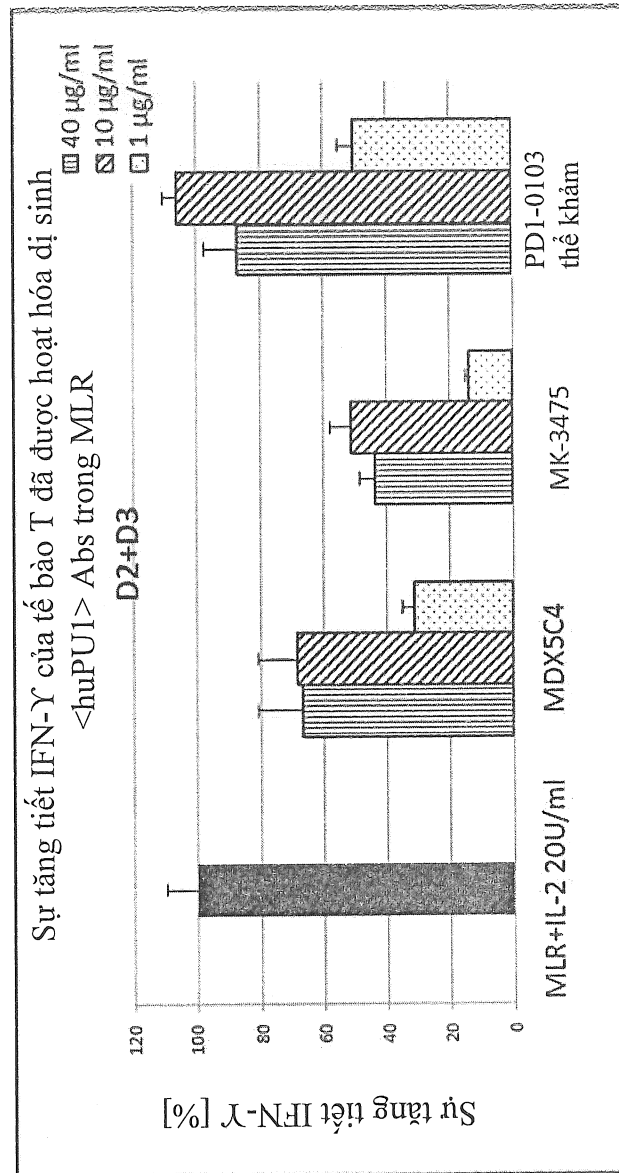


Fig. 2

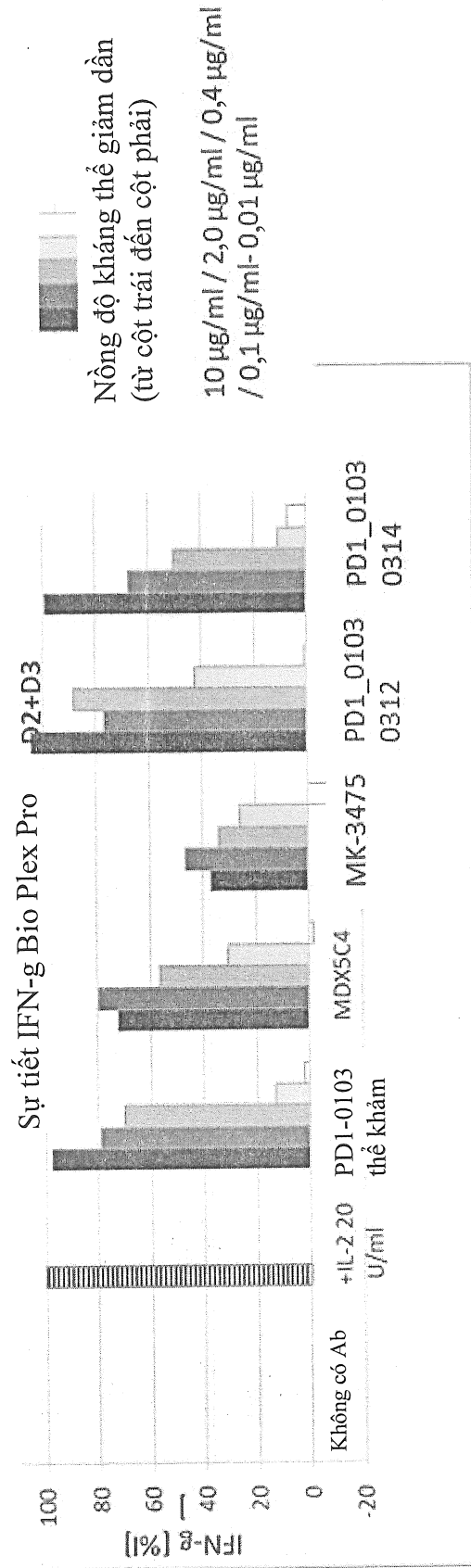


Fig. 3

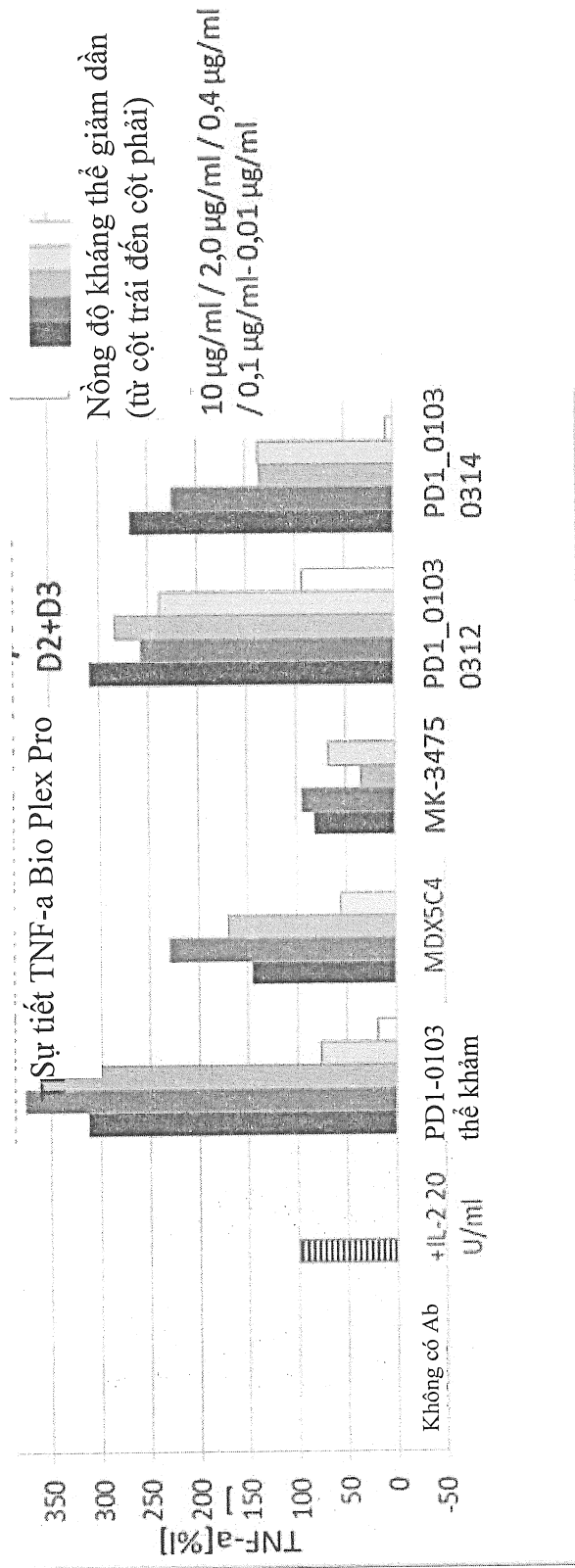


Fig. 4A

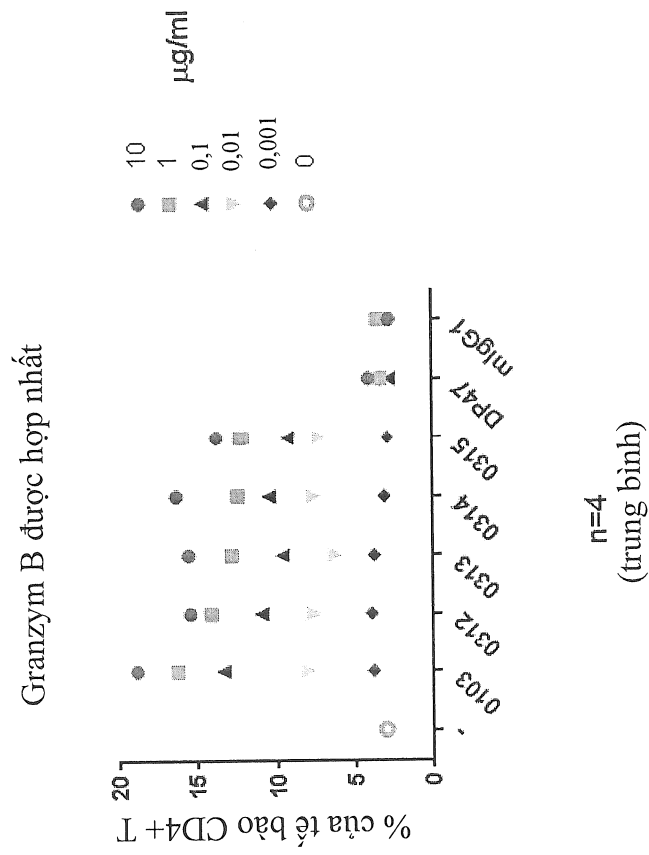


Fig. 4B

