



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

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

(11)



1-0035760

(51)⁷ C07K 14/55; C07K 16/28; A61K 38/20; (13) B
A61K 39/00

(21) 1-2019-05030

(22) 29/03/2018

(86) PCT/EP2018/058034 29/03/2018

(87) WO 2018/184964 11/10/2018

(30) 17164533.6 03/04/2017 EP

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/02/2020 383A

(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

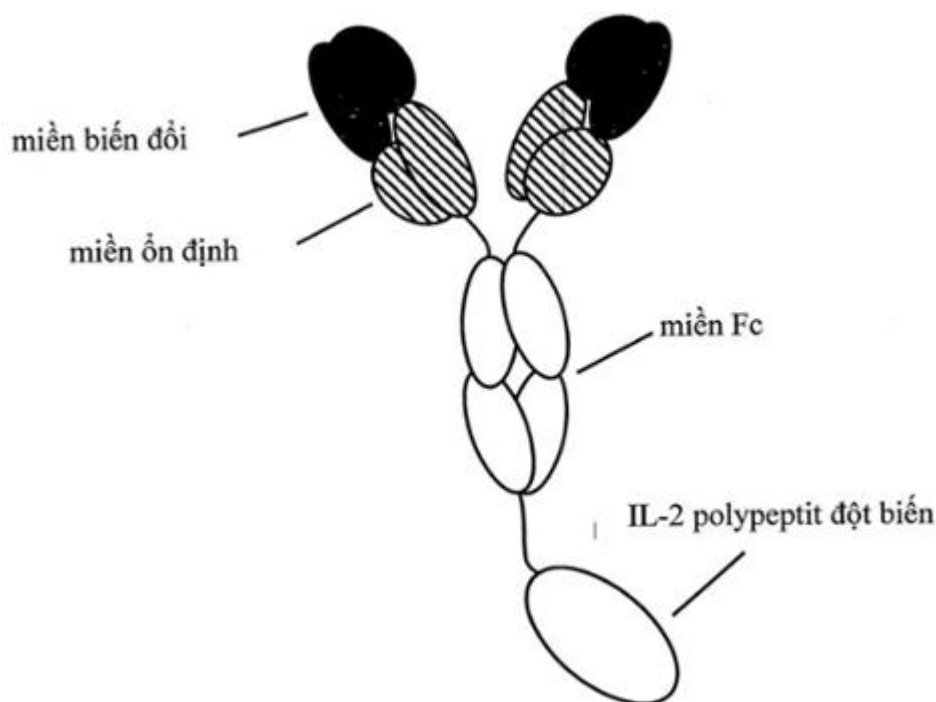
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland

(72) CODARRI DEAK, Laura (CH); KLEIN, Christian (DE); LAUENER, Laura (CH);
NICOLINI, Valeria G. (ES); SEEBER, Stefan (DE); UMAÑA, Pablo (CR);
WALDHAUER, Inja (DE).

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

(54) THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 CHỨA THỂ ĐỘT BIẾN INTERLEUKIN-2 (IL-2) HOẶC INTERLEUKIN-15 (IL-15), PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế nhìn chung đề cập đến thể liên hợp miễn dịch, cụ thể là thể liên hợp miễn dịch chứa interleukin-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch, và véc-tơ và tế bào vật chủ chứa phân tử polynucleotit này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra các thể liên hợp miễn dịch đột biến và dược phẩm chứa chúng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể liên hợp miễn dịch, cụ thể là thể liên hợp miễn dịch chứa interleukin-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch này, và véc-tơ và tế bào vật chủ chứa phân tử polynucleotit như vậy. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra các thể liên hợp miễn dịch đột biến, được phẩm chứa chúng, và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin-2 (IL-2), còn được gọi là yếu tố sinh trưởng tế bào T (T cell growth factor - TCGF), là glycoprotein dạng hình cầu 15,5 kDa đóng vai trò trung tâm trong sự sản sinh, sự sống và tính nội cân bằng của tế bào lympho. Nó có chiều dài 133 axit amin và được cấu thành bởi bốn đường xoắn ốc α đối song song, lưỡng cực tạo ra cấu trúc bậc bốn không thể thiếu chức năng của nó (Smith, Science 240, 1169-76 (1988); Bazan, Science 257, 410-413 (1992)). Các trình tự của IL-2 từ các loài khác nhau được tìm thấy trong NCBI RefSeq số NP000577 (người), NP032392 (chuột nhắt), NP446288 (chuột cống) hoặc NP517425 (tinh tinh).

IL-2 làm trung gian cho sự tác động của nó bằng cách gắn kết với thụ thể IL-2 (IL-2R), mà được cấu thành bởi lên đến ba cấu trúc dưới đơn vị riêng biệt, sự kết hợp khác nhau của chúng có thể tạo ra dạng thụ thể khác về ái lực của chúng đối với IL-2. Sự kết hợp của các cấu trúc dưới đơn vị α (CD25), β (CD122), và γ (γ_c , CD132) dẫn đến việc tạo ra thụ thể trime, ái lực cao đối với IL-2. Thụ thể IL-2 dime được cấu thành bởi các cấu trúc dưới đơn vị β và γ được gọi là IL-2R ái lực trung bình. Cấu trúc dưới đơn vị α tạo ra thụ thể IL-2 monome ái lực thấp. Mặc dù thụ thể IL-2 dime ái lực trung bình gắn kết IL-2 với ái lực thấp hơn khoảng 100 lần so với thụ thể trime ái lực cao, cả các biến thể thụ thể IL-2 dime lẫn trime đều có thể truyền tín hiệu khi gắn kết IL-2 (Minami và các đồng tác giả, Annu Rev Immunol 11, 245-268 (1993)). Do đó, cấu trúc dưới đơn vị α , CD25, là không thiết yếu đối với sự truyền tín hiệu IL-2. Nó

tạo gắn kết ái lực cao với thụ thể của nó, trong khi cấu trúc dưới đơn vị β , CD122, và cấu trúc dưới đơn vị γ là rất quan trọng đối với sự tải nạp tín hiệu (Krieg và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci 107, 11906-11 (2010)). Thụ thể IL-2 trime chứa CD25 được biểu hiện bởi tế bào T (T_{reg}) điều hòa P3 (FoxP3)⁺ hộp đầu chạc CD4⁺ (nghi). Chúng cũng được tạo ra tạm thời trên các tế bào T được hoạt hóa thông thường, trong khi ở trạng thái nghỉ các tế bào này chỉ biểu hiện thụ thể IL-2 dime. Tế bào T_{reg} biểu hiện nhất quán mức CD25 cao *in vivo* (Fontenot và các đồng tác giả, Nature Immunol 6, 1142-51 (2005)).

