



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0034271

(51)⁷ C07K 16/28; C12N 15/13; C07K 16/46; (13) B
A61K 39/395

(21) 1-2019-03822

(22) 06/07/2017

(86) PCT/CN2017/092026 06/07/2017

(87) WO 2018/113258 28/06/2018

(30) 201611198440.8 22/12/2016 CN

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/09/2019 378A

(73) AMPSOURCE BIOPHARMA SHANGHAI INC. (CN)

No.3, Lane 908, Ziping Road, Pudong New Area Shanghai 201318, China

(72) LI, Qiang (CA); ZHENG, Yuncheng (CN); YANG, Lu (CN); MA, Xinlu (CN); LI, Yuanli (CN).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PROTEIN CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH 1, PHÂN TỬ ADN, VECTƠ BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ, PHÂN TỬ ĐẶC HIỆU KÉP, THỂ TIẾP HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM KHÁNG THỂ NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 (programmed death-1 - PD-1) có ái lực cao. Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN mã hóa kháng thể này, vectơ biểu hiện bao gồm phân tử AND này và tế bào chủ được biến nạp với vectơ biểu hiện này, phân tử đặc hiệu kép bao gồm kháng thể kháng này, và phương pháp sản xuất kháng thể. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất là thể tiếp hợp miễn dịch và dược phẩm bao gồm kháng thể này.

Lĩnh vực sáng chế được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực kháng thể đơn dòng trị liệu và cụ thể hơn là kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 (programmed death-1 - PD-1). Sáng chế đề cập đến phân tử ADN mã hóa kháng thể này, vector biểu hiện chứa phân tử này, tế bào chủ được chuyển vector biểu hiện này, phân tử đặc hiệu kép và thể tiếp hợp miễn dịch và được phẩm chứa kháng thể này, và phương pháp sản xuất kháng thể.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein PD-1 là thành viên của họ CD28 và là thụ thể ức chế miễn dịch thể hiện trên bề mặt của tế bào B và tế bào T hoạt hóa (Yao Z et al., 2013, Nat Rev Drug Discov, 12(2):130-146), ban đầu được thu từ khối tế bào lai (hybridoma) của tế bào T chết theo chương trình bằng kỹ thuật lai loại trừ. PD-1 được biểu hiện chủ yếu trên bề mặt tế bào T CD4⁺, tế bào T CD8⁺, tế bào NKT, tế bào B và tế bào đơn nhân hoạt hóa. Biểu hiện của nó trên bề mặt của tế bào được cảm ứng bằng cách phát tín hiệu thụ thể tế bào T (T cell receptor - TCR) hoặc thụ thể tế bào B (B cell receptor - BCR) và được tăng cường bởi TNF- α (Francisco LM et al., 2010, Immunol Rev, 236: 219-242). Phân tử PD-1 bao gồm vùng ngoại bào, vùng xuyên màng và đuôi nội bào. Vùng ngoại bào có vùng IgV của vùng biến đổi globulin miễn dịch, và đuôi nội bào chứa hai môtip truyền tín hiệu dựa trên tyrosin: môtip ức chế dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif - ITIM) và môtip chuyển đổi dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif - ITSM). Sau khi hoạt hóa tế bào T, PD-1 chiêu mộ tyrosin phospholipaza SHP2 chủ yếu thông qua môtip ITSM, dẫn đến sự khử phospho của các phân tử thực hiện bao gồm CD3 ζ , PKC θ , và ZAP70. PD-1 có hai phối tử, PD-L1 và PD-L2. PD-L1 cũng được biết như là B7H1 hoặc CD274, và PD-L2 cũng được gọi là B7DC hoặc CD273. PD-L1 và PD-L2 được biểu hiện trong các loại tế bào khác nhau (Shimauchi, Kabashima et al., 2007, Int J Cancer, 121 (12):2585-2590). Về kiểu biểu hiện, sự biểu hiện PD-L2 bị hạn chế ở mức độ cao, chủ yếu ở đại thực bào hoạt hóa, tế bào đuôi gai và một phần nhỏ của tế bào khối u. Ngược lại, PD-L1 được biểu hiện rộng rãi ở tế bào T hoạt hóa, tế

bào B, đại thực bào, tế bào đuôi gai và tế bào khối u, và tại các vị trí đặc quyền miễn dịch, bao gồm nhau thai và mắt, cũng như tế bào nội mô mạch máu, tế bào biểu mô, tế bào cơ và tế bào gan.

PD-1 tương tác với phối tử của nó PD-L1 và PD-L2 (programmed death-1 ligands - PD-Ls) để ức chế đáng kể sự hoạt hóa tế bào T qua trung gian CD3/CD28 và sản xuất xytokin thông qua con đường truyền tín hiệu nội bào, và do đó PD-1 và PD-Ls là các protein điểm kiểm soát miễn dịch quan trọng điều hòa các phản ứng của tế bào T. Ở trạng thái bình thường, con đường phát tín hiệu PD-1/PD-Ls có thể cảm ứng và duy trì sự dung nạp miễn dịch của mô ngoại biên, có tác dụng tích cực trong việc ngăn ngừa viêm mô quá mức và sự xuất hiện của các bệnh tự miễn (Latchman Y et al., 2001, Nat Immunol, 2:261-268). Ở trạng thái bệnh lý, sự tương tác của PD-1 và PD-L1/PD-L2 giảm điều hòa sự tiết các xytokin kích thích miễn dịch tế bào T như IFN- γ , IL-2 và TNF- α và sự biểu hiện của protein sống sót, và thúc đẩy sự tiết xytokin ức chế miễn dịch IL-10, do đó ức chế phản ứng miễn dịch của tế bào T (Hamid O et al., 2013, Expert Opin Biol Ther, 13(6):847-861). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự phát tín hiệu đồng ức chế PD-1 có liên quan mật thiết đến sự xuất hiện của các bệnh khác nhau ở người và phân tử phát tín hiệu đồng ức chế PD-1 có thể được nhắm đích để điều trị bệnh (Okazaki T et al., 2007, J Immunol; 19:813-824).

Con đường phát tín hiệu PD-1/PD-L1 liên quan mật thiết đến sự tiến triển của khối u. Ở bệnh nhân ung thư, sự biểu hiện quá mức PD-L1 có thể tăng cường khả năng di căn của khối u, dẫn đến tăng tỷ lệ tử vong và tiên lượng xấu. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự biểu hiện cao của PD-L1 được phát hiện trong các mô khối u của ung thư phổi, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư da, ung thư bàng quang, ung thư ruột kết, ung thư vú, u thần kinh đệm, ung thư thận, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, ung thư biểu mô tế bào vảy miệng và ung thư đầu và cổ ở người. Ngoài ra, PD-L1 được biểu hiện cao trong các tế bào khối u với sự hiện diện của nhiều loại xytokin và liên quan đến sự trốn tránh miễn dịch của tế bào khối u. Trong khi đó, tế bào T CD8⁺ xâm nhập khối u tại vị trí khối u cũng bị ảnh hưởng bởi môi trường vi mô của khối u, và biểu hiện PD-1 cao hơn so với tế bào T trong máu ngoại biên. PD-1 tương tác với PD-L1 trên bề mặt tế bào khối u, ức chế sự hoạt hóa và tăng sinh của tế bào T. Tế bào khối u có thể trốn tránh sự tiêu diệt bởi các tế bào lympho gây độc (cytotoxic lymphocytes - CTLs), và làm suy yếu phản ứng miễn dịch kháng ung thư

của cơ thể. Việc phong tỏa sự phát tín hiệu PD-1/PD-L1 bởi kháng thể đơn dòng kháng PD-1 có thể tăng điều hòa sự tiết IFN- γ , IL-2, và IL-10, đảo ngược có hiệu quả sự ức chế tăng sinh của tế bào T CD4⁺ và CD8⁺, và tăng cường rõ rệt sự hoạt hóa và khả năng tiêu diệt tế bào T (Dong HD et al., 2002, Nat Med, 8:793-800).

Nhiều sự lây nhiễm virus cấp tính và mãn tính cũng trốn tránh sự giám sát miễn dịch ở người thông qua tương tác PD-1/PD-Ls. Các tế bào T CD4⁺, CD8⁺ đặc hiệu cho virus ngoại biên biểu hiện quá mức PD-1, dẫn đến rối loạn chức năng hoặc bất toàn trong việc loại bỏ virus lây nhiễm kịp thời và hiệu quả (Venkatachari NJ et al., 2008, Virology, 376:140-153). Gần đây, một lượng lớn các nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc phong tỏa con đường ức chế PD-1/PD-Ls bởi kháng thể đơn dòng đặc hiệu có thể hoạt hóa và tăng sinh hiệu quả tế bào T CD4⁺, CD8⁺ đặc hiệu cho virus HIV, HBV và HCV, tạo ra các yếu tố tiêu diệt như IFN- γ , TNF- α và granzym B, và khôi phục các đặc tính kháng virus đặc hiệu tế bào miễn dịch (Barber DL et al., 2006, Nature, 439:682-687).

Do đó, kháng thể đơn dòng kháng PD-1 đặc hiệu được điều chế để phong tỏa việc phát tín hiệu PD-1/PD-L1 và đóng con đường ức chế, điều này sẽ tăng cường chức năng của CTL để tiêu diệt tế bào khối u, và ức chế hiệu quả sự hình thành và phát triển khối u. Hiện nay trên thị trường có hai loại thuốc kháng thể kháng PD-1 kháng ung thư là Pembrolizumab (tên thương mại là Keytruda, Merck Sharp & Dohme) và Nivolumab (tên thương mại là Opdivo, Ono Pharmaceutical/Bristol-Myers Squibb). Pidilizumab, được phát triển bởi Cure Tech, trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II. AMP-224 và AMP-514, được phát triển bởi MedImmune, trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I. Mặc dù có nhiều kháng thể đơn dòng theo điểm kiểm soát miễn dịch chống lại PD-1, PD-L1 và CTLA4 được sử dụng trong điều trị lâm sàng, tỷ lệ đáp ứng của các kháng thể này được sử dụng như loại thuốc đơn vẫn còn thấp, trung bình chỉ 15-20%. Do đó, cần thiết để phát triển kháng thể đơn dòng kháng PD-1 mới với độ đặc hiệu cao hơn, tác dụng phụ độc hại thấp hơn, và hiệu quả lâm sàng tốt hơn, sẽ cung cấp nhiều lựa chọn thuốc hơn cho bệnh nhân ung thư và bệnh nhân mắc bệnh lây nhiễm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng kháng PD-1 có ái lực cao với phân tử PD-1.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập liên kết với PD-1, bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3,

trong đó:

(i) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự CDR-H1 được chọn từ SEQ ID NO: 1 hoặc 2, trình tự CDR-H2 được chọn từ SEQ ID NO: 3 hoặc 4, và trình tự CDR-H3 được chọn từ SEQ ID NO: 5 hoặc 6; và

(ii) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự CDR-L1 được chọn từ SEQ ID NO: 7 hoặc 8, trình tự CDR-L2 được chọn từ SEQ ID NO: 9 hoặc 10, và trình tự CDR-L3 được chọn từ SEQ ID NO: 11 hoặc 12.

Trong phương án được ưu tiên của sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chứa trình tự CDR-H1 được thể hiện ở SEQ ID NO: 1, trình tự CDR-H2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 3, trình tự CDR-H3 được thể hiện ở SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chứa trình tự CDR-L1 được thể hiện ở SEQ ID NO: 7, trình tự CDR-L2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 9, và trình tự CDR-L3 được thể hiện ở SEQ ID NO: 11.

Trong phương án được ưu tiên khác của sáng chế, vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể chứa trình tự CDR-H1 được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, trình tự CDR-H2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 4, và trình tự CDR-H3 được thể hiện ở SEQ ID NO: 6; và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể chứa trình tự CDR-L1 được thể hiện ở SEQ ID NO: 8, trình tự CDR-L2 được thể hiện ở SEQ ID NO: 10, và trình tự CDR-L3 được thể hiện ở SEQ ID NO: 12.

Ngoài ra, kháng thể chứa trình tự CDR được mô tả ở trên là thuộc chuột, khảm, hoặc được làm giống người.

Ví dụ, kháng thể là thuộc chuột hoặc khảm. Vùng biến đổi của chuỗi nặng của nó còn chứa vùng FR chuỗi nặng của IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ ở chuột, hoặc thể biến dị của chúng; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa vùng FR chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ ở chuột

hoặc thể biến dị của chúng.

Hơn nữa, kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm chứa:

(a) vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 15,

(b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 16.

Ví dụ, trong phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể AB12N1 thuộc chuột và kháng thể AB12N2 khảm, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 15, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 16.

Hơn nữa, kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm chứa:

(a) vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13;

(b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14.

Ví dụ, trong phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể chuột AB12M1 và kháng thể khảm AB12M2, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm trình tự axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO: 14.

Ví dụ, kháng thể được làm giống người. Phương pháp sản xuất kháng thể làm giống người được biết rõ bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, kháng thể kháng PD-1 làm giống người của sáng chế có thể được sản xuất bằng cách chuyển trình tự CDR của sáng chế vào vùng biến đổi kháng thể của người. Kháng thể làm giống người không tạo ra phản ứng kháng kháng thể (anti-antibody response - AAR) hoặc phản ứng kháng kháng thể chuột ở người (human anti-mouse antibody response - HAMA), và không bị loại bỏ nhanh chóng bởi sự trung hòa bởi kháng kháng thể.

Trong phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể chuột AB12M1 được làm giống người bằng cách ghép CDR. Trong kết quả kháng thể làm giống người, tốt nhất là, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27 và 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26,

28 và 30. Hơn nữa, trong kết quả kháng thể làm giống người AB12M3, AB12M4, AB12M5, AB12M6, AB12M7, AB12M8 và AB12M9, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm lần lượt trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27 và 29, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng bao gồm lần lượt trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28 và 30.

Trong phương án được ưu tiên khác của sáng chế, kháng thể chuột AB12N1 được làm giống người bằng cách ghép CDR. Trong kết quả kháng thể làm giống người, tốt nhất là, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 31, 33 và 35, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 32, 34 và 36. Hơn nữa, trong kết quả kháng thể làm giống người AB12N3, AB12N4 và AB12N5, vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm lần lượt trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, 33 và 35, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tương ứng bao gồm lần lượt trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32, 34 và 36.

Không ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động của kháng thể, một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thay thế, thêm và/hoặc loại bỏ một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 hoặc hơn) axit amin từ trình tự kháng thể của sáng chế để thu được thể biến dị của kháng thể, mà được coi là trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, thay thế axit amin có đặc tính tương tự trong vùng biến đổi. Trình tự axit amin của thể biến dị của sáng chế có thể có ít nhất 80% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin nguồn của chúng trước khi biến đổi; hơn nữa, trình tự axit amin của thể biến dị của sáng chế có thể có ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97% 98% hoặc 99% trình tự đồng nhất với trình tự axit amin nguồn của chúng trước khi biến đổi.

Kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ, trong một số phương án được ưu tiên, kháng thể kháng PD-1 người của sáng chế còn bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của người IgG₄ hoặc IgG₁ và vùng cố định chuỗi nhẹ κ ở người. Ngoài ra, kháng thể có thể chỉ bao gồm đoạn liên kết kháng nguyên, như đoạn Fab hoặc F(ab')₂, hoặc kháng thể chuỗi đơn scFv.

Trong bất kỳ phương án được mô tả ở trên, kháng thể của sáng chế có thể liên kết với PD-1 có K_D khoảng 1 nM hoặc thấp hơn; trong phương án được ưu tiên, kháng thể có thể liên kết với PD-1 có K_D khoảng 100 pM hoặc thấp hơn; trong phương án được

ưu tiên hơn, kháng thể có thể liên kết với PD-1 có K_D khoảng 10 pM hoặc thấp hơn; trong phương án được ưu tiên nhất, kháng thể có thể liên kết với PD-1 có K_D khoảng 1 pM hoặc thấp hơn.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phân tử ADN mã hóa bất kỳ một kháng thể như mô tả ở trên.