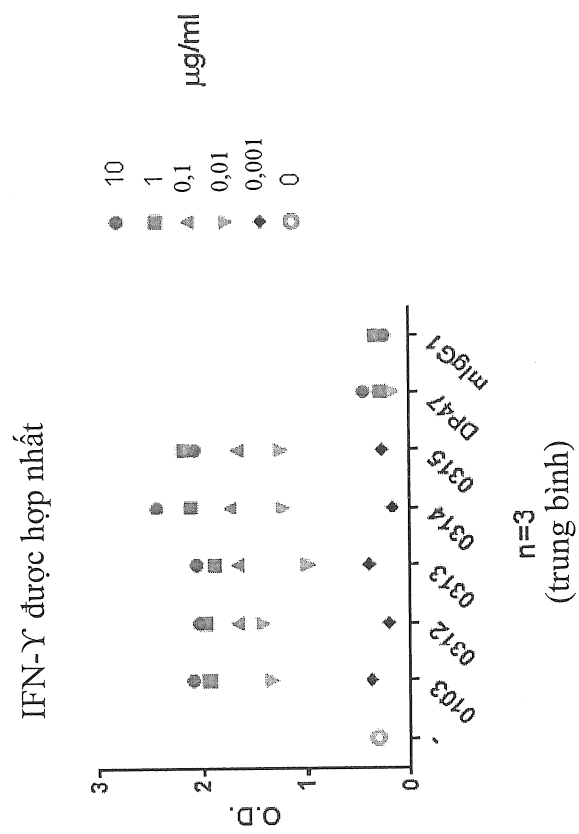
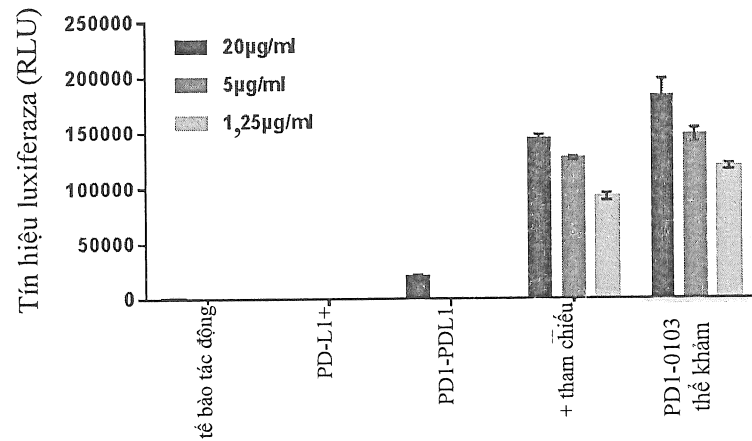


Fig. 5A và 5B

5A

(1) Tác động của việc phong bế PD1/PD-L1 đối với sự tái hoạt hóa quá trình phát tín hiệu TCR đã bị ức chế