IL-2 được tổng hợp chủ yếu bằng tế bào T đã hoạt hóa, cụ thể là tế bào T trợ giúp CD4⁺. Nó kích thích quá trình tăng sinh và quá trình biệt hóa của tế bào T, gây ra quá trình sản sinh tế bào lympho T gây độc tế bào (cytotoxic T cell - CTL) và quá trình biệt hóa của tế bào lympho máu ngoại vi thành tế bào gây độc tế bào và tế bào tiêu diệt được hoạt hóa bởi lymphokin (LAK), kích thích xytokin và sự biểu hiện phân tử tiêu tế bào bởi tế bào T, tạo thuận lợi cho quá trình tăng sinh và quá trình biệt hóa tế bào B và quá trình tổng hợp globulin miễn dịch bởi tế bào B, và kích thích sự sản sinh, sự tăng sinh và sự hoạt hóa của tế bào tiêu diệt tự nhiên (xem xét, ví dụ, trong các ấn phẩm Waldmann, Nat Rev Immunol 6, 595-601 (2009); Olejniczak và Kasprzak, Med Sci Monit 14, RA179-89 (2008); Malek, Annu Rev Immunol 26, 453-79 (2008)).

Khả năng của nó để mở rộng quần thể tế bào lympho *in vivo* và làm tăng chức năng tác động của các tế bào này mang lại tác dụng kháng khối u cho IL-2, khiến cho liệu pháp miễn dịch IL-2 trở thành một lựa chọn điều trị hấp dẫn đối với các ung thư di căn nhất định. Do đó, phương pháp điều trị bằng IL-2 liều cao đã được phê chuẩn để dùng cho bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào thận di căn và khối u ác tính.

Tuy nhiên, IL-2 có chức năng kép trong đáp ứng miễn dịch vì nó không những làm trung gian cho sự mở rộng và tính hoạt động của tế bào tác động, mà còn tham gia vào việc duy trì tính dung nạp miễn dịch ngoại vi.

Một cơ chế chính nằm dưới tính tự dung nạp ngoại vi là sự chết tế bào được tạo ra bởi IL-2 (AICD) trong các tế bào T. AICD là một quá trình trong đó các tế bào T đã được hoạt hóa đầy đủ trải qua quá trình gây chết tế bào theo chương trình thông qua sự tham gia của các thụ thể chết được biểu hiện trên bề mặt tế bào như CD95 (còn được gọi là Fas) hoặc thụ thể TNF. Khi tế bào T được hoạt hóa bởi kháng nguyên biểu hiện

thụ thể IL-2 có ái lực cao (sau khi tiếp xúc trước với IL-2) trong quá trình tăng sinh được kích thích lại bằng kháng nguyên nhờ thụ thể tế bào T (phức hợp TCR)/CD3, sự biểu hiện của phối tử Fas (FasL) và/hoặc yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor - TNF) được tạo ra, làm cho các tế bào dễ bị chết theo chương trình qua trung gian Fas. Quy trình này là quy trình phụ thuộc vào IL-2 (Lenardo, Nature 353, 858-61 (1991)) và qua trung gian STAT5. Nhờ quy trình của AICD trong tế bào lympho T tính dung nạp có thể không những được thiết lập đối với chính kháng nguyên, mà còn đối với các kháng nguyên sống dai rõ ràng không phải là một phần của việc tạo ra vật chủ, như kháng nguyên khối u.

Hơn nữa, IL-2 cũng liên quan đến sự duy trì tế bào T điều hòa (T_{reg}) $CD4^+$ $CD25^+$ ngoại vi (Fontenot và các đồng tác giả, Nature Immunol 6, 1142-51 (2005); D'Cruz and Klein, Nature Immunol 6, 1152-59 (2005); Maloy and Powrie, Nature Immunol 6, 1171-72 (2005), còn được gọi là tế bào T ức chế. Chúng ức chế tế bào T tác động tránh bị phá hủy (chính) đích của chúng, hoặc thông qua sự tiếp xúc tế bào-tế bào bằng cách ức chế tế bào T trợ giúp và hoạt hóa, hoặc thông qua sự giải phóng xytokin ức chế miễn dịch như IL-10 hoặc TGF- β . Đã cho thấy sự tiêu diệt tế bào T_{reg} tăng cường miễn dịch kháng khối u được tạo ra bởi IL-2 (Imai và các đồng tác giả, Cancer Sci 98, 416-23 (2007)).

Vì vậy, IL-2 không phải là tối ưu để ức chế sự phát triển của khối u, vì với sự có mặt của IL-2 hoặc CTL được sản sinh có thể nhận diện chính khối u và trải qua AICD hoặc đáp ứng miễn dịch có thể được ức chế bởi tế bào T_{reg} phụ thuộc vào IL-2.