Ví dụ, phân tử ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể khảm được ưu tiên AB12M2 của sáng chế được thể hiện ở SEQ ID NO: 37, và phân tử ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng được thể hiện ở SEQ ID NO: 38.

Ví dụ khác, phân tử ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người được ưu tiên AB12M3 của sáng chế được thể hiện ở SEQ ID NO: 39, và phân tử ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng được thể hiện ở SEQ ID NO: 40.

Ví dụ khác, phân tử ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người được ưu tiên khác AB12M4 của sáng chế được thể hiện ở SEQ ID NO: 41, và phân tử ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng được thể hiện ở SEQ ID NO: 42.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa bất kỳ một phân tử ADN nào của sáng chế như mô tả ở trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất tế bào chủ được chuyển nạp với một vector biểu hiện bất kỳ như mô tả ở trên. Tế bào chủ tốt nhất là tế bào CHO.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể của sáng chế tiếp hợp với tác nhân trị liệu. Tác nhân trị liệu tốt nhất là độc tố, đồng vị phóng xạ, thuốc, hoặc tác nhân gây độc tế bào.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phân tử đặc hiệu kép chứa một kháng thể bất kỳ của sáng chế. Ví dụ, kháng thể PD-1 miêu tả ở trên có thể được liên kết về mặt chức năng với kháng thể hoặc đoạn kháng thể có tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên khác để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép còn bao gồm, nhưng không giới hạn, kháng thể chống lại phân tử như VEGF, EGFR, HER2/neu, thụ thể VEGF hoặc thụ thể của nhân tố sinh trưởng khác, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, và ICOS.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể của sáng chế và tá dược, chất mang, hoặc chất pha loãng được dùng.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể của sáng chế, bao gồm: (a) nuôi cấy tế bào chủ được miêu tả ở trên trong điều kiện cho phép sản xuất kháng thể, (b) thu hồi và phân lập kháng thể được tạo ra.

Khía cạnh khác của sáng chế mô tả cách sử dụng kháng thể kháng PD-1, được phẩm, thể tiếp hợp miễn dịch, và phân tử đặc hiệu kép của sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc tình trạng trung gian qua PD-1.

Đặc biệt, bệnh hoặc tình trạng là ung thư, đặc biệt hơn là ung thư với biểu hiện cao của PD-L1, và ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ung thư phổi, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư da, ung thư bàng quang, ung thư ruột kết, ung thư vú, u thần kinh đệm, ung thư thận, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, ung thư biểu mô tế bào vảy miệng, và ung thư đầu và cổ; đặc biệt hơn ung thư là ung thư vú, ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết, ung thư thận hoặc khối u ác tính; đặc biệt nhất ung thư là ung thư phi tiểu bào phổi, khối u ác tính hoặc ung thư thận.

Đặc biệt, bệnh là một bệnh lây nhiễm, ví dụ, nhiễm virus mãn tính, nhiễm vi khuẩn hoặc nhiễm ký sinh trùng, và đặc biệt hơn bệnh truyền nhiễm là HIV, HBV hoặc HCV.

Đặc biệt, trong sản xuất thuốc điều trị ung thư hoặc các bệnh truyền nhiễm, kháng thể kháng PD-1 làm giống người hoặc khảm được sử dụng; đặc biệt hơn là, kháng thể kháng PD-1 làm giống người được sử dụng.

Kháng thể đề xuất bởi sáng chế có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với tác nhân trị liệu hoặc phương pháp trị liệu khác: ví dụ, tác nhân chống ung thư hoặc tác nhân miễn dịch (ví dụ, kháng nguyên khối u), tế bào trình diện kháng nguyên (e.g., tế bào đuôi gai được kích thích với kháng nguyên hoặc axit nucleic có nguồn gốc từ khối u), xytokin kích thích miễn dịch (ví dụ, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), và tế bào được chuyển nạp với gen mã hóa xytokin kích thích miễn dịch (ví dụ, bao gồm nhưng không giới hạn ở GM-CSF); phương pháp điều trị ung thư tiêu chuẩn (ví dụ, hóa trị, xạ trị hoặc phẫu thuật); hoặc các kháng thể khác (bao gồm nhưng không giới hạn ở kháng thể chống lại VEGF, EGFR, HER2/neu, thụ thể VEGF hoặc thụ thể của nhân tố sinh

trường khác, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, hoặc ICOS).

So với Keytruda và Opdivo được sử dụng trong điều trị lâm sàng, kháng thể kháng PD-1 làm giống người được đề xuất bởi sáng chế không chỉ có ái lực liên kết PD-1 cao hơn, với hằng số ái lực K_D nhỏ hơn 1 pM, mà còn có tính đặc hiệu mạnh. Dữ liệu kháng khối u *in vivo* đã chỉ ra rằng kháng thể làm giống người được đề xuất bởi sáng chế ức chế đáng kể sự phát triển của khối u cấy ghép ở chuột chuyển gen, và thậm chí loại bỏ hoàn toàn khối u ở một số chuột. Hơn nữa, kháng thể của sáng chế được biểu hiện trong tế bào CHO, và có các ưu điểm như năng suất cao, hoạt động cao, quy trình tinh chế đơn giản và chi phí sản xuất thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Xác định sự liên kết của AB12N1 và AB12M1 với PD-1 của người bằng ELISA.

Fig. 2-1: Xác định phản ứng chéo của AB12N1 và AB12M1 với PD-1 của khỉ cynomolgus và ICOS của người bằng ELISA.

Fig. 2-2: Xác định phản ứng chéo của AB12N1 và AB12M1 với CTLA4 của người bằng ELISA.

Fig. 2-3: Xác định phản ứng chéo của AB12N1 và AB12M1 với CD28 của người bằng ELISA.

Fig. 3: Xác định khả năng của AB12N1 và AB12M1 để phong tỏa liên kết PD-1/PD-L1 của người bằng ELISA cạnh tranh.

Fig. 4: Phân tích định tính AB12N1 và AB12M1 bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử.

Fig. 5: Xác định giá trị EC_{50} và tính đặc hiệu của AB12M2, AB12M3 và AB12M4 bằng ELISA.

Fig. 6: Xác định phản ứng chéo của AB12M2, AB12M3 và AB12M4 với PD-1 của chuột bằng ELISA.

Fig. 7: Xác định ái lực của AB12M2, AB12M3, AB12M4 liên quan đến Keytruda bằng ELISA cạnh tranh.

Fig. 8: Xác định ái lực của AB12M2, AB12M3, AB12M4 liên quan đến Opdivo

bằng ELISA cạnh tranh.

Fig. 9: AB12M3 và AB12M4 liên kết với tế bào CHO biểu hiện quá mức PD-1.

Fig. 10: AB12M3 và AB12M4 liên kết với tế bào T của người được hoạt hóa.

Fig. 11: AB12M3 và AB12M4 thúc đẩy tăng sinh tế bào T theo cách phụ thuộc nồng độ.

Fig. 12: AB12M3 và AB12M4 thúc đẩy tiết IFN- γ theo cách phụ thuộc nồng độ.

Fig. 13: AB12M3 và AB12M4 thúc đẩy tiết IL-2 bởi tế bào T.

Fig. 14: AB12M4 ức chế sự phát triển khối u ở chuột.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chữ viết tắt và định nghĩa

hPD-1, protein PD-1 ở người;

CDR, vùng xác định bổ sung của vùng biến đổi của globulin miễn dịch, được xác định bởi sơ đồ đánh số Kabat;

EC₅₀, nồng độ của kháng thể mang lại liên kết nửa tối đa;

ELISA, xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym;

FR, vùng khung kháng thể, vùng biến đổi của globulin miễn dịch không bao gồm các vùng CDR;

HRP, peroxidaza củ cải đen;

IL-2, interleukin 2;

IFN, interferon;

IC₅₀, nồng độ của chất ức chế mang lại sự ức chế 50%;

IgG, globulin miễn dịch G;

Kabat, sơ đồ đánh số và căn chỉnh của globulin miễn dịch chủ trương bởi Elvin A Kabat;

mAb, kháng thể đơn dòng;

PCR, phản ứng chuỗi polymeraza;

V vùng, đoạn trình tự biến đổi của IgG trong số các kháng thể khác nhau, bao gồm gốc Kabat vị trí từ 1 đến 109 trong chuỗi nhẹ và gốc Kabat vị trí từ 1 đến 113 trong chuỗi nặng;

V_H , vùng biến đổi của chuỗi nặng globulin miễn dịch;

V_K , vùng biến đổi của chuỗi nhẹ κ globulin miễn dịch;

K_D , hằng số phân ly cân bằng;

k_a , hằng số tỷ lệ liên kết;

k_d , hằng số tỷ lệ phân ly.

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng ở đây bao gồm các kháng thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG₁ hoặc IgG₄), các đoạn chức năng khác nhau của chúng (ví dụ, có thể chỉ bao gồm các gốc liên kết kháng nguyên, (ví dụ đoạn Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và các kháng thể biến đổi (ví dụ, được làm giống người, glycosylat hóa, v.v). Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng PD-1 với những biến đổi bởi sự glycosylat hóa hoặc khử glycosylat hóa. Trong một số ứng dụng, sự biến đổi được thực hiện bằng cách loại bỏ các vị trí glycosylat hóa không mong muốn, chẳng hạn như sự biến đổi bằng cách loại bỏ fucose từ chuỗi oligosacarit để tăng cường chức năng gây độc tế bào trung gian qua tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC); trong ứng dụng khác, sự biến đổi galactosylat hóa được thực hiện để thay thế hoạt động gây độc tế bào phụ thuộc bổ xung trung gian qua kháng thể (complement dependent cytotoxicity - CDC).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng hoặc mAb" đề cập đến kháng thể thu được từ chủng đơn dòng, không giới hạn ở các tế bào nhân chuẩn, tế bào nhân sơ hoặc thực khuẩn thể. Kháng thể đơn dòng hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên có thể thu được sử dụng, ví dụ, kỹ thuật lai, kỹ thuật tái tổ hợp, kỹ thuật bọc lộ trên thực khuẩn thể, kỹ thuật cấu thành (ví dụ, ghép CDR), hoặc kết hợp một số kỹ thuật hiện hành, v.v.

Thuật ngữ "đoạn kháng thể" và "đoạn liên kết kháng nguyên" đề cập đến đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc tương đồng kháng thể, thường bao gồm ít nhất một phần của vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi (ví dụ, một hoặc nhiều CDR) của kháng thể bố mẹ. Đoạn kháng thể giữ lại ít nhất một số tính đặc tính liên kết của kháng thể bố mẹ. Thông thường, đoạn kháng thể giữ lại ít nhất 10% hoạt

tính liên kết của bố mẹ khi hoạt tính được biểu hiện ở chuột chũi. Hơn nữa, đoạn kháng thể giữ lại ít nhất 20%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 100% hoặc hơn ái lực liên kết của kháng thể bố mẹ với đích. Ví dụ về đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đoạn Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; kháng thể đôi; kháng thể tuyến tính; phân tử kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, scFv và UniBody (Genmab); vật thể nano (Ablynx); kháng thể vùng (Domantis); và kháng thể đa hiệu được hình thành bởi các đoạn kháng thể. Để xem xét các thể biến dị kháng thể được thiết kế, xem Holliger et al., 2005, Nat Biotechnol, 23:1126-1136.

Thuật ngữ "đoạn Fab" bao gồm chuỗi nhẹ và vùng C_{H1} và vùng biến đổi của chuỗi nặng. Chuỗi nặng của phân tử Fab có thể không hình thành liên kết disulfit với chuỗi nặng của phân tử Fab khác.

Thuật ngữ vùng "Fc" bao gồm hai đoạn chuỗi nặng, mỗi đoạn chứa vùng C_{H2} và C_{H3} của kháng thể. Hai đoạn chuỗi nặng được cố định với nhau bởi hai hay nhiều liên kết disulfit liên chuỗi và tương tác kỵ nước liên vùng C_{H3}.

Thuật ngữ "đoạn Fab'" bao gồm vùng VH, C_{H1} của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và vùng cố định giữa vùng C_{H1} và C_{H2}, và do đó hai chuỗi nặng của hai đoạn Fab' có thể hình thành liên kết disulfit liên chuỗi để tạo thành phân tử F(ab')₂.

Thuật ngữ "đoạn F(ab')₂" bao gồm các vùng VH, C_{H1} của hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, và các vùng cố định giữa vùng C_{H1} và C_{H2}, do đó hình thành liên kết disulfit liên chuỗi giữa hai chuỗi nặng. Do đó, đoạn F(ab')₂ bao gồm hai đoạn Fab' được cố định với nhau bởi liên kết disulfit giữa hai chuỗi nặng.

Thuật ngữ vùng "Fv" bao gồm vùng biến đổi từ cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, nhưng thiếu vùng cố định.

Thuật ngữ "kháng thể Fv chuỗi đơn" (hoặc "kháng thể scFv") đề cập đến đoạn kháng thể bao gồm vùng VH và VL của kháng thể, trong đó các vùng này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Để đánh giá scFv, xem Plückthun, 1994, The pharmacology of monoclonal antibodies, Rosenberg M and Moore GP, eds, Vol. 113, pp 269-315, Springer Verlag, New York. Cũng xem công bố đơn xin cấp patent quốc tế số WO 88/01649 và U.S. Patent No. 4,946,778 và 5,260,203.

Thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên" là đoạn globulin miễn dịch có chức

năng miễn dịch chứa chỉ vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" được sử dụng ở đây đề cập đến gốc axit amin của kháng thể chịu trách nhiệm cho liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm gốc axit amin sau: gốc axit amin từ "vùng xác định bổ xung" hoặc "CDRs" (complementarity determining regions – CDRs), được xác định bởi trình tự dạng thẳng, gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2), và 89-97 (L3) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và gốc 31-35 (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) của vùng biến đổi chuỗi nặng, xem Kabat EA et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.; và/hoặc gốc axit amin từ "vùng siêu biến" (hypervariable loops - HVL), được xác định bởi cấu trúc, gốc 26-32 (L1), 50-52 (L2), và 91-96 (L3) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và gốc 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) của vùng biến đổi chuỗi nặng, xem Chothia C and Leskl, 1987, J Mol Biol, 196:901-917.

Thuật ngữ gốc "vùng khung" (framework region - FR) đề cập đến gốc trong vùng biến đổi residues refer to the residues in a variable region ngoại trừ gốc trong vùng siêu biến được xác định ở đây.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" là kháng thể hợp nhất vùng biến đổi của kháng thể chuột với vùng cố định của kháng thể người để giảm đáp ứng miễn dịch gây ra bởi kháng thể chuột. Để tạo ra kháng thể khảm, cần thiết để phát triển tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng chuột đặc hiệu. Sau đó gen vùng cố định được tách dòng từ tế bào lai của chuột, và gen vùng cố định của kháng thể người được tách dòng khi cần thiết. Gen vùng biến đổi của chuột và gen vùng cố định của người được gắn vào gen khảm. Gen khảm được chèn vào vector, và cuối cùng được biểu hiện trong hệ thống biểu hiện tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn để sản xuất kháng thể khảm. Trong phương án được ưu tiên của sáng chế, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể PD-1 khảm cũng bao gồm vùng FR chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ thuộc chuột hoặc thể biến dị của chúng. Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể PD-1 khảm cũng bao gồm vùng FR chuỗi nặng của IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ thuộc chuột, hoặc thể biến dị của chúng. Vùng cố định của kháng thể PD-1 khảm có thể được chọn từ vùng cố định của IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ thuộc người, hoặc thể biến dị của chúng, đặc biệt là vùng cố định IgG₂ hoặc IgG₄ thuộc người, hoặc vùng cố định IgG₁ mà không có tính độc ADCC (tính gây độc tế bào trung gian qua tế

bào phụ thuộc kháng thể) sau khi đột biến axit amin.