5B

(2) Tác động của việc phong bế PD1/PD-L1 đối với sự tái hoạt hóa quá trình phát tín hiệu TCR đã bị ức chế

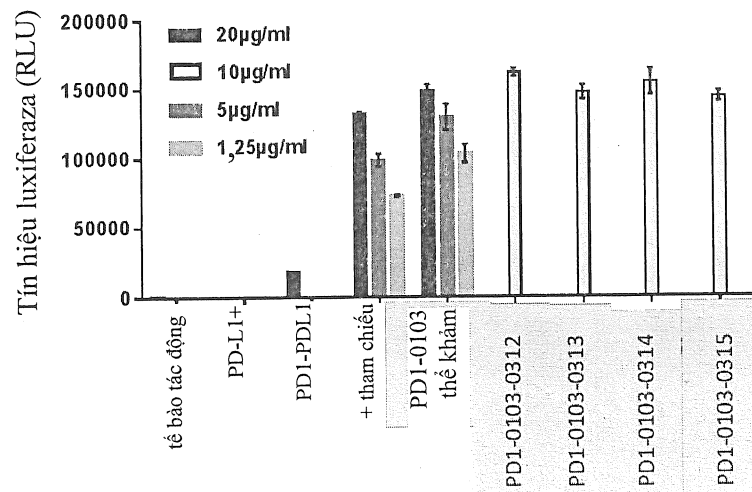
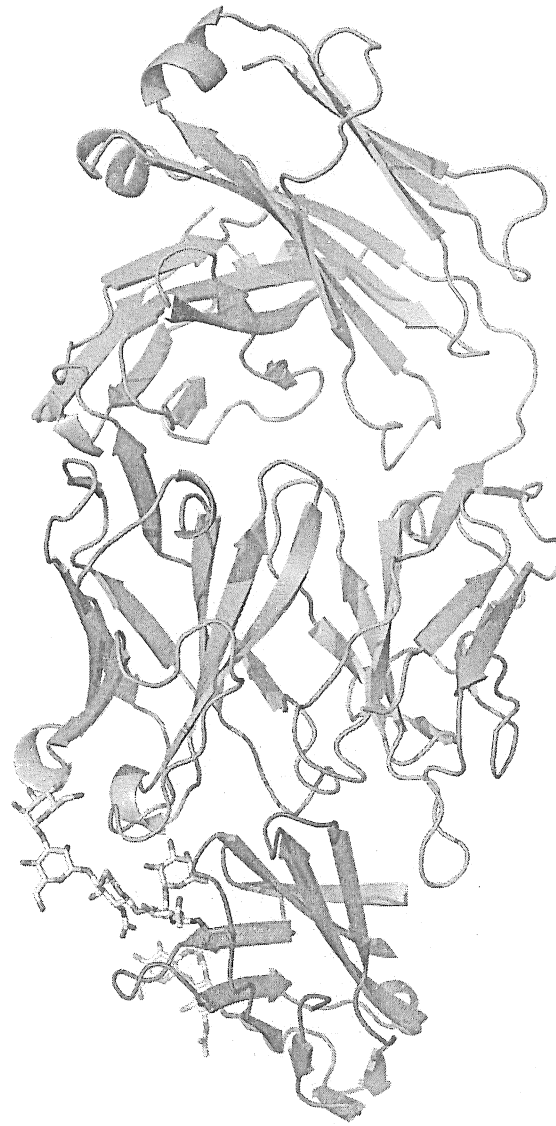