Một mối quan tâm nữa liên quan đến liệu pháp miễn dịch IL-2 là các tác dụng phụ được tạo ra từ việc xử lý IL-2 tái tổ hợp ở người. Bệnh nhân được điều trị bằng IL-2 liều cao thường xuyên gặp phải các vấn đề nghiêm trọng về tim mạch, phổi, thận, gan, đường tiêu hóa, thần kinh, da, máu và nội hấp, mà cần phải theo dõi chuyên sâu và quản lý bệnh nhân. Phần lớn các tác dụng phụ này có thể được giải thích bằng sự phát triển của cái gọi là hội chứng rò rỉ mạch máu (hay mao mạch), sự gia tăng bệnh lý về tính thấm của mạch máu dẫn đến sự tràn dịch trong nhiều cơ quan (gây ra, ví dụ, bệnh phù phổi và tế bào da và phá hủy tế bào gan) và sự tiêu diệt lòng nội mạch (gây ra bệnh giảm huyết áp và bệnh tăng bù nhịp tim). Không có phương pháp điều trị VLS ngoài việc rút bớt IL-2. Phác đồ IL-2 liều lượng thấp đã được thử nghiệm ở các bệnh nhân để tránh VLS, tuy nhiên, với chi phí của kết quả điều trị dưới mức tối ưu. Tin

rằng VLS được tạo ra bởi sự giải phóng xytokin tiền viêm, như (TNF)- α yếu tố hoại tử khối u từ các tế bào NK được hoạt hóa bởi IL-2, tuy nhiên gần đây đã thấy rằng bệnh phù phổi gây ra bởi IL-2 là kết quả của sự gắn kết trực tiếp của IL-2 với tế bào nội mô phổi, mà biểu hiện các mức thụ thể IL-2 $\alpha\beta\gamma$ chức năng từ mức thấp đến mức trung bình (Krieg và các đồng tác giả, Proc Nat Acad Sci USA 107, 11906-11 (2010)).

Một vài phương pháp đã được thực hiện để giải quyết các vấn đề liên quan đến liệu pháp miễn dịch IL-2 này. Ví dụ, đã phát hiện ra rằng sự kết hợp của IL-2 với một số các kháng thể đơn dòng kháng IL-2 nhất định làm tăng cường tác dụng điều trị của IL-2 *in vivo* (Kamimura và các đồng tác giả, J Immunol 177, 306-14 (2006); Boyman và các đồng tác giả, Science 311, 1924-27 (2006)). Theo một phương án thay thế, IL-2 đã được gây đột biến theo nhiều cách khác nhau để làm giảm độc tính của nó và/hoặc làm tăng hiệu lực của nó. Hu và các đồng tác giả (Blood 101, 4853-4861 (2003), Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0124678) đã thay thế gốc arginin ở vị trí 38 của IL-2 bằng tryptophan để khử bỏ hoạt tính thấm của mạch máu của IL-2. Shanafelt và các đồng tác giả (Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000)) đã gây đột biến asparagin 88 thành arginin để tăng cường tính chọn lọc đối với tế bào T so với tế bào NK. Heaton và các đồng tác giả (Cancer Res 53, 2597-602 (1993); patent Mỹ số 5,229,109) đã đưa vào hai đột biến, Arg38Ala và Phe42Lys, để làm giảm sự tiết xytokin tiền viêm từ tế bào NK. Gillies và các đồng tác giả (công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/0036752) đã thay thế ba gốc của IL-2 (Asp20Thr, Asn88Arg, và Gln126Asp) góp phần vào ái lực cho thụ thể IL-2 có ái lực trung bình để làm giảm VLS. Gillies và các đồng tác giả (WO 2008/0034473) cũng đã gây đột biến bề mặt chung của IL-2 với CD25 bằng cách thay thế axit amin Arg38Trp và Phe42Lys để làm giảm sự tương tác với CD25 và sự hoạt hóa của tế bào T_{reg} để tăng cường hiệu lực. Cũng nhằm mục đích này, Wittrup và các đồng tác giả (WO 2009/061853) đã tạo ra thể đột biến IL-2 đã tăng cường ái lực với CD25, nhưng không hoạt hóa thụ thể, do đó nó hoạt động như chất đối kháng. Các đột biến được đưa vào là nhằm mục đích phá vỡ tương tác với cấu trúc dưới đơn vị β và/hoặc γ của thụ thể.

IL-2 polypeptit đột biến cụ thể, dùng để giải quyết các vấn đề liên quan đến liệu pháp miễn dịch IL-2 (độc tính gây ra bởi sự tạo ra VLS, tính dung nạp khối u gây ra bởi sự tạo ra AICD, và sự ức chế miễn dịch gây ra bởi sự hoạt hóa của tế bào T_{reg}) nêu trên, được mô tả trong WO 2012/107417. Sự thay thế gốc phenylalanin ở vị trí 42

bằng alanin, gốc tyrosin ở vị trí 45 bằng alanin và gốc leuxin ở vị trí 72 của IL-2 bằng glyxin về cơ bản khử bỏ gắn kết của IL-2 polypeptit đột biến này với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 (CD25).

Tiếp theo các phương pháp nêu trên, liệu pháp miễn dịch IL-2 có thể được cải thiện bằng cách hướng đích chọn lọc IL-2 với khối u, ví dụ, ở dạng thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể gắn kết với kháng nguyên được biểu hiện trên tế bào khối u. Một vài thể liên hợp miễn dịch như vậy đã được mô tả (xem, ví dụ, ấn phẩm Ko và các đồng tác giả, *J Immunother* (2004) 27, 232-239; Klein và các đồng tác giả, *Oncoimmunology* (2017) 6(3), e1277306).

Tuy nhiên, khối u có thể thoát được đích như vậy bằng cách chặn, gây đột biến hoặc điều hòa giảm kháng nguyên đích của kháng thể. Ngoài ra, IL-2 hướng đích khối u có thể không tiếp xúc tối ưu với tế bào tác động như tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL), trong vi môi trường khối u mà chủ động loại trừ tế bào lympho.

Do đó, vẫn có nhu cầu cải thiện tiếp liệu pháp miễn dịch IL-2. Phương pháp, mà có thể hạn chế được các vấn đề về việc hướng đích khối u, là hướng đích trực tiếp IL-2 vào tế bào tác động, cụ thể là CTL.

Ghasemi và các đồng tác giả đã mô tả protein dung hợp của IL-2 và protein gắn kết NKG2D (Ghashemi và các đồng tác giả, *Nat Comm* (2016) 7, 12878), để hướng đích IL-2 vào tế bào mang NKG2D như tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK).