Thuật ngữ "phân tử đặc hiệu kép" nghĩa là kháng thể kháng PD-1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng của sáng chế có thể được tạo dẫn xuất hoặc gắn vào phân tử chức năng khác, chẳng hạn protein hoặc peptit khác (ví dụ, kháng nguyên, xytokin, và thụ thể bề mặt tế bào liên quan đến khối u) để sản xuất phân tử đặc hiệu kép liên kết với ít nhất hai vị trí liên kết hoặc phân tử đích khác nhau. Để tạo ra phân tử đặc hiệu kép của sáng chế, kháng thể của sáng chế có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách ghép đôi hóa học, dung hợp gen, tương tác không cộng hóa trị hoặc cách khác) với một hoặc nhiều phân tử liên kết khác, chẳng hạn kháng thể khác, đoạn kháng thể, peptit, hoặc mô phỏng liên kết, do đó tạo ra phân tử đặc hiệu kép. Ví dụ, thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" nghĩa là hai vùng biến đổi hoặc đơn vị scFv khác nhau được liên kết với nhau kết quả là kháng thể nhận diện hai kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ "liên kết miễn dịch" hoặc "đặc tính liên kết miễn dịch" được sử dụng ở đây đề cập đến các tương tác không cộng hóa trị xảy ra giữa phân tử globulin miễn dịch và kháng nguyên đặc hiệu cho phân tử globulin miễn dịch. Độ bền liên kết hoặc ái lực của tương tác liên kết miễn dịch có thể được biểu thị bằng hằng số phân ly cân bằng (equilibrium dissociation constant - K_D) cho tương tác, trong đó giá trị K_D càng nhỏ thì ái lực càng cao. Đặc tính liên kết miễn dịch của polypeptit có thể được định lượng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Một phương pháp liên quan đến việc đo tỷ lệ các phức hợp đôi tác liên kết kháng nguyên /kháng nguyên được hình thành và phân ly. Cả "hằng số tỷ lệ liên kết" (K_a hoặc K_{on}) và "hằng số tỷ lệ phân ly" (K_d hoặc K_{off}) có thể được tính toán với nồng độ và tỷ lệ thực tế của sự liên kết và phân ly (xem Malmqvist M, 1993, Nature, 361:186-187). Tỷ lệ K_d/K_a bằng với hằng số phân ly K_D (xem Davies et al., 1990, Annual Rev Biochem, 59:439-473). Giá trị K_D , k_a và k_d có thể được đo bằng bất kỳ phương pháp hiệu quả nào. Trong phương án được ưu tiên khác, hằng số phân ly cân bằng được xác định bằng cách sử dụng nguyên lý giao thoa quang học (ví dụ, thiết bị Octet của Pall ForteBio được miêu tả trong ví dụ 3.4). Trong phương án được ưu tiên khác, hằng số phân ly cân bằng có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, Biacore) hoặc xét nghiệm dựa trên KinExA. Kháng thể của sáng chế được coi là có khả năng liên kết đặc hiệu với epitop PD-1, trong đó hằng số phân ly cân bằng $K_D \leq 10 \mu M$, tốt là $\leq 100 \text{ nM}$, tốt hơn là $\leq 10 \text{ nM}$, và tốt nhất là $\leq 100 \text{ pM}$ đến khoảng 1 pM .

Kháng thể tương đồng

Ở khía cạnh khác, vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của sáng chế bao gồm trình tự axit amin tương đồng với các kháng thể được ưu tiên mô tả ở đây, trong khi kháng thể giữ lại các đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể kháng PD-1 của sáng chế.

Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể liên kết PD-1 làm giống người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 80% trình tự axit amin đồng nhất với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, và 29; tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự axit amin đồng nhất với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, và 29; (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 80% trình tự axit amin đồng nhất với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, và 30; tốt hơn là, vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự axit amin đồng nhất với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, hoặc 30.

Kháng thể biến đổi bảo toàn

Thuật ngữ "biến đổi bảo toàn" nghĩa là biến đổi axit amin không ảnh hưởng hoặc thay đổi đáng kể đặc tính liên kết của kháng thể chứa trình tự axit amin. Sự biến đổi bảo toàn này gồm sự thay thế, thêm và mất axit amin. Sự biến đổi có thể được đưa vào các kháng thể của sáng chế bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn được biết trong lĩnh vực này, chẳng hạn gây đột biến định hướng điểm và gây đột biến trung gian qua PCR. Sự thay thế axit amin bảo toàn đề cập đến sự thay thế thay đổi axit amin bằng axit amin khác với chuỗi bên tương tự. Các họ bao gồm các axit amin với chuỗi bên tương tự đã được mô tả chi tiết trong sáng chế. Các họ bao gồm các axit amin với chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), chuỗi bên phân cực không mang điện (ví dụ, glycin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein, tryptophan), chuỗi bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), chuỗi bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin), và chuỗi bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do

đó, một hay nhiều gốc axit amin trong vùng CDR của kháng thể của sáng chế có thể được thay thế bằng gốc axit amin từ họ chuỗi bên tương tự.

Trong một số phương án, kháng thể của sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó một hoặc nhiều trình tự CDR chứa trình tự axit amin đặc hiệu dựa vào kháng thể được ưu tiên (ví dụ AB12M1 hoặc AB12N1) được miêu tả ở đây hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng, và kháng thể giữ lại các đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể kháng PD-1 của sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể liên kết PD-1 được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3, trong đó: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 1 hoặc 2 hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 3 hoặc 4 hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 5 hoặc 6 hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng; và/hoặc (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 7 hoặc 8 hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 9 hoặc 10 hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 11 hoặc 12 hoặc sự biến đổi bảo toàn của chúng.

Cách sử dụng kháng thể kháng PD-1 trong điều trị

Kháng thể của sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép, đa dòng, đơn dòng và làm giống người, và có thể được sử dụng như tác nhân trị liệu. Các tác nhân này có thể được sử dụng phổ biến để điều trị hoặc ngăn ngừa ung thư ở đối tượng, tăng hiệu quả vacxin hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch bẩm sinh. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể của sáng chế liên kết đặc hiệu với protein PD-1 có thể được sử dụng dưới dạng dược phẩm để điều trị ung thư hoặc bệnh lây nhiễm mãn tính.

Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể của sáng chế thường liên quan đến lượng cần thiết để đạt được mục tiêu điều trị. Như đã lưu ý ở trên, nó có liên quan đến

sự tương tác liên kết giữa kháng thể và kháng nguyên đích của nó. Lượng dùng không chỉ phụ thuộc vào ái lực liên kết của kháng thể đối với kháng nguyên đặc hiệu của nó mà còn phụ thuộc vào đặc tính dược động học của kháng thể trong đối tượng. Trong ví dụ không giới hạn, khoảng liều lượng điều trị có hiệu quả của kháng thể và đoạn kháng thể của sáng chế có thể từ khoảng 0.1 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 50 mg/kg trọng lượng cơ thể. Tần suất sử dụng thông thường có thể là, ví dụ, từ hai lần một ngày đến một lần một tuần.

Trong trường hợp sử dụng đoạn kháng thể, đoạn ức chế tối thiểu liên kết đặc hiệu với vùng liên kết của protein đích được ưu tiên, ví dụ, đoạn dựa trên trình tự vùng biến đổi của kháng thể và duy trì khả năng liên kết với protein đích. Các peptide này có thể được tổng hợp hóa học và/hoặc điều chế bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, Marasco et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90:7889-7893). Tùy thuộc vào chỉ định điều trị cụ thể, công thức cũng có thể chứa nhiều hơn một hợp chất hoạt động, tốt nhất là các hợp chất không có tác dụng phụ với nhau nhưng có hoạt động bổ sung. Ngoài ra, thành phần có thể chứa các tác nhân giúp tăng cường chức năng của nó, ví dụ, tác nhân gây độc tế bào, xytokin, tác nhân hóa trị hoặc các chất ức chế tăng trưởng. Ung thư

Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của sáng chế có thể được sử dụng để điều trị ung thư, tức là, để ức chế sự tăng trưởng và tồn tại của tế bào khối u. Sự tăng trưởng của các bệnh ung thư được ưu tiên có thể bị ức chế bằng cách sử dụng kháng thể của sáng chế, bao gồm kháng thể đáp ứng bình thường với liệu pháp miễn dịch. Các ví dụ không giới hạn của các bệnh ung thư được ưu tiên bao gồm u ác tính (ví dụ, khối u di căn ác tính), ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào sạch), ung thư tuyến tiền liệt (ví dụ, ung thư tuyến tiền liệt kháng hormone), ung thư tuyến tụy, ung thư vú, ung thư ruột kết, ung thư phổi (ví dụ, ung thư phi tiểu bào phổi), ung thư thực quản, ung thư biểu mô tế bào vảy ở đầu và cổ, ung thư gan, ung thư buồng trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư tuyến giáp, u nguyên bào thần kinh đệm, u thần kinh đệm, bệnh bạch cầu, u bạch huyết và các khối u ác tính khác.

Bệnh lây nhiễm

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể của sáng chế có thể cũng được sử dụng để phòng chống và điều trị nhiễm trùng và bệnh lây nhiễm. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với vacxin để kích thích phản ứng miễn dịch

chống lại mầm bệnh, độc tố và tự kháng nguyên. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng để kích thích phản ứng miễn dịch với virus gây bệnh truyền nhiễm cho người, và ví dụ của các virus gây bệnh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, HIV, virus viêm gan (A, B hoặc C), virus ecpet (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, CMV, và virus Epstein-Barr), adenovirus, virus cúm, flavivirus, echovirus, rhinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus hợp bào đường hô hấp, virus quai bị, rotavirus, virus sởi, virus rubella, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus sốt xuất huyết, papillomavirus, virus nhuỷên thể, virus bại liệt, virus dại, virus JC và virus viêm não thuộc arbovirus. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng có thể cũng được sử dụng để kích thích phản ứng miễn dịch với nhiễm trùng do vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng hoặc mầm bệnh khác.

Thuốc bổ trợ miễn dịch

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với protein tái tổ hợp và/hoặc peptit khác (ví dụ, kháng nguyên khối u hoặc tế bào ung thư) để tăng cường đáp ứng miễn dịch với các protein này, tức là, được sử dụng trong chế độ tiêm chủng.

Ví dụ, kháng thể kháng PD-1 và đoạn kháng thể của chúng có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên bằng việc đồng sử dụng kháng thể kháng PD-1 và kháng nguyên đích (ví dụ, vaccin). Do đó, khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng với kháng nguyên, trong đó bao gồm việc sử dụng với đối tượng (i) kháng nguyên và (ii) kháng thể kháng PD-1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của sáng chế để tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng với kháng nguyên. Ví dụ, kháng nguyên có thể là kháng nguyên khối u, kháng nguyên virus, kháng nguyên vi khuẩn, hoặc kháng nguyên từ mầm bệnh. Ví dụ không giới hạn của các kháng nguyên này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng nguyên khối u hoặc kháng nguyên từ virus, vi khuẩn hoặc các mầm bệnh khác.

Cách sử dụng kháng thể và đoạn kháng thể của sáng chế không trong điều trị

Sản phẩm kháng thể kháng PD-1 không điều trị đã tồn tại, ví dụ, kháng thể đơn dòng kháng hPD-1 J116 và J105 được bán bởi eBioscience của San Diego, CA, Hoa Kỳ cho phương pháp phân tích tế bào theo dòng, hóa mô miễn dịch, hóa mô miễn dịch,

và phân tích chức năng in vitro, và ví dụ, kháng thể đơn dòng kháng hPD-1 MAB1086 được bán bởi hệ thống R & D của Minneapolis, MN, USA cho phương pháp phân tích tế bào theo dòng, thấm tách Western, và ELISA. Kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng cho bất kì mục đích phi điều trị nào được cung cấp bởi J116, J105 và/hoặc MAB1086 hiện nay.

Kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng như thuốc thử tinh chế ái lực.

Kháng thể có thể được sử dụng trong các xét nghiệm chẩn đoán, ví dụ, để phát hiện sự biểu hiện của PD-1 trong các tế bào, mô hoặc huyết thanh đặc hiệu. Đối với các ứng dụng chẩn đoán, kháng thể có thể được đánh dấu trực tiếp hoặc gián tiếp với các gốc có thể phát hiện được. Nhiều chỉ thị có thể được sử dụng, thường được phân thành các loại sau: biotin, thuốc nhuộm huỳnh quang, nucleotit phóng xạ, enzym, iôt và chỉ thị sinh tổng hợp.

Kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng trong bất kỳ xét nghiệm đã biết nào, chẳng hạn xét nghiệm liên kết cạnh tranh, xét nghiệm bánh kẹp (sandwich) trực tiếp và gián tiếp và xét nghiệm kết tủa miễn dịch (Zola H, 1987, Monoclonal antibodies: a manual of techniques, pp 147-158, CRC Press, Inc.).

Kháng thể có thể được sử dụng trong các xét nghiệm chẩn đoán in vivo. Kháng thể thường được đánh dấu với các nucleotit phóng xạ (ví dụ, ^{111}In , ^{99}Tc , ^4C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{18}F) để các kháng nguyên hoặc tế bào biểu hiện kháng nguyên có thể được định vị bằng hình ảnh immunoscintigraphy hoặc pozitron.

Sự sản xuất kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies - mAbs) của sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật bao gồm các phương pháp kháng thể đơn dòng thông thường như các kỹ thuật lai soma tiêu chuẩn được mô tả trong Kohler G and Milstein C, 1975, Nature, 256:495. Mặc dù quy trình lai tế bào soma được ưa tiên, các phương pháp khác để điều chế các kháng thể đơn dòng, như bắt từ tế bào B trung gian qua virus, cũng có thể được sử dụng trên nguyên lý.

Hệ thống động vật được ưu tiên để điều chế khối tế bào lai là hệ thống của chuột. Điều chế khối tế bào lai sử dụng chuột là quy trình đã có từ lâu. Quy trình và kỹ thuật miễn dịch để phân lập tế bào lá lách được gây miễn dịch để dung hợp được biết đến

trong lĩnh vực này. Đối tác dung hợp chẳng hạn tế bào u tủy chuột và quy trình dung hợp cũng đã được biết.

Để biểu hiện kháng thể hoặc đoạn kháng thể của chúng, trình tự ADN mã hóa một phần hoặc toàn bộ chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể thu được bằng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, ví dụ, khuếch đại PCR hoặc tách dòng cADN bằng cách sử dụng tế bào lai biểu hiện kháng thể đích, và chèn vào vector biểu hiện sao cho gen đích được liên kết hoạt động với các trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã. Vector thiết kế được chuyển nạp vào tế bào chủ để biểu hiện protein, và tế bào chủ tốt là tế bào nhân chuẩn, tốt hơn là tế bào động vật có vú, chẳng hạn tế bào CHO và dòng tế bào có nguồn gốc CHO.

Kháng thể được tinh sạch bằng các kỹ thuật đã biết, chẳng hạn sắc ký ái lực sử dụng Protein A hoặc Protein G. Sau đó hoặc thay thế, kháng nguyên hoặc epitop đặc hiệu của chúng có thể được cố định trên cột để tinh chế kháng thể đặc hiệu miễn dịch bằng sắc ký ái lực miễn dịch. Tinh chế globulin miễn dịch đã được mô tả bởi Wilkinson D (The Scientist, 2000, Vol 14, No. 8, pp 25-28, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA).

Kháng thể khảm hoặc kháng thể làm giống người của sáng chế có thể được điều chế dựa trên trình tự của kháng thể đơn dòng chuột được điều chế như mô tả nêu trên. Trình tự ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được thu từ khối tế bào lai của chuột đích và được thiết kế để bao gồm trình tự globulin miễn dịch không phải của chuột (ví dụ, người) sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Ví dụ, để tạo ra kháng thể khảm, vùng biến đổi của chuột có thể được liên kết vùng cố định của người sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, U.S. Patent No. 4,816,567 bởi Cabilly và cộng sự). Trình tự ADN được phân lập mã hóa vùng VH có thể được chuyển đổi thành gen chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết hoạt động trình tự ADN của VH với trình tự ADN khác mã hóa vùng cố định của chuỗi nặng (C_{H1} , C_{H2} và C_{H3}). Trình tự gen vùng cố định chuỗi nặng của người được biết đến trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Kabat EA et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), và đoạn ADN của vùng cố định này có thể được thu bằng khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng cố định chuỗi nặng có thể là vùng cố định của IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM hoặc IgD, nhưng tốt nhất là vùng cố

định của IgG₁ hoặc IgG₄.