Fig. 6



PD1-ECD

Fab PD1-0103

Chuỗi nặng

Chuỗi nhẹ

7 / 17

Fig. 7

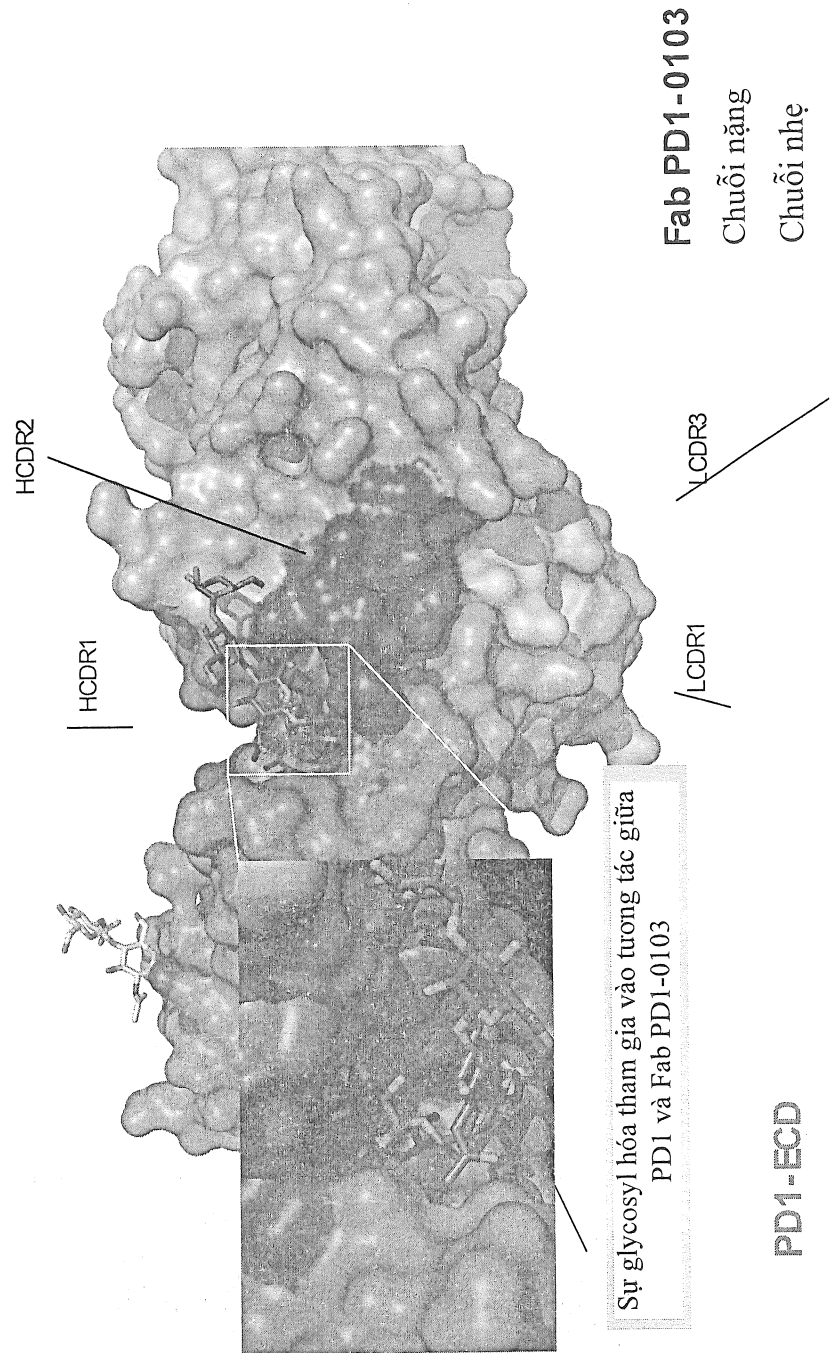
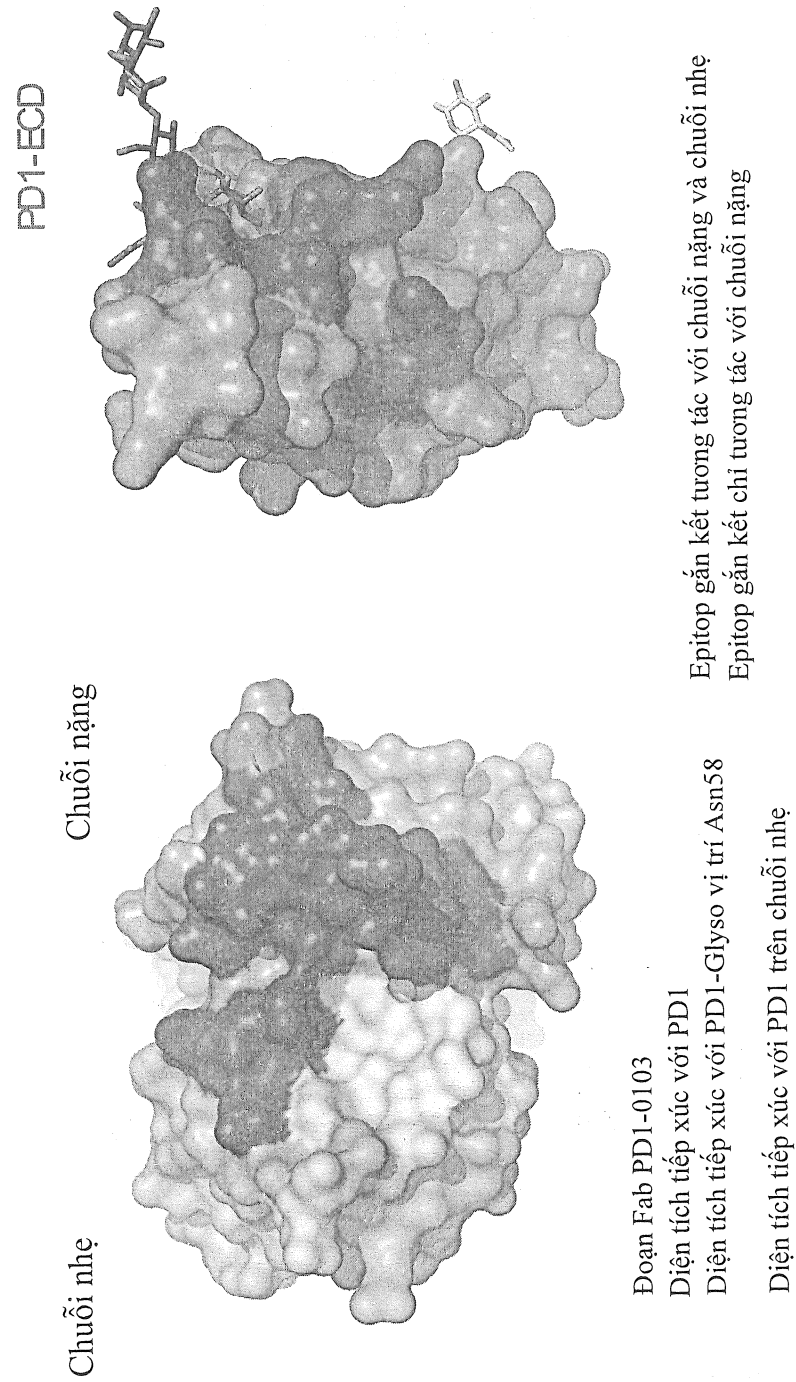