Protein gây chết theo chương trình 1 (PD-1 hoặc CD279) là thành viên gây ức chế của họ thụ thể CD28, cũng chứa CD28, CTLA-4, ICOS và BTLA. PD-1 là thụ thể bề mặt tế bào và được biểu hiện trên các tế bào B, tế bào T, và tế bào tủy sống đã được hoạt hóa (Okazaki et al (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett và các đồng tác giả (2003) *J Immunol* 170:711-8). Cấu trúc của PD-1 là protein xuyên màng dạng monome 1, được cấu thành bởi một miền ngoại bào giống biến thể globulin miễn dịch và miền tế bào chất chứa motif ức chế trên cơ sở tyrosin-thụ thể miễn dịch (ITIM) và motif chuyển trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch (immunoreceptor tyrosine-based switch motif - ITSM). Hai phối tử cho PD-1 đã được xác định, PD-L1 và PD-L2, đã cho thấy sự điều hòa giảm quá trình hoạt hóa tế bào T khi gắn kết với PD-1 (Freeman et al (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman et al (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Cả PD-L1 và PD-L2 đều là chất tương

đồng B7 gắn kết với PD-1, chứ không gắn kết với các thành viên họ CD28 khác. Một phối tử cho PD-1, PD-L1 có nhiều ở các dạng ung thư khác nhau của người (Dong et al (2002) Nat. Med 8:787-9). Sự tương tác giữa PD-1 và PD-L1 dẫn đến việc làm giảm số lượng tế bào lympho thâm nhập vào khối u, làm giảm quá trình tăng sinh qua trung gian thụ thể tế bào T, và sự lẩn tránh miễn dịch bởi tế bào ung thư (Dong và các đồng tác giả (2003) J. Mol. Med. 81:281-7; Blank và các đồng tác giả (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi và các đồng tác giả (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100). Sự ức chế miễn dịch có thể được đảo ngược bằng cách ức chế sự tương tác khu trú của PD-1 với PD-L1, và hiệu quả này cũng được bổ sung khi sự tương tác giữa PD-1 với PD-L2 bị phong bế (Iwai và các đồng tác giả (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 12293-7; Brown và các đồng tác giả (2003) J. Immunol. 170:1257-66).

Các kháng thể gắn kết với PD-1 được mô tả, ví dụ, trong đơn PCT số PCT/EP2016/073248.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế đề xuất phương pháp hướng đích mới dạng đột biến của IL-2 với các đặc tính có lợi đối với liệu pháp miễn dịch trực tiếp vào tế bào tác động miễn dịch, như tế bào lympho T gây độc tế bào, thay vì tế bào khối u. Việc hướng đích vào tế bào tác động miễn dịch đạt được bằng cách tiếp hợp phân tử IL-2 đột biến với kháng thể gắn kết với PD-1.

Thể đột biến IL-2 dùng theo sáng chế đã được dùng để giải quyết các vấn đề liên quan đến liệu pháp miễn dịch IL-2, cụ thể là độc tính gây ra bởi sự tạo ra VLS, tính dung nạp khối u gây ra bởi sự tạo ra AICD, và sự ức chế miễn dịch gây ra bởi sự hoạt hóa tế bào T_{reg}. Ngoài việc hạn chế việc thoát khối u khỏi sự hướng đích khối u như được mô tả trên đây, việc hướng đích thể đột biến IL-2 vào tế bào tác động miễn dịch có thể làm tăng tiếp sự hoạt hóa ưu tiên của CTL so với tế bào T_{reg} ức chế miễn dịch. Bằng cách sử dụng kháng thể gắn kết với PD-1, sự ức chế hoạt tính tế bào T được tạo ra bởi sự tương tác giữa PD-1 và PD-L1 phối tử của nó có thể được đảo ngược tiếp, do đó làm tăng cường tiếp đáp ứng miễn dịch.

Protein dung hợp IL-2 bao gồm kháng thể atezolizumab kháng PD-L1 đã được mô tả bởi Chen và các đồng tác giả (Chen và các đồng tác giả, Biochem Biophys Res Comm (2016) 480, 160-165).

Tất nhiên là, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, chứa kháng thể gắn kết với PD-1, có hiệu quả kháng khối u *in vivo* vượt trội đáng kể so với thể liên hợp miễn dịch hướng đích PD-L1 tương tự (xem, Ví dụ 3 trong phần dưới đây).

Theo khía cạnh chung, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể gắn kết với PD-1 và polypeptit truyền tín hiệu qua IL-2R $\beta\gamma$. Polypeptit truyền tín hiệu qua IL-2R $\beta\gamma$, cụ thể là IL-2 polypeptit hoặc IL-15 polypeptit. Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19).

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và trong đó kháng thể này bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region - VH) bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và FR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 ở các vị trí 71-73 theo hệ đánh số Kabat, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region - VL) bao gồm HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, hoặc trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO:18.

Thể liên hợp miễn dịch theo một số phương án của sáng chế, IL-2 polypeptit đột biến còn bao gồm sự thay thế axit amin T3A và/hoặc sự thay thế axit amin C125A. Theo một số phương án, IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa không nhiều hơn một IL-2 polypeptit đột biến. Theo một số phương án, kháng thể chứa miền Fc gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai. Theo các phương án như vậy, miền Fc là lớp IgG, cụ thể là phân lớp IgG₁, miền Fc, và/hoặc miền Fc là miền Fc của người. Theo một số phương án, kháng thể là lớp IgG, cụ thể là globulin miễn dịch của phân lớp IgG₁.