Để tạo ra kháng thể làm giống người, trình tự vùng CDR của chuột có thể được chèn vào trình tự vùng khung của người sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem U.S. Patent No. 5,225,539 bởi Winter và U.S. Patent No. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 bởi Queen và cộng sự). Ngoài ra, động vật chuyển gen có thể cũng được sử dụng cho làm giống người kháng thể, ví dụ, chuột HuMAb (Medarex Inc.), bao gồm tiểu locut của gen globulin miễn dịch mã hóa trình tự globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ κ và chuỗi nặng μ và γ chưa được sắp xếp lại, cùng với đột biến được nhắm đích làm bất hoạt locut của chuỗi μ và κ nội sinh (xem, ví dụ, Lonberg et al., 1994, Nature, 368:856-859); hoặc chuột KM, mang gen chuyển chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển chuỗi nhẹ của người (xem patent WO02/43478). Phương pháp khác để làm giống người kháng thể bao gồm công nghệ bộc lộ trên thực khuẩn thể.

Sáng chế sẽ được minh họa thêm bằng các ví dụ sau, mà không nên được hiểu là những hạn chế thêm trong phạm vi của sáng chế. Tất cả các bản vẽ, tài liệu tham khảo, patent và patent được công bố được trích dẫn xuyên suốt ứng dụng này đều được kết hợp rõ ràng ở đây bằng cách tham khảo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng PD1 của người thuộc chuột

Gây miễn dịch đa điểm chuột BALB/c đực với 50 μ g đoạn vùng ngoại bào của người được tinh chế (Sino Biological Inc., Beijing, China) nhũ hóa với tá được hoàn toàn của Freund. Chu kỳ miễn dịch là ba tuần một lần. Vào ngày thứ 10 sau lần gây miễn dịch thứ ba, thu thập máu thông qua hốc mắt để đánh giá hiệu giá kháng thể kháng PD-1 trong huyết tương bằng ELISA để theo dõi mức độ đáp ứng miễn dịch ở chuột. Tăng cường ba ngày một lần trước khi dung hợp với chuột có hiệu giá kháng thể kháng PD-1 của người cao nhất. Sau đó hy sinh chuột để phân lập tế bào lá lách và dung hợp với tế bào u tủy của chuột Sp2/0. Để dung hợp, trộn 2×10^8 tế bào Sp2/0 với 2×10^8 tế bào lá lách trong dung dịch chứa 50% polyetylen glycol (khối lượng phân tử: 1450) và 5% dimetylsulfoxit (DMSO). Điều chỉnh số lượng tế bào lá lách đến 5×10^5 /mL bằng môi trường của Iscove (chứa 10% huyết thanh bào thai bò, 100 đơn vị/mL penixilin, 100 μ g/mL streptomycin, 0,1 mM hypoxantin, 0,4 μ M aminopterin,

và 16 μM tymidin). Đặt đĩa nuôi cấy 96 lỗ với 0,3 mL dịch huyền phù tế bào vào tủ ấm 37 °C, 5% CO₂. Sau 10 ngày ủ, sử dụng phần dịch nổi nuôi cấy tế bào lai để cạnh tranh với PD-L1-Fc của người được đánh dấu bằng biotin để liên kết với PD-1 bằng ELISA như trong ví dụ 3.2. Xác định tám dòng tế bào lai dương tính cạnh tranh cao. Tái tách dòng dòng tế bào, sàng lọc và xác định lại kháng thể chuột được tinh chế từ phần dịch nổi. Thu được hai dòng tế bào đơn dòng lai dương tính #22 và #32.

Ví dụ 2: Xác định giá trị EC₅₀ của kháng thể kháng PD-1 thuộc chuột bằng ELISA

Xác định giá trị EC₅₀ của kháng thể đơn dòng chuột tinh chế từ phần dịch nổi nuôi cấy của chủng tế bào lai #22 và #32 bằng ELISA. Đặt tên kháng thể đơn dòng tiết bởi chủng tế bào lai #22 và #32 lần lượt là AB12N1 và AB12M1. Pha loãng PD-1 người (Sino Biological Inc., Beijing, China) xuống 0,1 $\mu\text{g/mL}$ với đệm PBS, và bổ sung 100 μL /lỗ vào đĩa 96 lỗ và đặt ở nhiệt độ 4 °C trong 16-20 giờ. Hút đệm PBS từ đĩa 96 lỗ, và rửa một lần với PBST (PBS chứa 0,05% Tween 20, pH 7,4). Bổ sung 200 μL PBST/1% sữa không béo vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ để phong tỏa. Loại bỏ dung dịch phong tỏa và rửa 3 lần với PBST. Pha loãng kháng thể kháng PD-1 chuột được kiểm tra với PBST/1% sữa không béo đến nồng độ thích thích hợp. Bổ sung 100 μL kháng thể kháng PD-1 vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Loại bỏ dung dịch phản ứng và rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 50 μL kháng thể thứ cấp kháng IgG chuột ở dê được đánh dấu bằng HRP (Phòng thí nghiệm Jackson) được pha loãng với PBST/1% sữa không béo (tỷ lệ pha loãng 1:4000) vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 100 μL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) vào mỗi lỗ và hiện màu bằng cách ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10-30 phút. Bổ sung 50 μL axit sulfuric 0,2 M vào mỗi lỗ để kết thúc phản ứng. Đo giá trị hấp thụ (O.D.) ở bức sóng kép 450/620 nm trong máy đọc vi thể và tính toán giá trị EC₅₀.

Như được thể hiện trong Fig. 1, kháng thể đơn dòng chuột AB12N1 và AB12M, được biểu hiện lần lượt bởi dòng tế bào lai #22 và #32, có thể liên kết với PD-1. Giá trị EC₅₀ hoặc hoạt tính liên kết kháng nguyên của AB12M1 là khoảng 0,002 $\mu\text{g/mL}$, và của AB12N1 là khoảng 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Ví dụ 3: Sàng lọc và xác định kháng thể đơn dòng kháng PD-1 ở chuột

3.1. Xác định đặc tính liên kết của kháng thể kháng PD-1 ở chuột

Để xác định hoạt tính liên kết đặc hiệu của kháng thể kháng PD-1 với protein khác trong họ PD-1, sử dụng CTLA4 người, CD28 người, và ICOS người để kiểm tra. Trong khi đó, để xác định sự khác biệt liên kết của kháng thể kháng PD-1 của chuột với PD-1 của các loài khác ngoài PD-1 người, sử dụng PD-1 từ chuột và khỉ cynomolgus để kiểm tra.

Pha loãng PD-1/His người, ICOS/Fc người, CTLA4/His người, CD28/Fc người, PD-1/Fc khỉ cynomolgus, và PD-1/His chuột (tất cả từ Sino Biological Inc., Beijing, China) với đệm PBS đến 0,1 µg/mL, và bổ sung 100 µL/lỗ vào đĩa 96 lỗ và đặt ở nhiệt độ 16 °C trong 16 đến 20 giờ. Hút đệm PBS từ đĩa 96 lỗ, và rửa đĩa 1 lần với PBST (PBS chứa 0,05% Tween 20, pH 7,4). Bổ sung 200 µL PBST/1% sữa không béo vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ để phong tỏa. Loại bỏ dung dịch phong tỏa và rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 100 µL kháng thể kháng PD-1 được kiểm tra vào mỗi lỗ, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1,5 giờ. Loại bỏ dung dịch phản ứng và rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 50 µL kháng thể thứ cấp kháng IgG chuột ở dê được đánh dấu bằng HRP (Phòng thí nghiệm Jackson) pha loãng (tỷ lệ pha loãng 1:4000) vào mỗi lỗ. Ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 100 µL TMB vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5-10 phút. Bổ sung 50 µL axit sulfuric 0,2 M vào mỗi lỗ để kết thúc phản ứng. Đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng kép 450/620 nm trong máy đọc khay vi thể.

Như được thể hiện trong Fig.s 2-1 đến 2-3, AB12N1 và AB12M1 không có liên kết đặc hiệu với ba protein khác của họ PD-1. Trong khi đó, AB12N1 và AB12M1 không phản ứng chéo với PD-1 của chuột, nhưng AB12M1 liên kết đặc hiệu với PD-1 của khỉ cynomolgus, mà AB12N1 không liên kết với.

3.2. Kháng thể kháng PD-1 của chuột phong tỏa liên kết của PD-1 với PD-L1

Sử dụng PD-L1 của người được đánh dấu bằng biotin làm thuốc thử. Pha loãng PD-1 của người (Sino Biological Inc., Beijing, China) đến 2,0 µg/mL với đệm PBS, bổ sung 100 µL/lỗ vào đĩa 96 lỗ, và để qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ dung dịch phủ, bổ sung 200 µL PBST/1% sữa không béo vào mỗi lỗ, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Loại bỏ dung dịch phong tỏa và rửa đĩa 3 lần với PBST. Sau đó bổ sung hỗn hợp 50 µL kháng thể đơn dòng ở chuột được pha loãng AB12N1 hoặc

AB12M1 và 50 μ L PD-L1 của người được đánh dấu bằng biotin vào mỗi lỗ, và ủ kỹ. Rửa trôi kháng thể không liên kết và PD-L1 được đánh dấu bằng biotin với PBST. Sau đó bổ sung 100 μ L avidin được đánh dấu bằng HRP vào mỗi lỗ. Sau khi ủ kỹ, rửa trôi avidin được đánh dấu bằng HRP không liên kết với PBST. Bổ sung 100 μ L dung dịch nền TMB vào mỗi lỗ và hiện màu trong 30 phút. Làm nguội phản ứng với axit sulfuric 0,2 M và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng kép 450/620 nm sử dụng máy đọc khay vi thể. Như được thể hiện trong Fig. 3, kháng thể AB12N1 và AB12M1 ở chuột phong tỏa đặc hiệu liên kết của PD-1 với PD-L1, và AB12M1 tốt hơn rõ rệt AB12N1 trong việc phong tỏa liên kết của PD-1 với PD-L1.

3.3. Phân tích SDS-PAGE và xác định Western blot của kháng thể kháng PD-1 ở chuột được tinh chế

Phân tích định tính và bán định lượng kháng thể đơn dòng ở chuột được tinh chế AB12N1 và AB12M1 bằng điện di SDS-PAGE và thấm miễn dịch (thấm tách Western). Chuẩn bị gel SDS-PAGE 12% gel theo công thức, và tải lần lượt 4 μ g kháng thể AB12N1, AB12M1, Keytruda, và Opdivo vào mỗi làn. Chạy gel cho đến khi thuốc nhuộm chạm đến đáy của gel phân giải. Ngắt nguồn điện. Quan sát kết quả điện di sử dụng hệ thống hình ảnh gel. Như được thể hiện trong Fig. 4, trong điều kiện khử, gel SDS-PAGE gel cho thấy hai băng đồng nhất và rõ ràng cho cả hai kháng thể chuột AB12N1 và AB12M1, với lần lượt một băng là chuỗi nặng khoảng 50 kD và băng khác là chuỗi nhẹ khoảng 25 kD. Tải lần như sau: làn 1, chỉ thị; làn 2, AB12N1; làn 3, AB12N1; làn 4, AB12M1; làn 5, AB12M1; làn 6, Keytruda; và làn 7, Opdivo.

Theo công thức tạo gel SDS-PAGE, chuẩn bị gel SDS-PAGE không khử 15%. Tải 5 μ g mẫu PD-1 của người vào gel. Chạy gel cho đến khi thuốc nhuộm chạm đến đáy của gel phân giải. Loại bỏ gel và đặt phẳng trên màng nitrocelluloza có cùng kích thước. Theo diện tích gel, cung cấp nguồn điện ở mức 1mA/cm² was supplied, và truyền điện trong 2 đến 4 giờ. Ngâm màng trong dung dịch phong tỏa và ủ ở 4 °C qua đêm. Rửa màng 3 lần với PBST, mỗi lần 10 phút. Sau đó bổ sung kháng thể AB12N1 or AB12M1 dư thừa và ủ trong 1 giờ. Rửa màng 3 lần với PBST, mỗi lần 10 phút, và sau đó ủ trong 1 giờ với kháng thể thứ cấp Fc kháng IgG chuột của dê được đánh dấu bằng HRP pha loãng ở mức 1:5000. Rửa màng 3 lần với đệm PBST. Hiện màu mà không có ánh sáng trong dung dịch nền DAB trong 15 phút. Tiếp theo là rửa sạch bằng nước để kết thúc phản ứng ngay sau khi băng xuất hiện. Chụp ảnh để phân tích định

tính và bán định lượng.

Kết quả thẩm tách Western cho thấy băng đích PD-1 khoảng 34 kD, chỉ ra rằng cả AB12N1 và AB12M1 liên kết đặc hiệu với PD-1 của người.

3.4. Phân tích động học và xác định ái lực của kháng thể kháng PD-1 thuộc chuột

Chúng tôi sử dụng kỹ thuật giao thoa lớp sinh học (bio-layer interferometry - BLI) để đặc tính hóa động học và ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng thuộc chuột được tinh chế. Theo quy trình tiêu chuẩn, vận hành thiết bị tương tác phân tử Octet (ForteBio Octet RED & QK system, PALL corp.). Sử dụng kháng thể Keytruda và Opdivo như là đối chứng. Đối với phân tích định lượng song song đa kênh, gradient nồng độ của kháng thể được đặt ở 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 và 100 nM, và ghép đôi PD-1 người/His (Sino Biological Inc., Beijing, China) với đầu dò Ni-NTA. Sau đó theo dõi động học liên kết và phân ly của kháng nguyên-kháng thể. Phân tích số liệu để tạo ra giá trị k_a (k_{on}), k_d (k_{off}), và K_D , được thể hiện trong bảng 1. Hằng số phân ly cân bằng K_D giữa kháng thể đơn dòng ở chuột AB12M1 và PD-1 ở người là $<1,00 \times 10^{-12}$ M, được so sánh với kháng thể đối chứng Keytruda và Opdivo. Trong khi đó, giá trị K_D của AB12N1 là $3,51 \times 10^{-10}$ M, chỉ ra rằng ái lực liên kết của nó thấp hơn kháng thể đối chứng Keytruda và Opdivo.

Bảng 1. Xác định hằng số ái lực của kháng thể đơn dòng ở chuột AB12M1 và AB12N1

Kháng thể	K_D (M)	K_a (M/s)	K_d (1/s)
AB12M1	$<1,00E-12$	$1,09E+05$	$<1,00E-07$
AB12N1	$3,51E-10$	$6,92E+04$	$2,08E-05$
Keytruda	$2,05E-12$	$2,48E+05$	$5,08E-07$
Opdivo	$5,60E-12$	$1,92E+05$	$1,07E-06$

Ví dụ 4: Nhận dạng phân lớp và khuếch đại vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng kháng PD-1

Nhận dạng phân lớp kháng thể: Sử dụng bộ tạo lớp kháng thể đơn dòng ở chuột IsoStrip™ (Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-24958), lấy dịch nuôi cấy tế bào lai để nhận dạng phân lớp kháng thể. Phân lớp của kháng thể đơn dòng AB12N1 được nhận định như là IgG₁ (Kappa) và phân lớp của kháng thể đơn dòng AB12M1 là IgG_{2b}

(Kappa).