Fig. 8



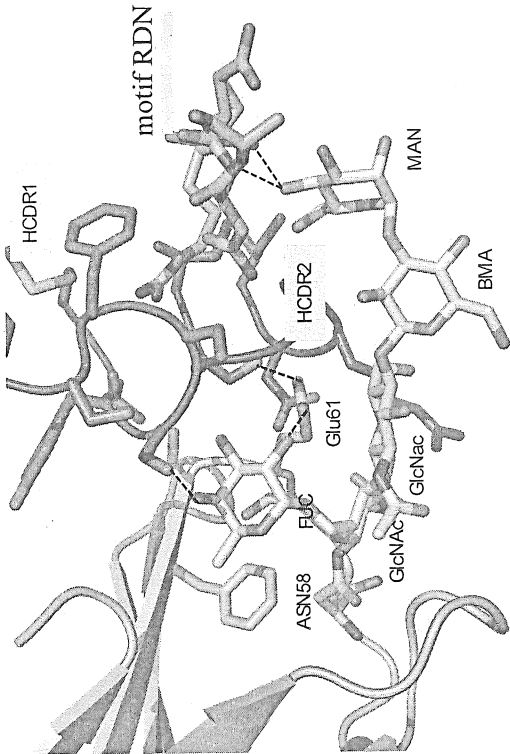


Fig. 9

PD1-Glycosyl hóa tại Asn58 (chuỗi đường lõi)	HC
GlcNAc thứ nhất	Arg56, Asp57
FUC	Ser30, Ser31, Tyr32, Gly53, Gly54,
GlcNAc thứ hai	Gly54, Gly55, Arg56
BMA	Gly54, Asn74
MAN	Gly53, Gly54, Gly55, Arg72, Asp73, Asn74