Theo một số phương án, trong đó thể liên hợp miễn dịch chứa miền Fc, miền Fc bao gồm sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc. Theo một số phương án, trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất mà có thể định vị trong một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai trong phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất có thể định vị. Theo một số phương án, trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, ngoài ra gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc ngoài ra gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin

(Y407V) và tùy ý gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo các phương án như vậy, trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C) hoặc gốc axit glutamic ở vị trí 356 được thay thế bằng gốc xystein (E356C), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một số phương án, IL-2 polypeptit đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó với axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc, cụ thể là cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, tùy ý thông qua peptit cầu nối. Theo các phương án như vậy, peptit cầu nối có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

Theo một số phương án, trong đó thể liên hợp miễn dịch chứa miền Fc, miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin làm giảm gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là thụ thể Fc γ , và/hoặc chức năng tác động, cụ thể là tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC). Theo một số phương án như vậy, một hoặc nhiều thay thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm L234, L235, và P329 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một số phương án, mỗi cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc bao gồm các thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế chứa polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24, và polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:25. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch về cơ bản được cấu thành bởi IL-2 polypeptit đột biến và phân tử globulin miễn dịch IgG₁, được nối bởi trình tự cầu nối.

Sáng chế còn đề xuất một hoặc nhiều polynucleotit phân lập mã hóa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, một hoặc nhiều véc-tơ (cụ thể là véc-tơ biểu hiện) bao gồm polynucleotit, và tế bào vật chủ bao gồm (các) polynucleotit hoặc (các) véc-tơ đã nêu.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra các thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, bao gồm các bước (a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện thể liên hợp miễn dịch, và tùy ý (b) thu hồi thể liên hợp miễn dịch này. Sáng chế cũng đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, được tạo ra bằng phương pháp này.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế và chất mang dược dụng, và phương pháp sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế để dùng làm thuốc, và để dùng trong điều trị bệnh. Theo phương án cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế để bào chế thuốc điều trị bệnh. Theo phương án cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo phương án cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp kích thích hệ miễn dịch của cá thể, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế ở dạng dược dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện dạng thể liên hợp miễn dịch IgG-IL-2, bao gồm IL-2 polypeptit đột biến.

Fig. 2 thể hiện gắn kết của PD1-IL2v với tế bào T CD4 (A) và tế bào T CD8 (B) trong PBMC được hoạt hóa PHA, so với PD1 IgG và CEA-IL2v.

Fig. 3 thể hiện quá trình tăng sinh của tế bào NK (A), tế bào T CD8 (B) và tế bào T CD4 (C) trong PBMC với PD1-IL2v, CEA-IL2v, và tổ hợp của PD1 IgG cộng CEA-IL2v. PD1 IgG được chứa làm mẫu đối chứng.

Fig. 4 thể hiện sự hoạt hóa của tế bào NK (A), tế bào T CD8 (B) và tế bào T CD4 (C) trong PBMC với PD1-IL2v, CEA-IL2v, và tổ hợp của PD1 IgG cộng CEA-

IL2v. PD1 IgG được chứa làm mẫu đối chứng. CD25 biểu hiện trên tế bào NK, tế bào T CD4 và tế bào T CD8 được dùng làm chất đánh dấu hoạt hóa.

Fig. 5 thể hiện quá trình tăng sinh của tế bào T CD8 (A) và tế bào T CD4 (B) được hoạt hóa sơ bộ bằng PHA trong PBMC với PD1-IL2v, CEA-IL2v, và tổ hợp của PD1 IgG cộng CEA-IL2. PD1 IgG được chứa làm mẫu đối chứng.

Fig. 6 thể hiện sự hoạt hóa của tế bào T CD8 (A) và tế bào T CD4 (B) được kích thích sơ bộ bằng PHA trong PBMC với PD1-IL2v, CEA-IL2v, và tổ hợp của PD1 IgG cộng CEA-IL2v. PD1 IgG được chứa làm mẫu đối chứng. CD25 biểu hiện trên tế bào T CD4 và tế bào T CD8 được dùng làm chất đánh dấu hoạt hóa.

Fig. 7 thể hiện quá trình tăng sinh của dòng tế bào NK của người NK92 gây ra bởi PD-L1-IL2v so với CEA-IL2v (A), hoặc bằng PD-L1-IL2v so với PD1-IL2v (B), được đo sau 2 ngày.

Fig. 8 thể hiện gắn kết của PD-L1-muIL2v và PD-L1 muIgG₁ với dòng tế bào T chuột nhất dương tính với PD-L1 CTLL2.

Fig. 9 thể hiện quá trình tăng sinh của dòng tế bào T chuột nhất dương tính với PD-L1 CTLL2 gây ra bởi PD1-muIL2v so với CEA-muIL2v (A), hoặc bởi PD1-muIL2v so với PD-L1-muIL2v (B), được xác định sau 3 ngày.

Fig. 10 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực với kháng thể PD1-IL2v, PD-L1-IL2v hoặc PD1 và PD-L1 dưới dạng một tác nhân duy nhất. Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy chuyển nhiễm Panc02-H7-Fluc được tiêm vào tuyến tụy của chuột nhất Black 6 để nghiên cứu sự sống sót ở mô hình đồng gen thẳng tuyến tụy.

Fig. 11 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực với kháng thể PD1-IL2v, PD-L1-IL2v hoặc PD1 và PD-L1 dưới dạng một tác nhân duy nhất. Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy chuyển nhiễm Panc02-H7-Fluc được tiêm vào tuyến tụy ở chuột nhất Black 6 để nghiên cứu mức sống sót ở mô hình đồng gen thẳng tuyến tụy bằng phát quang sinh học.

Fig. 12 thể hiện khả năng của tế bào T CD4 để tiết IL-2 (A), IL-2 và IFN- γ (B) hoặc IFN- γ (C) sau 48 giờ thu hồi protein sinh miễn dịch CMV pp65 với sự có mặt của chỉ một mình hoặc kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1, kết hợp với IL-2v, hoặc dưới dạng protein dung hợp.

Fig. 13 thể hiện trạng thái biệt hóa của tế bào T CD4 đặc hiệu virus tiết chỉ IL-2 (A), cả IL-2 lẫn IFN- γ (B), hoặc chỉ IFN- γ (C và D) sau 48 giờ thu hồi protein sinh miễn dịch CMV pp65 với sự có mặt của chỉ một mình hoặc kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1, kết hợp với IL-2v, hoặc dưới dạng protein dung hợp.