Khuếch đại vùng biến đổi của kháng thể: Nuôi cấy tế bào lai ứng cử viên #22 hoặc #32 đến tổng số 10^7 tế bào, và thu tế bào bằng ly tâm ở tốc độ 1000 rpm trong 10 phút. Tách chiết ARN tổng số sử dụng bộ TRIzol (Invitrogen). Tạo ra cADN của mạch thứ nhất sử dụng bộ phiên mã ngược SMARTer RACE (Clontech). Sử dụng cADN của mạch thứ nhất làm khuôn, khuếch đại trình tự ADN vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng tiết bởi tế bào lai sau khi thiết kế mồi. Dựa trên kết quả nhận dạng phân lớp, biết được trình tự vùng cố định chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ của phân lớp kháng thể, và thiết kế mồi PCR lồng đặc hiệu theo trình tự. Trình tự mồi sử dụng trong phản ứng khuếch đại là bổ sung với trình tự nucleotit của vùng khung thứ nhất của vùng biến đổi và của vùng cố định của kháng thể. Khuếch đại gen đích bằng phương pháp PCR thông thường và giải trình tự sản phẩm được khuếch đại. Đối với kháng thể AB12N1 tiết bởi dòng tế bào lai #22, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO: 15 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 16. Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRs (CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3) của kháng thể được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 2, 4 và 6, và của chuỗi nhẹ CDRs (CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3) được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 8, 10 và 12. Đối với kháng thể AB12M1 tiết bởi dòng tế bào lai #32, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO: 13 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 14. Trình tự axit amin của chuỗi nặng CDRs (CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3) của kháng thể được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 1, 3 và 5, và của chuỗi nhẹ CDRs (CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3) được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 7, 9 và 11.

Ví dụ 5. Làm giống người kháng thể kháng PD-1 của chuột

Dựa vào trình tự vùng biến đổi của kháng thể AB12N1 và AB12M1 thu được ở trên, thực hiện làm giống người kháng thể sử dụng mô hình ba chiều được hỗ trợ bởi máy tính và phương pháp phân tích cấu trúc của kháng thể. Ghép CDR là phương pháp làm giống người kháng thể phổ biến, duy trì hoạt động trong khi làm giảm khả năng gây miễn dịch của kháng thể chuột bằng cách thay thế gốc FR của kháng thể người với gốc FR thuộc chuột. Phương pháp làm giống người kháng thể sử dụng công cụ phân tích Discovery Studio chủ yếu bao gồm các bước sau: (1) Mô hình hóa cấu trúc ba chiều của kháng thể (2) Phân tích gốc chủ chốt. Phân tích trình tự axit amin của vùng biến đổi và gốc khung xung quanh chúng bằng cách cập bến phân tử, và nghiên

cứu cách liên kết không gian để xác định gốc chủ chốt cần thiết để duy trì cấu hình của vùng CDR. Có ba loại gốc chủ chốt chính: thứ nhất, gốc chủ chốt nằm trên bề mặt chung liên kết giữa vùng V_L và V_H , đóng vai trò quan trọng trong việc cuộn gập của hai vùng; thứ hai, gốc chủ chốt gần vùng CDR và bị chôn vùi trong protein; thứ ba, gốc chủ chốt tương tác trực tiếp với vùng CDR thông qua tương tác kỵ nước, liên kết hydro, và cầu muối. (3) Chọn khuôn kháng thể người. Quy trình chọn lọc bao gồm hai bước sau. Thứ nhất, sắp thẳng hàng trình tự axit amin của kháng thể tiết bởi dòng tế bào lai với trình tự axit amin của kháng thể dòng mầm người để tìm trình tự tương đồng cao ở người. Thứ hai, để làm giảm khả năng gây miễn dịch, chọn trình tự vùng khung của kháng thể dòng mầm người có ái lực liên kết thấp với HLA-DR của MHC II. Và (4) dựa vào sự phân tích của gốc chủ chốt, thực hiện ghép kháng thể chuột vào kháng thể dòng mầm người để thu được trình tự kháng thể làm giống người.

Bằng cách sử dụng trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của người V_{H3-23} và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người V_{K3D-11} làm khuôn, 7 kháng thể làm giống người được thu từ kháng thể chuột AB12M1, là AB12M3, AB12M4, AB12M5, AB12M6, AB12M7, AB12M8, và AB12M9. Trong khi đó, thiết kế kháng thể khảm chuột-người AB12M2. Ghép vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột vào vùng cố định chuỗi nặng IgG_1 của người, và ghép vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột vào vùng cố định chuỗi nhẹ Kappa của người. Trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể làm giống người mô tả ở trên được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bằng cách sử dụng trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của người V_{H3-33} và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người V_{K3-11} làm khuôn, 3 kháng thể làm giống người được thu từ kháng thể chuột AB12N1, là AB12N3, AB12N4, và AB12N5. Trong khi đó, thiết kế kháng thể khảm chuột-người AB12N2. Ghép vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột vào vùng cố định chuỗi nặng IgG_1 của người, và ghép vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột vào vùng cố định chuỗi nhẹ Kappa của người. Trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể làm giống người mô tả ở trên được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Kháng thể làm giống người AB12M3, AB12M4, AB12M5, AB12M6, AB12M7, AB12M8 và AB12M9 chứa nhiều hơn 95% trình tự ở người. Hằng số động học và ái lực của chúng được liệt kê trong bảng 3. Theo bảng 3, kháng thể làm giống người hầu hết đều có giá trị K_D dưới 1×10^{-12} M, và không bị mất đáng kể ái lực liên kết so với

kháng thể chuột AB12M1 và kháng thể khảm AB12M2. Do đó kháng thể làm giống người duy trì ái lực và đặc tính của kháng thể đơn dòng chuột bố mẹ và làm giảm đáng kể khả năng gây miễn dịch.

Nhóm kháng thể làm giống người khác AB12N3, AB12N4, và AB12N5 cũng chứa nhiều hơn 95% trình tự ở người, và các giá trị K_D theo thứ tự 10^{-10} M, chỉ ra rằng kháng thể làm giống người không cho thấy sự mất đáng kể ái lực liên kết so với kháng thể chuột AB12N1 và kháng thể khảm AB12N2.

Bảng 2. Trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể làm giống người

Kháng thể	Trình tự VH	Trình tự VL
AB12M3	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
AB12M4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
AB12M5	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
AB12M6	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
AB12M7	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
AB12M8	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
AB12M9	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
AB12N3	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
AB12N4	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
AB12N5	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36

Bảng 3. So sánh ái lực của kháng thể làm giống người

Kháng thể	K_D (M)	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)
AB12M2	<1,0E-12	1,98E+05	<1,0E-07
AB12M3	<1,0E-12	2,26E+05	<1,0E-07
AB12M4	<1,0E-12	2,13E+05	<1,0E-07
AB12M5	<1,0E-12	1,69E+05	<1,0E-07
AB12M6	<1,0E-12	1,99E+05	<1,0E-07
AB12M7	2,42E-12	2,41E+05	5,84E-07
AB12M8	<1,0E-12	1,84E+05	<1,0E-07
AB12M9	4,11E-12	1,48E+05	6,08E-07
AB12N2	3,59E-10	6,58E+04	2,36E-05

AB12N3	3,65E-10	6,24E+04	2,28E-05
AB12N4	3,78E-10	6,37E+04	2,41E-05
AB12N5	4,14E-10	6,19E+04	2,56E-05

Ví dụ 6. Đặc tính hóa chức năng của kháng thể kháng PD-1 làm giống người

6.1. Xác định giá trị EC_{50} và đặc tính liên kết của kháng thể làm giống người bằng ELISA gián tiếp.

Xác định giá trị EC_{50} của kháng thể làm giống người AB12M3 và AB12M4 và kháng thể khảm AB12M2 với kháng nguyên PD-1 bằng ELISA gián tiếp. Sử dụng Keytruda và Opdivo làm kháng thể đối chứng và môi trường làm đối chứng âm. Sử dụng kháng thể kháng IgG người ở dê được đánh dấu bằng HRP (Phòng thí nghiệm Jackson) như là kháng thể thứ cấp, và quy trình thí nghiệm chi tiết được mô tả trong Ví dụ 2. Sử dụng thí nghiệm tương tự để phát hiện sự hiện diện hay vắng mặt phản ứng chéo của kháng thể làm giống người AB12M3 và AB12M4 và kháng thể khảm AB12M2 với PD-1 chuột (Sino Biological Inc., Beijing, China), cũng sử dụng Keytruda và Opdivo làm kháng thể đối chứng và môi trường làm đối chứng âm.

Như được thể hiện trong Fig. 5, kháng thể làm giống người AB12M3 và AB12M4 và kháng thể khảm AB12M2 đều có thể liên kết đặc hiệu với PD-1 người, và hoạt tính liên kết kháng nguyên, giá trị EC_{50} , ở giữa 0,001-0,01 $\mu\text{g/mL}$, thấp hơn kháng thể đối chứng Keytruda và Opdivo. Điều này chỉ ra rằng kháng thể kháng PD-1 làm giống người AB12M3 và AB12M4 và kháng thể khảm AB12M2 thiết kế bởi sáng chế không cho thấy sự giảm khả năng liên kết PD-1 do làm giống người, và duy trì ái lực cao của kháng thể chuột bố mẹ. Hơn nữa, chúng không liên kết với PD-1 chuột, chỉ ra tính đặc hiệu liên kết loài mạnh mẽ (Fig. 6).

6.2. Xác định ái lực tương đối của kháng thể kháng PD-1 làm giống người

Sử dụng Keytruda và Opdivo đánh dấu bằng peroxidaza củ cải đen (horseradish peroxidase - HRP) như là thuốc thử. Pha loãng PD-1 người (Sino Biological Inc., Beijing, China) đến 0,1 $\mu\text{g/mL}$ với đệm PBS và bổ sung 100 $\mu\text{L/lỗ}$ vào đĩa 96 ổ và để qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ dung dịch phủ, bổ sung 200 μL PBST/1% sữa không béo vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ để phong tỏa. Loại bỏ dung dịch phong tỏa và rửa đĩa 3 lần với PBST. Sau đó bổ sung hỗn hợp 50 μL môi trường sinh trưởng (DMEM + 5% FBS) và 50 μL Keytruda hoặc Opdivo được đánh

dấu bằng HRP. Rửa trôi Keytruda hoặc Opdivo được đánh dấu bằng HRP không liên kết. Sau đó bổ sung kháng thể AB12M2, AB12M3, hoặc AB12M4, và sử dụng Keytruda hoặc Opdivo không được đánh dấu làm đối chứng âm. Sau khi ủ kỹ, rửa trôi Keytruda hoặc Opdivo được đánh dấu bằng HRP không liên kết với PBS và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng kép 450/620 nm sử dụng máy đọc khay vi thể.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 7 và 8. Kháng thể AB12M2, AB12M3 và AB12M4 phong tỏa cạnh tranh đáng kể liên kết của Keytruda hoặc Opdivo với PD-1, và giá trị EC₅₀ của AB12M2, AB12M3 và AB12M4 cạnh tranh với Keytruda-HRP hoặc Opdivo-HRP để liên kết với PD-1 thấp hơn của Keytruda hoặc Opdivo, đều giữa 0,1 và 1 µg/mL. Do đó, có thể kết luận rằng ái lực của kháng thể AB12M2, AB12M3 và AB12M4 tương đương với Keytruda và Opdivo.

6.3. Phong tỏa liên kết PD-1/PD-L1 *in vitro* bởi kháng thể kháng PD-1 làm giống người

Phủ đoạn vùng ngoại bào của protein PD-1 chứa đuôi His-tag lên đĩa ELISA 96 lỗ. Sau khi phong tỏa và rửa, bổ sung kháng thể kháng PD-1 được kiểm tra, và trong khi đó bổ sung PD-L1-Fc được đánh dấu bằng biotin và ủ. Sau khi rửa đĩa, đo lượng PD-L1-Fc được đánh dấu bằng biotin liên kết và tính toán giá trị IC₅₀ của kháng thể PD-1 phong tỏa liên kết của PD-1 với phối tử của nó PD-L1.

Pha loãng PD-1/His đến 2 µg/mL với đệm PBS, pH 7,2, và thêm 100 µL/lỗ vào đĩa ELISA 96 lỗ và ủ với lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hút đệm PBS từ đĩa ELISA 96 lỗ. Bổ sung 200 µL PBST (PBS chứa 0,05% Tween 20, pH 7,4)/1% sữa không béo vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ để phong tỏa. Rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 50 µL kháng thể kháng PD-1 được kiểm tra vào mỗi lỗ, mà đã pha loãng với dung dịch phong tỏa đến nồng độ thích hợp. Trong khi đó, bổ sung 50 µL PD-L1/Fc được đánh dấu bằng biotin pha loãng đến 200 ng/mL với dung dịch phong tỏa vào mỗi lỗ. Ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 100 µL SA-Avidin-HRP (labeled streptavidin được đánh dấu bằng HRP) pha loãng tỷ lệ 1:250 với dung dịch phong tỏa vào mỗi lỗ, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Rửa đĩa 3 lần với PBST. Bổ sung 100 µL dung dịch nền TMB vào mỗi lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5-10 phút. Bổ sung 50 µL axit sulfuric 0,2 M vào mỗi lỗ để kết thúc phản ứng. Đọc giá trị hấp thụ ở 450 nm trong máy đọc khay vi thể.

Tính toán giá trị IC_{50} của kháng thể kháng PD-1 phong tỏa liên kết PD-1 với phối tử của nó PD-L1.

Như kết quả thí nghiệm trong bảng 4 thể hiện, kháng thể AB12M3 và AB12M4 đều hiệu quả trong việc phong tỏa liên kết của PD-1 với PD-L1 và vượt trội so với Keytruda và tương tự Opdivo.

Bảng 4. Giá trị IC_{50} của kháng thể AB12M3 và AB12M4 trong quá trình phong tỏa liên kết PD-1/PD-L1 *in vitro*

Kháng thể	AB12M3	AB12M4	Keytruda	Opdivo
IC_{50} (pM)	114,3	96	126,5	96

6.4. Hoạt tính liên kết tế bào *in vitro* của kháng thể kháng PD-1 làm giống người

Phân loại tế bào bằng hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting - FACS) là thử nghiệm được dùng để phát hiện liên kết giữa protein và tế bào. Thử nghiệm được dùng để phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể kháng PD-1 làm giống người của sáng chế với PD-1 nguyên thể biểu hiện trên bề mặt tế bào. Tế bào CHO biểu hiện quá mức PD-1 được sử dụng trong thử nghiệm này. Ủ 3×10^5 tế bào CHO với kháng thể thử nghiệm AB12M3 hoặc AB12M4 (kháng thể sơ cấp) trong một loạt các nồng độ gradient trong 30 phút. Sau khi rửa, bổ sung kháng thể thứ cấp kháng IgG người ở để được đánh dấu bằng FITC (BD Biosciences) và ủ trong 30 phút. Phát hiện tín hiệu FITC bằng phân tích tế bào theo dòng chảy. Kết quả trong Fig. 9 cho thấy rằng AB12M3 và AB12M4 có thể liên kết đặc hiệu với bề mặt biểu hiện quá mức PD-1 của tế bào CHO.

6.5. Kiểm tra liên kết đặc hiệu giữa kháng thể kháng PD-1 làm giống người và tế bào T hoạt hóa của người

Thu tế bào đơn nhân tươi từ máu ngoại biên người bằng cách ly tâm gradient mật độ (Lymphoprep™, dung dịch tách tế bào lympho người, STEMCELL), và thu tế bào lympho T có độ tinh khiết cao sử dụng chất thử phân lập tế bào T (STEMCELL). Kích thích tế bào lympho T với 5 μ g/mL kháng thể kháng CD3 trong 48 giờ, và nuôi cấy trong 7 ngày sau khi bổ sung 250 IU/mL IL-2 người. Sau đó thu được một lượng lớn tế bào lympho T hoạt hóa. Ủ 3×10^5 tế bào lympho T hoạt hóa với kháng thể thử nghiệm AB12M3 hoặc AB12M4 (kháng thể sơ cấp) trong một loạt gradient nồng độ trong 30

phút. Sau khi rửa, bổ sung kháng thể thứ cấp kháng IgG người ở đề được đánh dấu bằng FITC (BD Biosciences) và ủ trong 30 phút. Phát hiện tín hiệu FITC bằng phân tích tế bào theo dòng chảy. Kết quả trong Fig. 10 cho thấy AB12M3 và AB12M4 có thể liên kết đặc hiệu với bề mặt biểu hiện PD-1 của tế bào T hoạt hóa.