[GlcNAc] = NGA = N-axetyl-beta-D-galactosamin = 2-(axetyl(amino)-2-deoxy-beta-D-galactopyranoza
[FUC] = alpha-L-fucoza
[BMA] = beta-D-mannopyranoza
[MAN] = alpha-D-mannopyranoza

Fig. 11

- Màu vàng: các CDR
- Màu đỏ: các gốc kháng thể tương tác với kháng nguyên
- Các điểm tiếp xúc được tính toán bởi PISA

> PD1-0103_HC

```

      . 10 . 20 . 30 . 40 . 50
EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSESSYIMSWVRQTPEKRLDWVAT
      . 60 . 70 . 80 . 90 . 100
ISGGGRDILYPDSVKGRFTISFDNAKNTLYLEMSSLMSEDTALYICVLLT
      . 110 . 120
GRVTFALDSWGQGTSTVTVSS
```

* = tương tác với glycosyl hóa
▲ = tương tác chuỗi bên
■ = tương tác chuỗi chính

Fig. 12

- Màu vàng: các CDR
- Màu đỏ: các góc kháng thể tương tác với kháng nguyên
- Các điểm tiếp xúc được tính toán bởi PISA

> PD1-0103_LC

```

      . 10 . 20 . 30 . 40 . 50
KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDISDSITHWYQORPGQSPKL
      . 60 . 70 . 80 . 90 . 100
LIYRSSTIESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYYCOONHYDYP
TFGGGTKLEIK
```