Fig. 14 thể hiện thử nghiệm gắn kết cạnh tranh của PD1 và PD1-IL2v với tế bào T thông thường và tế bào T điều hòa được hoạt hóa. Delta của tần suất được gắn kết trên T_{conv} và T_{reg} (Fig. 14A) và gắn kết với T_{conv} và T_{reg} (Fig. 14B).

Fig. 15 thể hiện sự đảo ngược PD1-IL2v của mức ức chế T_{reg} của T_{conv}. Tỷ lệ phần trăm mức ức chế bởi T_{reg} của granzym B (Fig. 15A) và interferon- γ (Fig. 15B) được tiết bởi T_{conv} sau 5 ngày nuôi cấy đồng thời.

Fig. 16 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh kháng thể muPD1-IL2v với kháng thể muFAP-IL2v và muPD-1 dưới dạng một tác nhân duy nhất và ở dạng kết hợp.

Fig. 17 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh muPD1-IL2v với FAP-IL2v, muPD1 và tổ hợp của chúng.

Fig. 18A và Fig.18B thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm để phân tích kháng thể CD3 kháng chuột (Fig. 18A) và phân tích định lượng tế bào T (Fig. 18B).

Fig. 19 thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể PD1 kháng chuột.

Fig. 20 thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể ICOS kháng chuột .

Fig. 21 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh muPD1-IL2v với FAP-IL2v và muPD1 dưới dạng một tác nhân duy nhất và ở dạng kết hợp.

Fig. 22 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh muPD1-IL2v với FAP-IL2v, muPD1 và tổ hợp của chúng với hai liều dùng khác nhau.

Fig. 23 thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể CD3 kháng chuột.

Fig. 24A và Fig. 24B thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể CD8 kháng chuột (Fig. 24A) và phân tích định lượng tế bào T (Fig. 24B).

Fig. 25A và Fig. 25B thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho phân tích định lượng vùng đánh dấu kháng Granzym B (Fig. 25A) và Granzym B (Fig. 25B).

Fig. 26A và Fig. 26B thể hiện hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể PD1 kháng chuột (Fig. 26A) và phân tích định lượng tế bào dương tính với PD1 (Fig. 26B).

Fig. 27A-D thể hiện khả năng của tế bào T CD4 để tiết IL-2 (A), IL-2 và IFN- γ (B) hoặc IFN- γ (C) và để tăng sinh (D) sau 48 giờ thu hồi protein sinh miễn dịch CMV pp65 với sự có mặt của hoặc kháng thể kháng PD-1 một mình, kết hợp với IL-2v, hoặc dưới dạng protein dung hợp.

Fig. 28 thể hiện trạng thái biệt hóa, cho mỗi sự biểu hiện của CD45RO và CD62L, tế bào T CD4 đặc hiệu virus tiết IFN- γ sau 48 giờ thu hồi protein sinh miễn dịch CMV pp65 với sự có mặt của hoặc kháng thể kháng PD-1 một mình, kết hợp với IL-2v, hoặc dưới dạng protein dung hợp.

Fig. 29A-D thể hiện thử nghiệm STAT5 trên PBMC nghỉ của thể nhận thứ nhất (tế bào T CD8 (A), tế bào NK (B), tế bào T CD4 (C) và tế bào T điều hòa (D)).

Fig. 30A-D thể hiện thử nghiệm STAT5 trên PBMC nghỉ của thể cho thứ hai (tế bào T CD4 (A), tế bào T CD8 (B), tế bào T điều hòa (C) và tế bào NK (D)).

Fig. 31A-D thể hiện thử nghiệm STAT5 trên PBMC nghỉ của thể cho thứ ba (tế bào T CD8 (A), tế bào NK (B), tế bào T CD4 (C) và tế bào T điều hòa (D)).

Fig. 32A-D thể hiện thử nghiệm STAT5 trên PBMC nghỉ của thể cho thứ tư (tế bào T CD8 (A), tế bào NK (B), tế bào T CD4 (C) và tế bào T điều hòa (D)).

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây như thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ “interleukin-2” hoặc “IL-2”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ IL-2 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này cũng bao gồm IL-2 chưa được xử lý cũng như dạng bất kỳ của IL-2 thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể tự nhiên của IL-2, ví dụ, các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. Trình tự axit amin của IL-2 của người được lấy làm ví dụ được nêu trong SEQ ID NO: 19. IL-2 của người chưa được xử lý còn bao gồm peptit truyền tín hiệu có 20 axit amin đầu tận cùng N có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 26, không có mặt trong phân tử IL-2 trưởng thành.

Thuật ngữ “thể đột biến IL-2” hoặc “IL-2 polypeptit đột biến” như được sử dụng trong bản mô tả được dự định để bao hàm các dạng đột biến bất kỳ của các dạng khác nhau của phân tử IL-2 bao gồm IL-2 có chiều dài đầy đủ, IL-2 dạng cắt và các dạng trong đó IL-2 được liên kết với phân tử khác như bằng cách dung hợp hoặc liên hợp hóa học. “Có chiều dài đầy đủ” khi được dùng đối với IL-2 được dự định để chỉ phân tử IL-2 dài tự nhiên, trưởng thành. Ví dụ, IL-2 của người có chiều dài đầy đủ dùng để chỉ phân tử có 133 axit amin (xem, ví dụ, SEQ ID NO: 19). Các dạng khác nhau của thể đột biến IL-2 được đặc trưng bởi có ít nhất một đột biến axit amin tác động đến sự tương tác của IL-2 với CD25. Đột biến này có thể bao gồm sự thay thế, sự khuyết đoạn, sự làm cắt hoặc sự cải biến gốc axit amin kiểu đại thường nằm ở vị trí này. Thể đột biến thu được bằng cách thay thế axit amin được ưu tiên. Trừ khi có quy định khác, thể đột biến IL-2 trong bản mô tả có thể được dùng để chỉ trình tự IL-2 peptit đột biến, IL-2 polypeptit đột biến, IL-2 protein đột biến hoặc chất tương tự IL-2 đột biến.