Ví dụ 7. Xác định hoạt tính sinh học của kháng thể kháng PD-1 người làm giống người

7.1. Tác dụng của kháng thể kháng PD-1 làm giống người đối với sự tăng sinh tế bào và tiết cytokin trong phản ứng tế bào lympho hỗn hợp

Sử dụng phản ứng tế bào lympho hỗn hợp để chứng minh tác dụng của việc phong tỏa con đường PD-1/PD-L1 trên tế bào thực hiện lympho. Xác định tác dụng của kháng thể kháng PD-1 và kháng thể đối chứng lớp IgG đối với sự tăng sinh tế bào T và tiết IFN- γ trong phản ứng tế bào lympho hỗn hợp.

Điều chỉnh tế bào đơn nhân máu ngoại biên người được phân lập tươi (Peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) đến mật độ tế bào $2,0 \times 10^6$ tế bào/mL, và thu bạch cầu đơn nhân bằng phương pháp kết dính. Bổ sung GM-CSF 100 ng/mL và IL-4 100 ng/mL và nuôi cấy trong 5 ngày. Sau đó bổ sung TNF- α 100 ng/mL để cảm ứng sự trưởng thành tế bào DC. Phân lập tế bào T CD4⁺ từ PBMCs người tươi sử dụng bộ chọn lọc dương tính CD4 ở người (STEMCELL). Trong đĩa 96 lỗ, mỗi lỗ chứa 250 μ L môi trường nuôi cấy bao gồm 10^5 tế bào T được phân lập, 10^4 tế bào DC trưởng thành, và một loạt gradient nồng độ của AB12M3 hoặc AB12M4. Sử dụng kháng thể đối chứng lớp IgG làm đối chứng âm. Nuôi cấy tế bào T và DC trong tủ ấm 37 °C, 5% CO₂ trong 6 ngày, và sau đó loại bỏ 100 μ L dịch nuôi cấy từ mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ để xác định nồng độ IFN- γ . Xác định nồng độ IFN- γ sử dụng bộ OptEIA ELISA (BD Biosciences). Xác định số lượng tế bào sống được trong đĩa 96 lỗ sử dụng bộ CellTiter-Glo (Promega) để đo sự tăng sinh tế bào. Kết quả cho thấy AB12M3 và AB12M4 thúc đẩy sự tăng sinh tế bào T (Fig. 11) và tiết IFN- γ (Fig. 12) theo cách phụ thuộc nồng độ.

7.2. Tác dụng của kháng thể kháng PD-1 làm giống người đối với sự tiết cytokin của PBMCs người được cảm ứng bởi sự kích thích của siêu kháng nguyên

Tái tạo huyền phù tế bào PBMC người được phân lập tươi thành 10^6 tế bào/mL với môi trường RPMI 1640 chứa FBS bất hoạt 10% và AB12M3 hoặc AB12M4 20

$\mu\text{g/mL}$ hoặc kháng thể đối chứng lớp IgG, và cấy 100 $\mu\text{L/lỗ}$ vào đĩa 96 lỗ. Nồng độ cao nhất của siêu kháng nguyên SEB là 2500 ng/mL, pha loãng trong 4 lần của việc pha loãng 10 lần nối tiếp và bổ sung vào đĩa 96 lỗ trong bộ ba. Nuôi cấy tế bào trong 72 giờ. Lấy dịch nổi để xác định nồng độ IL-2 sử dụng bộ OptEIA ELISA (BD Biosciences). Kết quả trong Fig. 13 cho thấy AB12M3 và AB12M4 có thể thúc đẩy sự tiết IL-2 bởi tế bào T.

7.3. Tác dụng giết tế bào khối u *in vitro* của việc kích thích tế bào T bằng kháng thể kháng PD-1 làm giống người

Cấy dòng tế bào ung thư phi tiểu bào phổi người HCC827 biểu hiện quá mức PD-L1 (Ngân hàng tế bào của Viện Hàn Lâm Khoa học Trung Quốc (Thượng Hải)) vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ. Bổ sung một loạt nồng độ của AB12M1, AB12M3, AB12M4 hoặc huIgG. Sau đó bổ sung tế bào T được hoạt hóa bởi cả kháng thể CD3 và IL-2 với tỉ lệ 10:1 tác nhân thực hiện/dích và nuôi cấy trong 48 giờ. Rửa đĩa với môi trường để loại bỏ hầu hết tế bào T. Phân tích khả năng sống của tế bào HCC827 sử dụng bộ tăng sinh tế bào CCK-8 (Dojindo), và tính toán tỷ lệ giết. Kết quả trong bảng 5 cho thấy AB12M3 và AB12M4 có khả năng tăng cường sự giết tế bào khối u của tế bào T.

Bảng 5. Tỷ lệ giết của kháng thể làm giống người AB12M3 và AB12M4 đối với tế bào khối u (%)

Liều lượng ($\mu\text{g/mL}$)	AB12M1	AB12M3	AB12M4	huIgG
100	58,2	30,3	59,1	21,8
10	37,3	22,0	32,9	30,8
1	30,2	23,5	21,9	20,0
0,1	28,8	20,0	16,7	28,6

7.4. Hiệu quả *in vivo* của kháng thể kháng PD-1 làm giống người trong mô hình chuột làm giống người PD-1 được cấy dưới da tế bào ung thư ruột kết MC38

Sử dụng chuột làm giống người B-hPD-1 để đánh giá hiệu quả *in vivo* của kháng

thể kháng PD-1 người. Phát triển chuột B-hPD-1 từ chuột nguồn gốc di truyền C57BL/6 bởi Beijing Biocytogen Co., Ltd. Sử dụng kỹ thuật nhắm đích gen, phần exon thứ hai của gen PD-1 của chuột C57BL/6, bao gồm phần vùng IgV, đã được thay thế bằng đoạn PD-1 của người. Chuột được thiết kế thành công có thể biểu hiện PD-q khảm người-chuột, bao gồm phần ngoại bào của hPD-1 và phần nội bào của mPD-1. Loại PD-1 khảm này có khả năng phát tín hiệu bình thường của PD-1, như phối tử PD-L1 của người hoặc chuột có thể liên kết với thụ thể PD-1 này để ức chế hoạt tính tế bào T.

Tiêm dưới da tế bào ung thư ruột kết MC38 của chuột (Shunran Shanghai Biotechnology Co., Ltd.) với 5×10^5 tế bào/0.1 mL ở sườn trước bên phải của chuột cái làm giống người B-hPD-1. Khi kích thước khối u đạt khoảng 150 mm^3 , chuột được phân ngẫu nhiên thành 3 nhóm, 8 cá thể mỗi nhóm, đó là (1) nhóm đối chứng dung môi (nhóm PBS), (2) nhóm điều trị bằng AB12M4, và (3) nhóm đối chứng Keytruda (Merck, số lô 5SNL80505). Liều lượng và thể tích sử dụng thuốc của cả nhóm (2) và (3) lần lượt là 20 mg/kg và 10 mL/kg. Đối với tất cả các nhóm, đường sử dụng là tiêm vào trong màng bụng. Các thuốc được tiêm 3 ngày một lần và tổng cộng 6 lần liên tục. Thí nghiệm kết thúc 28 ngày sau tiêm.

Đo đường kính tối đa (L) và đường kính tối thiểu (W) của khối u bằng thước cặp, và tính toán thể tích khối u (V) bằng công thức $V = 1/2 (L \times W^2)$. Đo thể tích khối u 3 lần một tuần, và trong khi đó, đo khối lượng cơ thể chuột.

Như được thể hiện trong Fig. 14, kết thúc thí nghiệm, thể tích khối u trung bình trong nhóm đối chứng dung môi là $3405,2 \text{ mm}^3$. Thể tích khối u trung bình trong nhóm điều trị bằng AB12M4 và nhóm đối chứng Keytruda lần lượt là $277,4 \text{ mm}^3$ và 249 mm^3 , đã chỉ ra rằng AB12M4 có tác dụng kháng khối u đáng kể, và tác dụng kháng khối u của nó tương đương với Keytruda. Hơn nữa, trong suốt quá trình thí nghiệm, chuột có sức khỏe tốt và không có con nào chết. Kết thúc thí nghiệm, khối lượng cơ thể của mỗi nhóm tăng, và không có sự khác biệt đáng kể giữa khối lượng cơ thể của nhóm điều trị bằng AB12M4 và nhóm đối chứng dung môi ($p > 0,05$), đã chỉ ra rằng chuột có khả năng chịu đựng tốt với AB12M4, và AB12M4 không có tác dụng độc hại rõ rệt trên chuột thí nghiệm.

Tất cả các công bố được đề cập trong sáng chế đều được đưa vào bằng cách tham

khảo ở cùng mức độ như thể mỗi tài liệu được kể lại riêng để tham khảo. Hơn nữa, cần phải hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra những thay đổi và sửa đổi khác nhau khi đọc các hướng dẫn ở trên của sáng chế, đều nằm trong phạm vi yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 (programmed death-1 - PD-1), bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ,

trong đó:

(i) vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR-H1 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, CDR-H2 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, và CDR-H3 gồm có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 5; và

(ii) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR-L1 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7, CDR-L2 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và CDR-L3 gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11.

2. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, trong đó kháng thể là kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm vùng FR chuỗi nặng của IgG₁, IgG₂, IgG₃ hoặc thể biến dị của chúng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm vùng FR chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ , hoặc thể biến dị của chúng ở chuột.

3. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 2, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14.

4. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 2, trong đó kháng thể là kháng thể được làm giống người.

5. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, và 29; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26, 28, và 30.

6. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 21 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 23 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 24;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 26;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 28; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 30.

7. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 31, 33 và 35, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 32, 34, và 36.

8. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 7, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 31, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 32;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 33, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 34;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 35, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36.

9. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, bao gồm phép thay thế một hay nhiều axit amin so với các SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, và 30.

10. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, bao gồm ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự axit amin đồng nhất với các trình tự axit amin SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30.

11. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, bao gồm vùng cố định chuỗi nặng của IgG₄ hoặc IgG₁ ở người và vùng cố định chuỗi nhẹ κ ở người,

hoặc đoạn liên kết kháng nguyên đó là Fab, F(ab')₂, hoặc scFv.

12. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, trong đó kháng thể được glycosylat hoá.

13. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, trong đó kháng thể liên kết với PD-1 có K_D bằng 1 nM hoặc thấp hơn.

14. Phân tử ADN mã hóa kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1.

15. Phân tử ADN theo điểm 14, trong đó phân tử ADN bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất được chọn từ các nhóm gồm SEQ ID NO: 37, 39, và 41; và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó trình tự axit nucleic thứ hai được chọn từ các nhóm gồm SEQ ID NO: 38, 40 và 42.

16. Vector biểu hiện bao gồm phân tử ADN theo điểm 14.

17. Tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo điểm 16.

18. Phân tử đặc hiệu kép bao gồm kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1, trong đó phân tử đặc hiệu kép còn bao gồm kháng thể chống lại phân tử được chọn từ nhóm gồm VEGF, EGFR, HER2/neu, thụ thể VEGF hoặc thụ thể của nhân tố sinh trưởng khác, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1-BB, và ICOS.

19. Thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1 và tác nhân trị liệu.

20. Dược phẩm bao gồm kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 1 và tá dược, chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

21. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 17 trong điều kiện mà cho phép sản xuất kháng thể, và bước thu hồi và bước phân lập kháng thể được tạo ra từ tế bào chủ.

22. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 13, trong đó kháng thể liên kết với PD-1 có K_D bằng 100pM hoặc thấp hơn.

23. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 13, trong đó kháng thể liên kết với PD-1 có K_D bằng 10pM hoặc thấp hơn.

24. Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1 theo điểm 13, trong đó kháng thể liên kết với PD-1 có K_D bằng 1pM hoặc thấp hơn.

25. Phân tử ADN theo điểm 15, trong đó phân tử ADN bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, và trong đó: (a) trình tự axit nucleic thứ nhất là SEQ ID NO: 37, và trình tự axit nucleic thứ hai là SEQ ID NO: 38; (b) trình tự axit nucleic thứ nhất là SEQ ID NO: 39, và trình tự axit nucleic thứ hai là SEQ ID NO: 40; hoặc (c) trình tự axit nucleic thứ nhất là SEQ ID NO: 41, và trình tự axit nucleic thứ hai là SEQ ID NO: 42.

26. Thể tiếp hợp miễn dịch theo điểm 19, trong đó tác nhân trị liệu được lựa chọn từ nhóm gồm co độc tố, đồng vị phóng xạ, thuốc, hoặc tác nhân gây độc tế bào,