▲ = tương tác chuỗi bên

■ = tương tác chuỗi chính

Fig. 13A

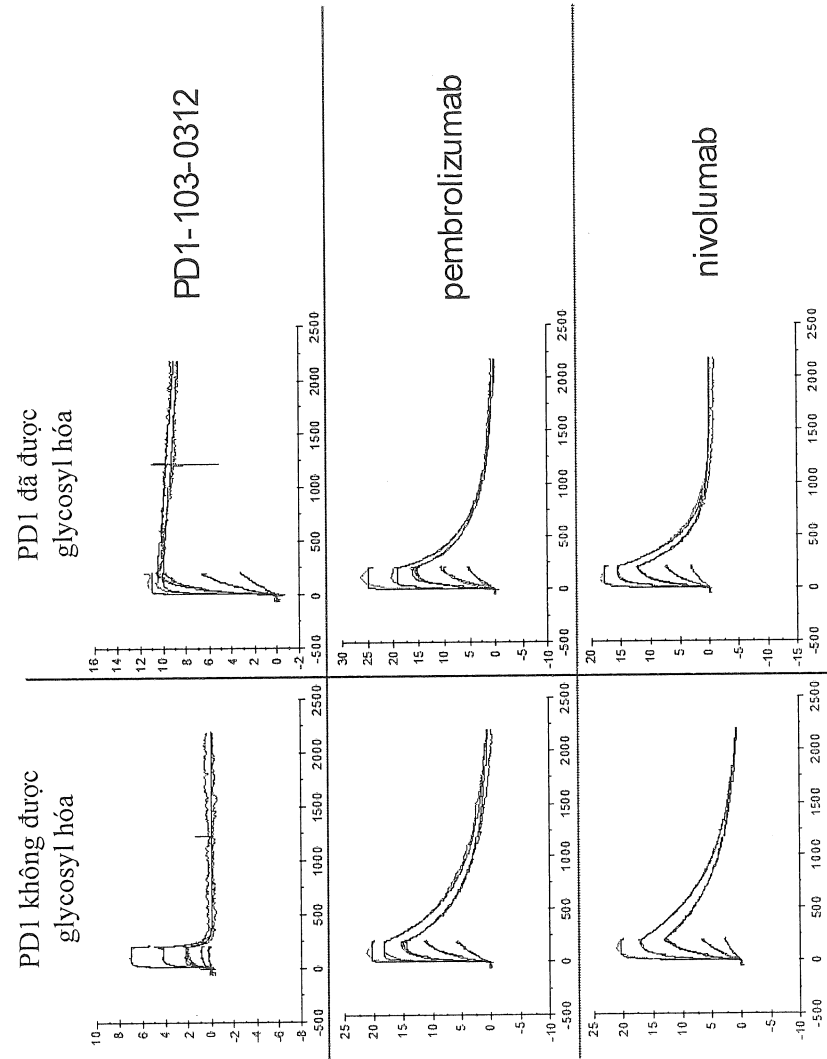


Fig. 14A

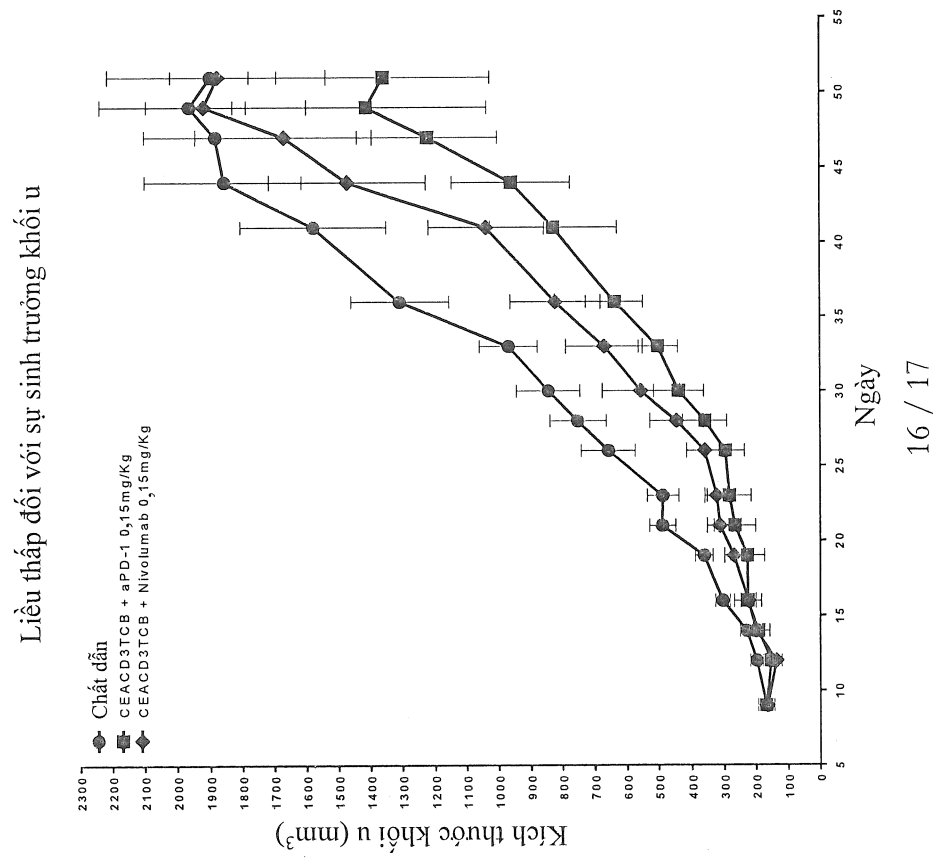
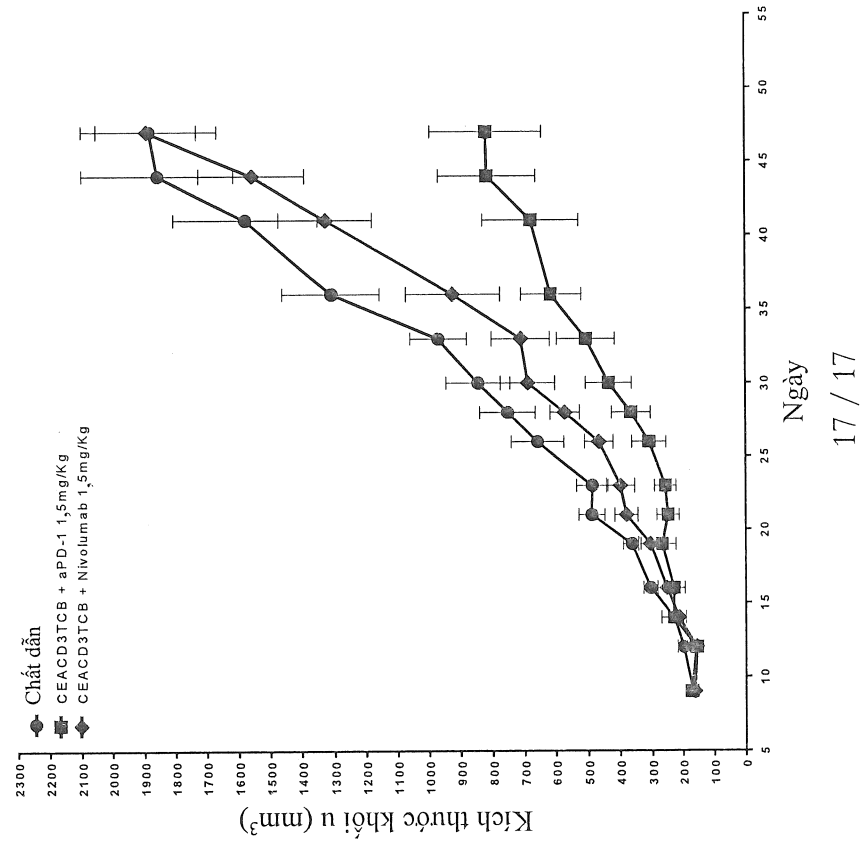


Fig. 14B

Liều cao đối với sự sinh trưởng khối u



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Kháng thể đã được phân lập gắn kết vào PD1 của người, phương pháp tạo ra kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> P33103-WO

<150> EP15188061.4

<151> 2015-10-02

<160> 77

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 1

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 2

Gly Gly Arg
1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 3

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 4

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe

1 5 10

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 5

Arg Ser Ser
 1

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 6

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 7

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 Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 8

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 9

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 10

Tyr Ser Gly
1

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 11

His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp
1 5

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 12

Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 13

Lys Val Ser
1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 14

Gly Ser His Phe Pro Leu
1 5

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 15

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 16

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

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

Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg 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 Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 17