Việc thiết kế các dạng khác nhau của IL-2 trong bản mô tả được thực hiện đối với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19. Các tên gọi khác nhau có thể được dùng trong bản mô tả để chỉ cùng một loại đột biến. Ví dụ, đột biến từ phenylalanin ở vị trí 42 thành alanin có thể được chỉ ra dưới dạng 42A, A42, A₄₂, F42A, hoặc Phe42Ala.

Thuật ngữ “phân tử IL-2 của người”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là phân tử IL-2 chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95% hoặc ít nhất là khoảng 96% với trình tự IL-2 của người

nêu trong SEQ ID NO:19. Cụ thể, mức đồng nhất trình tự ít nhất là khoảng 95%, cụ thể hơn ít nhất là khoảng 96%. Theo các phương án cụ thể, phân tử IL-2 của người là phân tử IL-2 có chiều dài đầy đủ.

Thuật ngữ “đột biến axit amin”, như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là các đột biến thay thế, các khuyết đoạn, các cài xen, và các cải biến axit amin. Sự kết hợp bất kỳ của các thay thế, các khuyết đoạn, các cài xen, và các cải biến này có thể được thực hiện để thu được cấu trúc hoàn thiện, với điều kiện cấu trúc hoàn thiện này có các đặc điểm đặc trưng mong muốn, ví dụ, sự gắn kết với CD25 giảm. Sự khuyết đoạn và sự cài xen trình tự axit amin bao gồm sự khuyết đoạn và sự cài xen đầu tận cùng amino và/hoặc carboxy của axit amin. Một ví dụ về sự khuyết đoạn đầu tận cùng là sự khuyết đoạn của gốc alanin ở vị trí 1 của IL-2 của người có chiều dài đầy đủ. Đột biến axit amin được ưu tiên là đột biến thay thế axit amin. Nhằm mục đích biến đổi, ví dụ, đặc điểm gắn kết của IL-2 polypeptit, sự thay thế axit amin không bảo toàn, tức là sự thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có đặc tính hóa học và/hoặc cấu trúc khác nhau, được đặc biệt ưu tiên. Sự thay thế axit amin được ưu tiên bao gồm sự thay thế axit amin kỵ nước bằng axit amin ưa nước. Sự thay thế axit amin bao gồm sự thay thế bằng dẫn xuất axit amin không có trong tự nhiên hoặc bằng dẫn xuất axit amin có trong tự nhiên của hai mươi axit amin chuẩn (ví dụ, 4-hydroxyprolin, 3-methylhistidin, ornithin, homoserin, 5-hydroxylysin). Đột biến axit amin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học hoặc di truyền đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm gây đột biến hướng vị trí, PCR, tổng hợp gen và các phương pháp tương tự. Được dự tính là phương pháp biến đổi nhóm chuỗi bên của axit amin bằng các phương pháp khác với phương pháp sử dụng thao tác di truyền, như cải biến hóa học, cũng có thể là hữu ích.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng IL-2 “kiểu đại” là dạng IL-2 khác với IL-2 polypeptit đột biến chỉ khác là dạng kiểu đại có axit amin kiểu đại ở mỗi vị trí axit amin của IL-2 polypeptit đột biến. Ví dụ, nếu thể đột biến IL-2 là IL-2 có chiều dài đầy đủ (tức là IL-2 không được dung hợp hoặc liên hợp với phân tử khác bất kỳ), dạng kiểu đại của đột biến này là IL-2 nguyên thể có chiều dài đầy đủ. Nếu thể đột biến IL-2 là thể dung hợp giữa IL-2 và polypeptit khác mã hóa xuôi chiều IL-2 (ví dụ, chuỗi kháng thể) dạng kiểu đại của thể đột biến IL-2 này là IL-2 với trình tự axit amin kiểu đại, được dung hợp vào cùng polypeptit xuôi chiều. Hơn nữa, nếu thể đột biến IL-

2 là dạng IL-2 cắt (trình tự đột biến hoặc cải biến trong vị trí không cắt của IL-2) thì dạng kiểu đại của thể đột biến IL-2 này là IL-2 được cắt cắt tương tự có trình tự kiểu đại. Nhằm mục đích so sánh ái lực gắn kết thụ thể IL-2 hoặc hoạt tính sinh học của các dạng khác nhau của thể đột biến IL-2 với dạng IL-2 kiểu đại tương ứng, thuật ngữ dạng kiểu đại bao gồm các dạng IL-2 chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin không ảnh hưởng đến gắn kết thụ thể IL-2 so với IL-2 nguyên thể có trong tự nhiên như, ví dụ, sự thay thế xystein ở vị trí tương ứng với gốc 125 của IL-2 của người bằng alanin. Theo một số phương án, IL-2 kiểu đại nhằm mục đích theo sáng chế bao gồm sự thay thế axit amin C125A (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29). Theo một số phương án theo sáng chế, IL-2 polypeptit kiểu đại mà IL-2 polypeptit đột biến được so sánh chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19. Theo các phương án khác, IL-2 polypeptit kiểu đại mà IL-2 polypeptit đột biến được so sánh chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29.

Thuật ngữ “CD25” hoặc “cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ CD25 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như đối với động vật linh trưởng (ví dụ, người) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm CD25 “có chiều dài đầy đủ”, chưa xử lý cũng như dạng bất kỳ của CD25 thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể tự nhiên của CD25, ví dụ, các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. Theo một số phương án, CD25 là CD25 của người. Trình tự axit amin của CD25 của người được tìm thấy, ví dụ, trong UniProt mục số P01589 (phiên bản 185).

Thuật ngữ “thụ thể IL-2 có ái lực cao”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ dạng dị trime của thụ thể IL-2, được cấu thành bởi cấu trúc dưới đơn vị γ của thụ thể (còn được gọi chung là cấu trúc dưới đơn vị γ của thụ thể xytokin, γ_c , hoặc CD132, xem UniProt mục số P14784 (phiên bản 192)), cấu trúc dưới đơn vị β của thụ thể (còn được gọi là CD122 hoặc p70, xem UniProt mục số P31785 (phiên bản 197)) và cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể (còn được gọi là CD25 hoặc p55, xem UniProt mục số P01589 (phiên bản 185)). Ngược lại, thuật ngữ “thụ thể IL-2 có ái lực trung bình” dùng để chỉ thụ thể IL-2 chỉ bao gồm cấu trúc dưới đơn vị γ và cấu trúc dưới đơn vị β , không có cấu trúc dưới đơn vị α (để xem xét, xem, ví dụ, Olejniczak và Kasprzak, Med Sci Monit 14, RA179-189 (2008)).