1/8

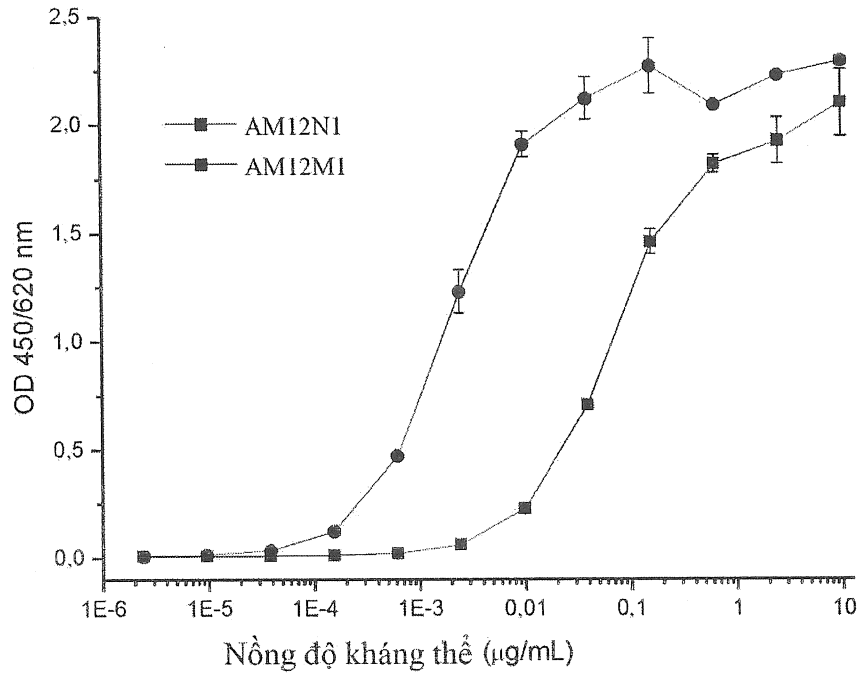


FIG.1

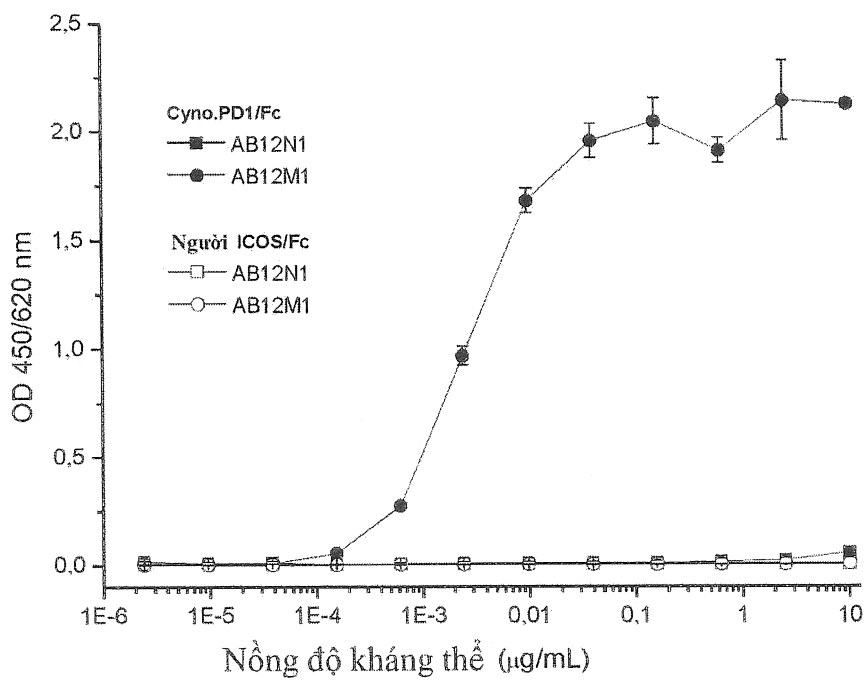


FIG.2-1

2/8

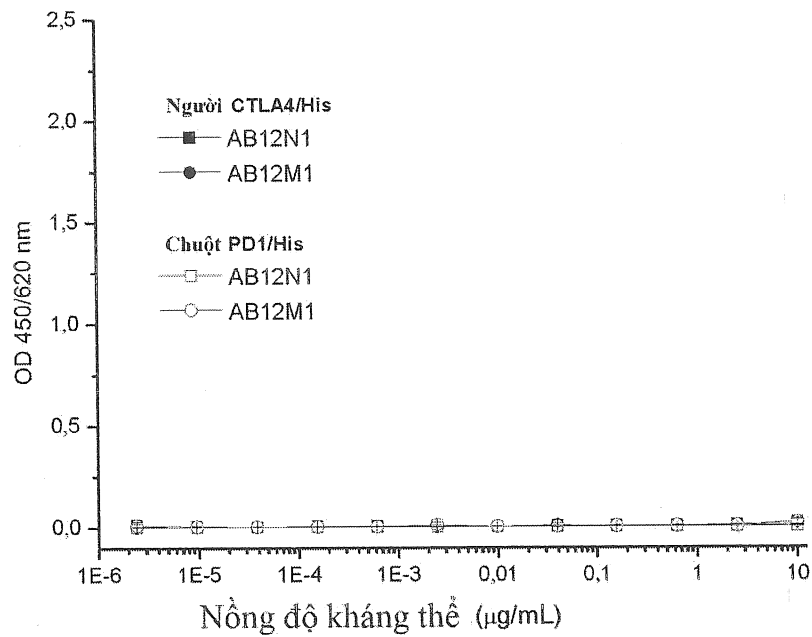


FIG.2-2

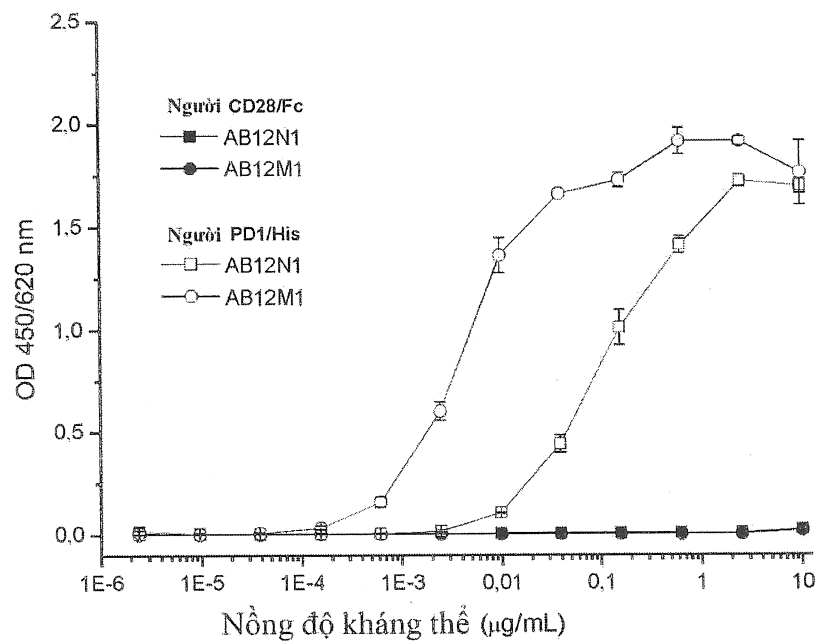


FIG.2-3

3/8

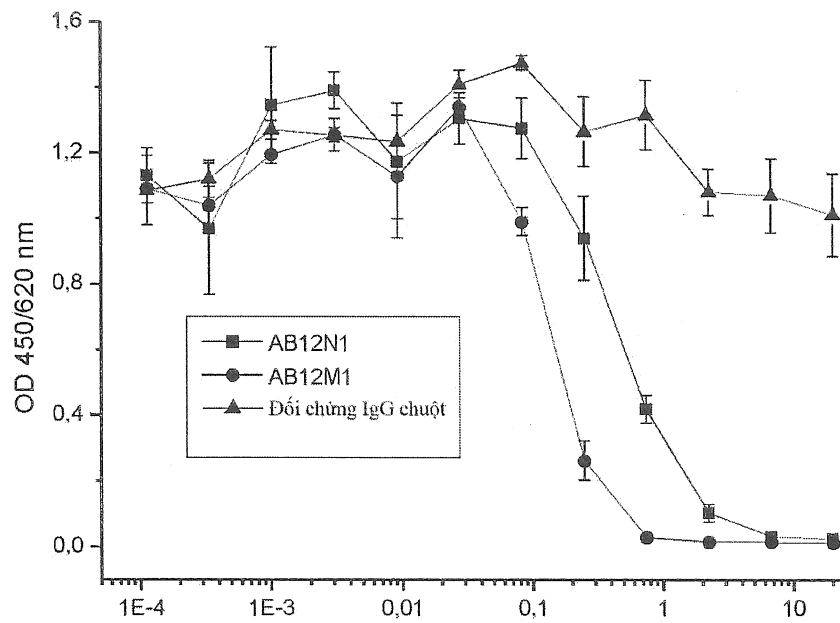


FIG.3

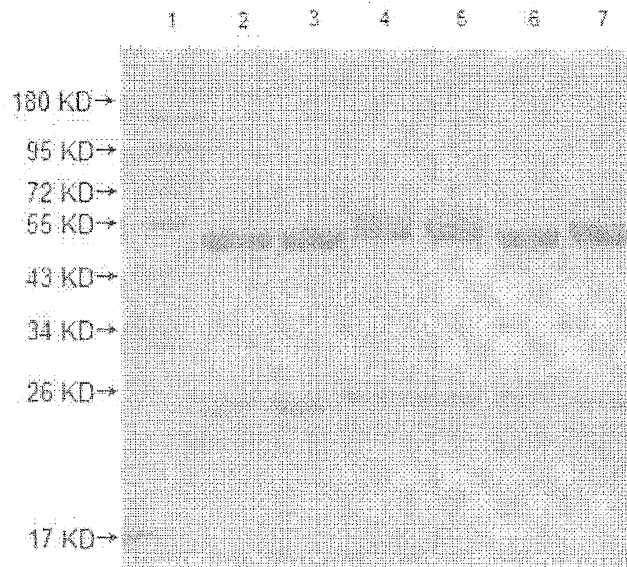


FIG.4

4/8

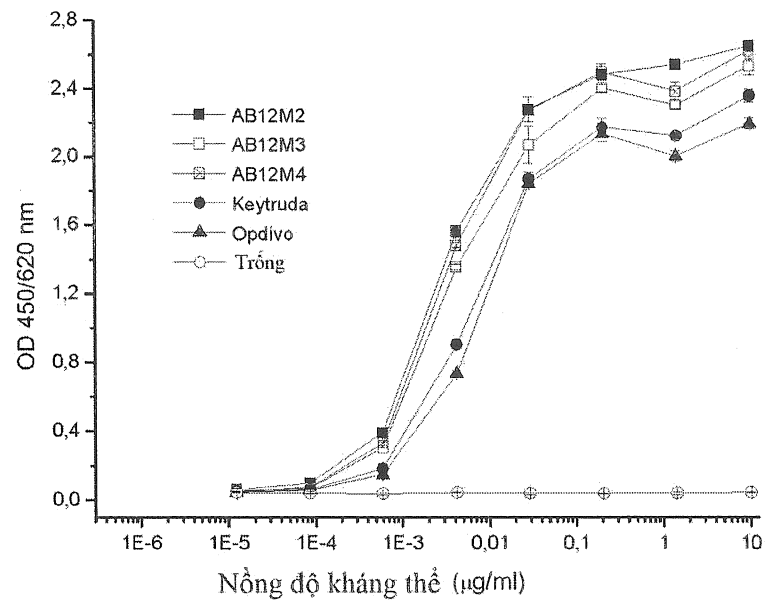


FIG.5

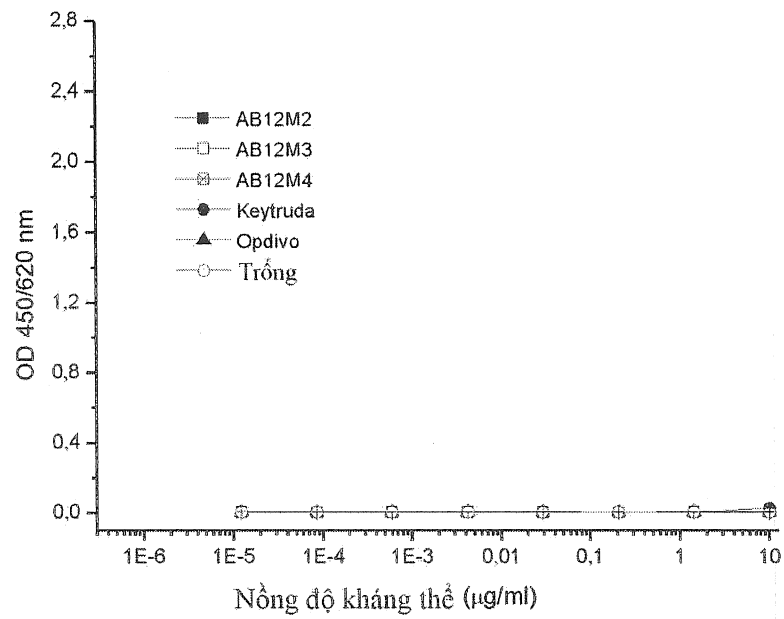


FIG.6

5/8

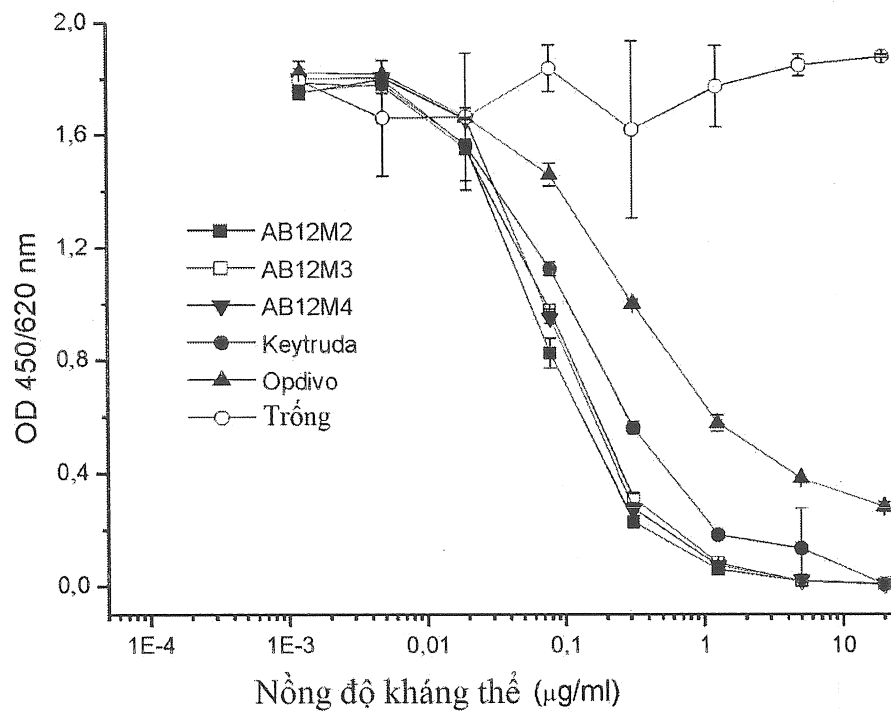


FIG.7

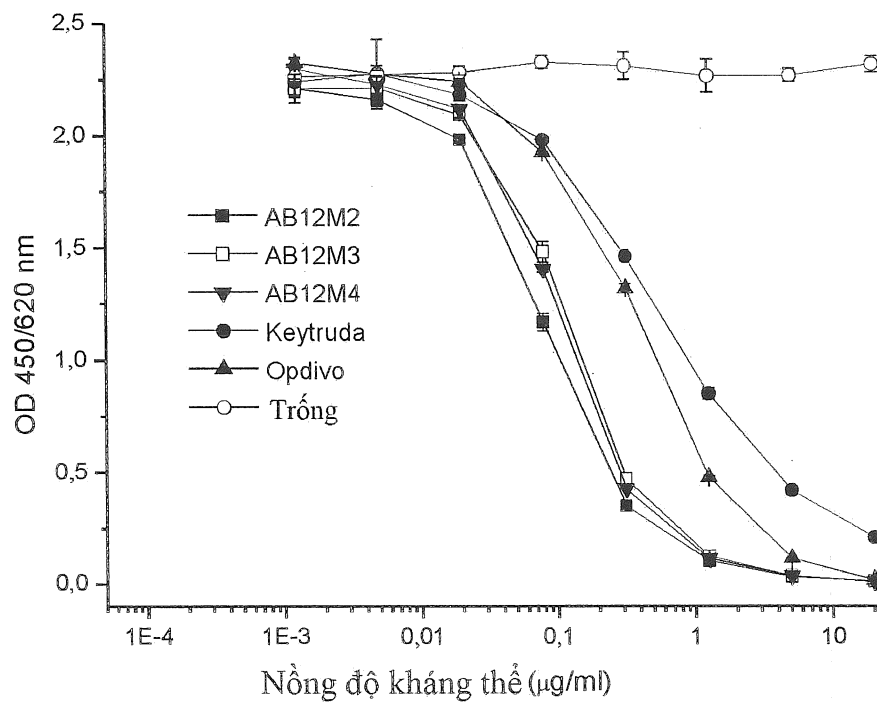


FIG.8

6/8

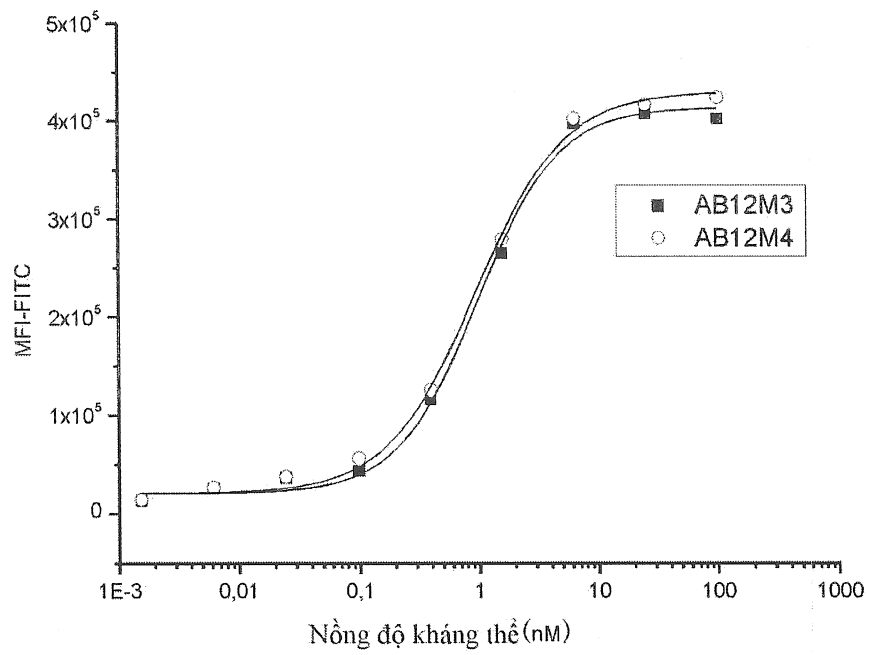


FIG.9

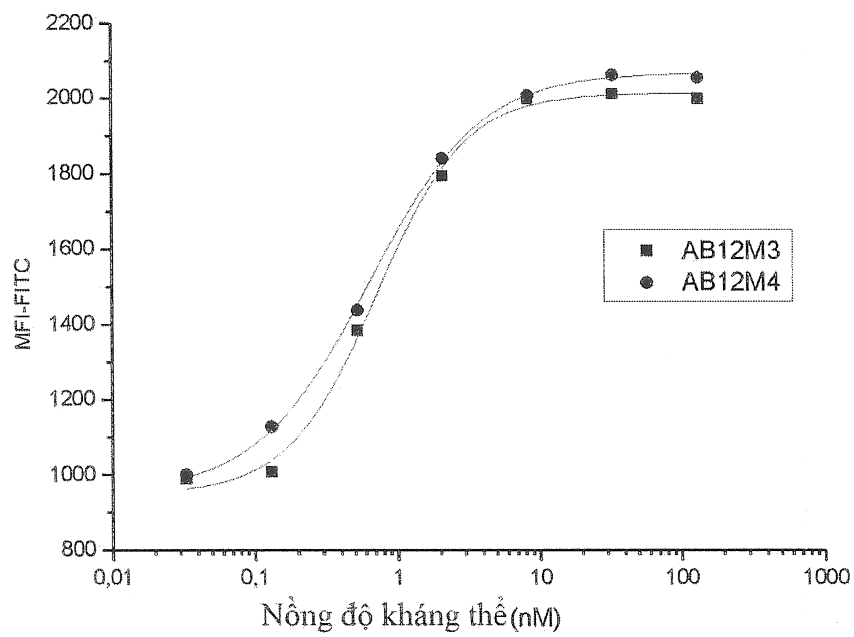


FIG.10

7/8

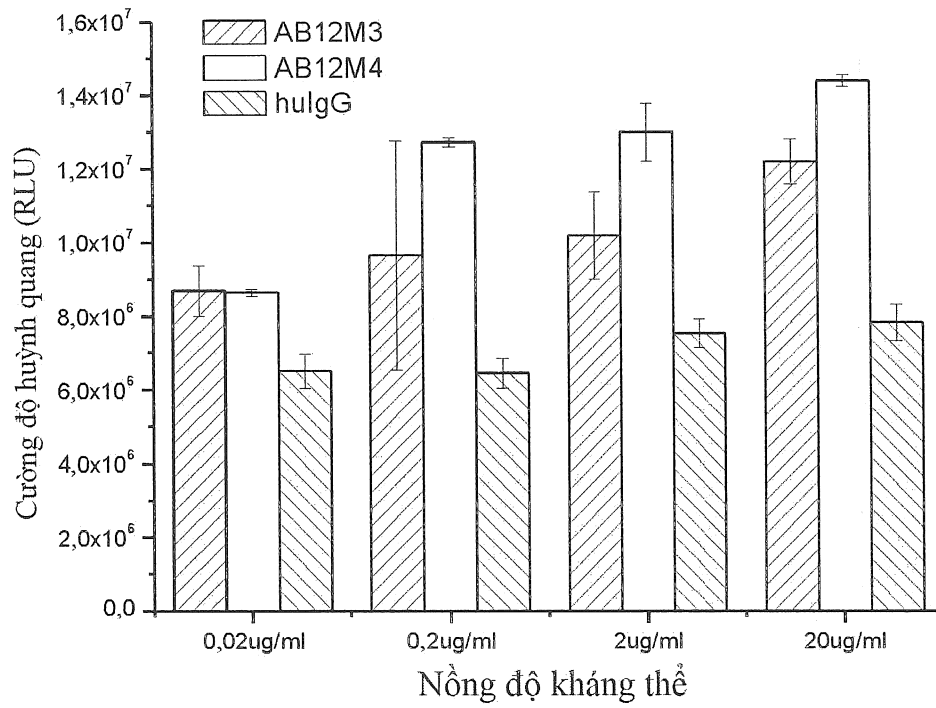


FIG.11

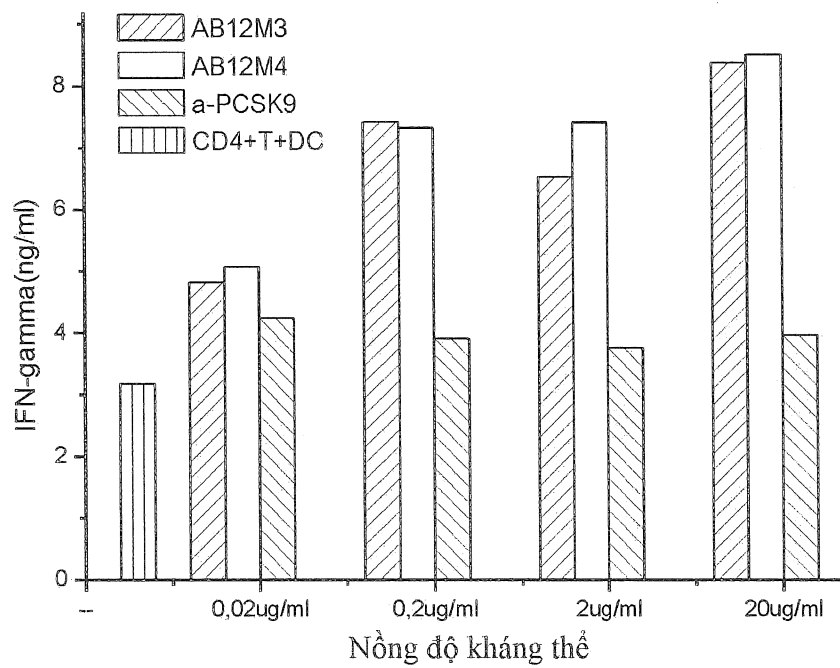


FIG.12

8/8

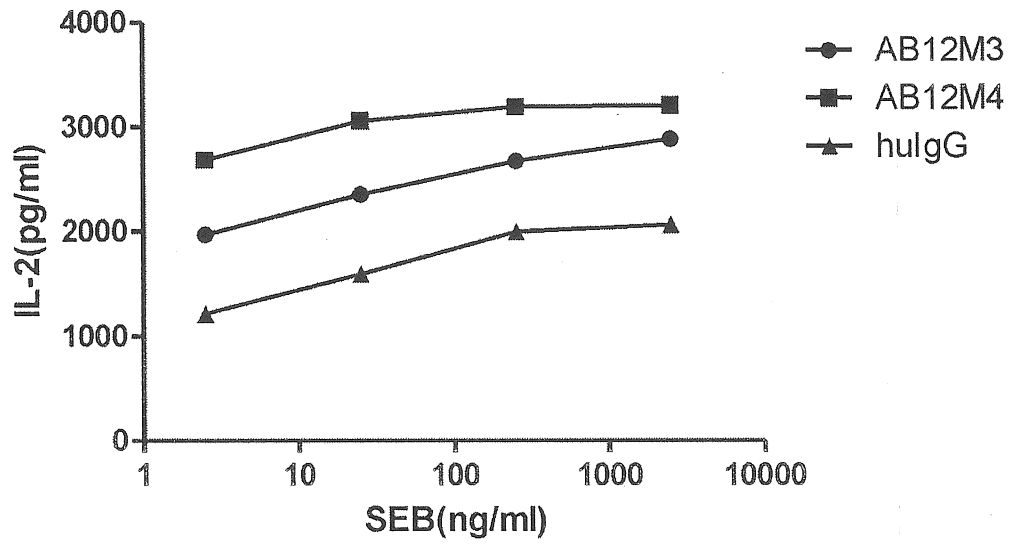


FIG.13

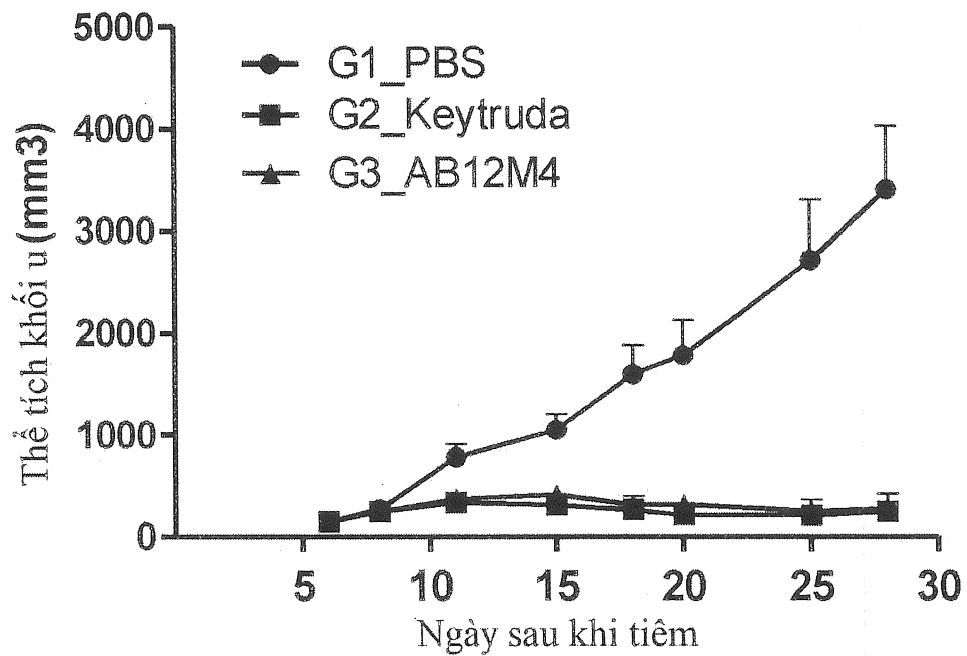


FIG.14

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMPSOURCE BIOPHARMA SHANGHAI INC.

<120> Kháng thể kháng protein chết theo chương trình 1, phân tử ADN, vectơ biểu hiện, tế bào chủ, phân tử đặc hiệu kép, thể tiếp hợp miễn dịch và được phẩm bao gồm kháng thể này, và phương pháp sản xuất kháng thể

<130> 201612

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> CDR-H1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> CDR-H1

<400> 2

Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser Gly
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> CDR-H2

<400> 3

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> CDR-H2

<400> 4

Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg
1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> CDR-H3

<400> 5

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His
1 5 10

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> CDR-H3

<400> 6

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr
1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> CDR-L1

<400> 7

Glu Ser Val Asp Asp Tyr Gly Ile Ser Phe
1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> CDR-L1

<400> 8

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> mAb1 CDR-L2

<400> 9

Val Ala Ser
1

<210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> CDR-L2

<400> 10

Asp Ala Ser
1

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> CDR-L3

<400> 11

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> CDR-L3

<400> 12

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể
chuột AB12M1 hoặc kháng thể khảm AB12M2

<400> 13

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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột AB12M1 hoặc kháng thể khảm AB12M2

<400> 14

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65

70

75

80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

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

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể
chuột AB12N1 hoặc kháng thể khảm AB12N2

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể chuột
AB12N1 hoặc kháng thể khảm AB12N2

<400> 16

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M3

<400> 17

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

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

Gly 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 Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm
giống người AB12M3

<400> 18

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

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

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M4

<400> 19

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M4

<400> 20

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M5

<400> 21

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Ala 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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M5

<400> 22

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Arg Val Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M6

<400> 23

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Ala 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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M6

<400> 24

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

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

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

Arg Val Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm
 giống người AB12M7
 <400> 25
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Ala 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
 Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M7

<400> 26

Asp 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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Arg Val Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M8