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 18

Tyr Thr Gly
 1

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 19

Met Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Asp
 1 5

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 20

Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr Gly Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 21
 <211> 3

<212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 21

Arg Ala Ser
 1

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 22

Asn Asn Glu Asp Pro Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 23

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser 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 Tyr Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Met Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 24

Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Arg Tyr
 20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 1 5

<210> 26
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 26

Tyr Ser Gly
 1

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 27

Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala
 1 5

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 28

Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe
 1 5 10

<210> 29
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 29

Tyr Ala Ser
 1

<210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 30

Ser Arg Glu Phe Pro Trp
 1 5

<210> 31
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 31

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

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

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 32
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 32

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 Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr 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 Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg
85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 33

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 34

Gly Gly Arg
 1

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 35

Tyr Tyr Gly Ile Asp
 1 5

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 36

Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 37

Trp Ala Ser
1

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 38

His Tyr Ser Ile Pro Trp
1 5

<210> 39
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 39

Glu Val Lys 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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 107
<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Pro His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Arg Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 41

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Thr
1 5

<210> 42

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 42

Ser Asp Ser
1

<210> 43

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 43

Pro Phe Asp

1

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 44

Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

1

5

<210> 45

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 45

Ser Ala Ser

1

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 46

His Tyr Ser His Pro Phe

1

5

<210> 47

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 47

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 Thr Phe Thr Ser Thr

20

25

30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

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

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

Thr Arg Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys 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 Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr 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 Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser His Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 49

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
 1 5

<210> 50
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 50

Ser Ser Gly
 1

<210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 51

Arg Asn Trp Tyr Phe Asp
 1 5

<210> 52
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 52

Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Thr Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 53

Trp Ala Ser
 1

<210> 54

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 54

Asp Tyr Thr Phe Pro Leu
 1 5

<210> 55
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 55

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Phe Ile His Ser Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Asp Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Tyr Arg Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 56

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

33109

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

Lys

<210>	57
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> biến thể được biến đổi giống như của người -VH miền biến đổi chuỗi nặng của PD1-0103_01

<400> 57

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> biến thể được biến đổi giống như của người -VL miễn biến đổi chuỗi nhẹ của PD1-0103_01

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
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 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 59

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> biến thể được biến đổi giống như của người -VL miễn biến đổi chuỗi nhẹ của PD1-0103_02

<400> 59

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 Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 60
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> biến thể được biến đổi giống như của người -VL miễn biến đổi chuỗi nhẹ của PD1-0103_03

<400> 60

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 Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile 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 Gln Asn Tyr
85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 61

<211> 111

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> biến thể được biến đổi giống như của người -VL miễn biến đổi chuỗi nhẹ của PD1-0103_04

<400> 61

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 Thr Ser
20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile 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 Gln Asn Tyr
85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 62

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> 63
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 63

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 Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50

55

60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 64

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 64

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 65
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1		5		10		15													
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr				
			20					25					30						
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser				
		35					40					45							
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser				
	50					55					60								
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr				
65					70				75						80				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
			85					90						95					
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
			100					105					110						
Pro	Ala	Pro	Glu	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	Asp	Glu				
225					230					235					240				

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 66
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 66

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Glu	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	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
225					230					235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275					280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
305					310					315					320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							

325

330

<210> 67
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 67

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 Ser 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 Lys
325

<210> 68
<211> 268
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 68

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu

50						55										60
Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	Val	Thr	Gln	Leu	
65					70					75					80	
Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	
				85					90					95		
Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	
			100					105					110			
Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Arg	
		115					120					125				
Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Gly	
	130					135						140				
Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	Ser	Arg	Ala	Ala	
				165					170					175		
Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Asp	
			180					185					190			
Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	
		195					200					205				
Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Cys	Val	Pro	Glu	
	210					215					220					
Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala	Thr	Ile	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	Met	Gly	Thr	Ser	
225					230					235					240	
Ser	Pro	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Ala	Gln	Pro	
				245					250					255		
Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Cys	Ser	Trp	Pro	Leu					
			260					265								
<210>	69															
<211>	150															

<212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 69

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 70
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 70

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

[illegible]

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>	71
<211>	4
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> HVR1 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

<400> 71

Ser Ser Tyr Thr
1

<210>	72
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> HVR2 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

<400> 72

Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr
1 5

<210>	73
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> HVR3 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

<400> 73

Gly Arg Val Tyr Phe
1 5

$\langle 210 \rangle$	74
$\langle 211 \rangle$	6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> LVR1 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

<400> 74

Thr Ser Asp Asn Ser Phe

1

5

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> LVR2 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

<400> 75

Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser

1

5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> LVR3 tối thiểu của PD1-0103 và biến thể được biến đổi giống như của người của PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314 và PD1-0103-0315

<400> 76

Asn Tyr Asp Val Pro Trp

1

5

<210> 77

<211> 3

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn của FR-H3 chứa trình tự axit amin RDN tại các vị trí là 71, 72, 73 theo hệ thống đánh số Kabat

<400> 77

Arg Asp Asn

1