<400> 27

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Ala 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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M8

<400> 28

Asp 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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Arg Val Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M9

<400> 29

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

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

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

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

Ala Arg Gln Lys Asp Thr Ser Trp Phe Val His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M9

<400> 30

Asp 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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Arg Val Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 31

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm
 giống người AB12N3

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30

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

Ala Val Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm
giống người AB12N3

<400> 32

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12N4

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12N4

<400> 34

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12N5

<400> 35

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30

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

Ala Val Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12N5

<400> 36

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37

<211> 354

<212> DNA

<213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể khâm AB12M2

<400> 37

gaggtgaagc tgggtggagag cggaggagga ctggtgaagc caggaggatc tctgaagctg 60
 agctgtgctg cctctggcctt caccttttcc tcttacggca tgagctgggt gagacagaca 120
 cccgagaagc gcctggaatg ggtcgctacc atctctggcg gcggcagaga cacatactat 180
 cctgattccg tgaagggcag attcaccatc agccgcgata acgcaaaaaa taatctgtat 240
 ctgcaaatgt cttccctgag gtctgaggac accgctctgt actattgcgc ccggcagaag 300
 gatacatctt gggttcgtgca ctggggacag ggcaccctgg tgaccgtgtc cgcc 354

<210> 38
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể khảm AB12M2

<400> 38
 gacatcgtgc tgaccagtc tccagctagc ctggccgtgt ccctgggaca gagggtacc 60
 atcagctgtc gggcctctga gtctgtcgac gattacggca tctctttcat gaattggttc 120
 cagcagaaac ctggccagcc ccctaaactg ctgatctatg tcgcttcaa tcaggggaagc 180
 ggagtgcctg ctagattcag cggatctgga tctggaaccg acttcagcct gaacatccat 240
 ccaatggagg aggacgatac cgccatgtac ttctgtcagc agtctaaaga agtcccttgg 300
 acctttggcg gcggcacaaa gctggagatc aag 333

<210> 39
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M3

<400> 39
 gaggtgcagc tgggtggagtc cggaggagga ctggtgcagc ctggaggcag cctgagactg 60
 tcttgcgccg cttccggctt caccttttcc agctacggca tgtcttgggt gagacaggct 120
 cctggcaagg gactggagtg ggtggctacc atctccggag gaggaaggga cacatactat 180
 ccagatagcg tgaagggcag gttcacaatc tctcgggaca acgctaagaa caatctgtat 240
 ctgcagatga actccctgag agctgaggac accgcctgt actattgcgc ccgccagaag 300
 gatacaagct ggtttgtgca ctggggccag ggcaccctgg tgacagtgtc ttcc 354

<210> 40
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M3

<400> 40
 gagatcgtgc tgaccagag ccctgccaca ctgagcctgt ctccaggcga gagggtacc 60
 ctgtcttgtc gggcctccga gagcgtggac gattacggca tctccttcat gaactggttt 120
 cagcagaagc caggccaggc tccaagctg ctgatctatg tggccagcaa tcagggtctc 180

ggagtgccag ctcgcttctc tggctccgga agcggaaaccg acttttctct gacaatcagc 240
 tctctggagc cagacgatac agccatgtac ttctgccagc agtccaagga ggtgccatgg 300
 acctttggcg gaggaacaaa ggtggagatc aag 333

<210> 41

<211> 354

<212> DNA

<213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể làm giống người AB12M4

<400> 41

gaggtgcagc tgggtggagag cggaggagga ctggtgaagc caggaggatc tctgaggctg 60
 agctgtgctg cctctggctt caccttttcc tcttacggca tgagctgggt gagacagaca 120
 cccgagaagc gcctggaatg ggctcgctacc atctctggcg gcggcagaga cacatactat 180
 cctgattccg tgaagggcag attcaccatc agccgcgata acgcaaaaa taatctgtat 240
 ctgcaaatgt cttccctgag gtctgaggac accgctctgt actattgcgc ccggcagaag 300
 gatacatctt ggttcgtgca ctggggacag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctcc 354

<210> 42

<211> 333

<212> DNA

<213> Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể làm giống người AB12M4

<400> 42

gaaatcgtgc tgaccagtc tccagctaca ctggccgtgt cccctggaga gagggctacc 60
 atcagctgtc gggcctctga gtctgtcgac gattacggca tctctttcat gaattggttc 120
 cagcagaaac ctggccagcc ccctaaactg ctgatctatg tcgcttccaa tcagggaagc 180
 ggagtgcctg ctagattcag cggatctgga tctggaaccg acttcaccct gaacatccat 240
 ccaatggagg aggacgatac cgccatgtac ttctgtcagc agtctaaaga agtcccttgg 300
 acctttggcg gcggcacaaa gctggagatc aag 333