“Ái lực” dùng để chỉ độ bền của tổng tất cả các tương tác không cộng hóa trị giữa một vị trí gắn kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, thụ thể) và phân tử gắn kết kèm theo của nó (ví dụ, phối tử). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, “ái lực gắn kết” dùng để chỉ ái lực gắn kết thực chất phản ánh tương tác 1:1 giữa thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên và kháng nguyên, hoặc thụ thể và phối tử của nó). Ái lực của phân tử X đối với phân tử đi kèm Y của nó có thể thường được biểu diễn bằng hằng số phân ly (K_D), là tỷ lệ giữa hằng số phân ly và hằng số liên kết (lần lượt là k_{off} và k_{on}). Do đó, ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tỷ lệ khác miễn là tỷ lệ giữa các hằng số tốc độ không đổi. Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp đã thiết lập đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các phương pháp được đề cập trong bản mô tả này. Một phương pháp đo ái lực cụ thể là phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance - SPR).

Ái lực của IL-2 polypeptit đột biến hoặc kiểu đại cho các dạng thụ thể IL-2 khác nhau có thể được xác định theo phương pháp được nêu trong WO 2012/107417 bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), bằng cách sử dụng thiết bị chuẩn như thiết bị BIAcore (GE Healthcare) và cấu trúc dưới đơn vị thụ thể mà có thể thu được bằng sự biểu hiện tái tổ hợp (xem, ví dụ, Shanafelt và các đồng tác giả, Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000)). Theo cách khác, ái lực gắn kết của thể đột biến IL-2 cho các dạng thụ thể IL-2 khác nhau có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào đã biết để biểu hiện một hoặc dạng như vậy khác nữa của thụ thể. Các phương án cụ thể minh họa và được lấy làm ví dụ để đo ái lực gắn kết là như được mô tả dưới đây.

“Tế bào T điều hòa” hoặc “tế bào T_{reg} ” nghĩa là dạng tế bào T $CD4^+$ cụ thể có thể ức chế các đáp ứng của các tế bào T khác. Tế bào T_{reg} được đặc trưng bởi sự biểu hiện của cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 (CD25) và hộp đầu hình đĩa yếu tố phiên mã P3 (FOXP3) (Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004)) và đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra và duy trì quá trình tự dung nạp ngoại vi với kháng nguyên, bao gồm các tế bào được biểu hiện bởi khối u. Tế bào T_{reg} cần IL-2 cho chức năng và sự phát triển của chúng và sự tạo ra đặc tính ức chế của chúng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào tác động” dùng để chỉ quần thể tế bào lympho làm trung gian tác động gây độc tế bào của IL-2. Tế bào tác động bao gồm tế bào T tác động như tế bào T gây độc tế bào $CD8^+$, tế bào NK, tế bào tiêu diệt được hoạt hóa bởi lymphokin (LAK) và đại thực bào/bạch cầu đơn nhân.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “PD1”, “PD1 của người”, “PD-1” hoặc “PD-1 của người” (còn được gọi là protein gây chết tế bào theo chương trình 1, hoặc sự chết theo chương trình 1) dùng để chỉ protein PD1 của người (SEQ ID NO: 27, protein không có trình tự truyền tín hiệu)/(SEQ ID NO: 28, protein có trình tự truyền tín hiệu). Cũng xem số nhập UniProt Q15116 (phiên bản 156). Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể "gắn kết với PD-1", "gắn kết đặc hiệu với PD-1", “gắn kết với PD-1” hoặc “kháng thể kháng PD-1” dùng để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết PD-1, đặc biệt là PD-1 polypeptit được biểu hiện trên bề mặt tế bào, với ái lực đủ để kháng thể có thể dùng làm tác nhân chẩn đoán và/hoặc chữa bệnh ở PD-1 hướng đích. Theo một phương án, mức gắn kết của kháng thể kháng PD-1 với protein không PD-1 không liên quan là thấp hơn 10% mức gắn kết của kháng thể với PD-1 như đo được, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc phương pháp đếm tế bào dòng chảy (FACS) hoặc bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng hệ thống cảm biến sinh học như hệ thống Biacore®. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với PD-1 có giá trị KD của ái lực gắn kết đối với gắn kết với PD-1 của người là $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001 \text{ nM}$ (ví dụ, bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} M , ví dụ, nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, nằm trong khoảng từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo một phương án, giá trị KD của ái lực gắn kết được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng miễn dịch ngoại bào (ECD) của PD-1 của người (PD-1-ECD, xem trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43) làm kháng nguyên.

"Gắn kết đặc hiệu" nghĩa là gắn kết có chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể được phân biệt với các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng gắn kết của kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu (ví dụ, PD-1) có thể được đo hoặc thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được liên kết với enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) hoặc các kỹ thuật khác tương tự đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích, ví dụ, trên thiết bị BIAcore) (Liljeblad và các đồng tác giả, Glyco J 17, 323-329 (2000)), và thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một phương án, mức gắn kết của kháng thể với protein không liên quan là thấp hơn 10% mức gắn kết của kháng thể với kháng nguyên như

được đo, ví dụ, bằng SPR. Kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch được đề cập trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với PD-1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit" dùng để chỉ phân tử gồm monome (axit amin) được liên kết tuyến tính bằng liên kết amit (còn được gọi là liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" dùng để chỉ chuỗi bất kỳ của hai hoặc nhiều axit amin, và không dùng để chỉ chiều dài cụ thể của sản phẩm. Do đó, peptit, dipeptit, tripeptit, oligopeptit, "protein", "chuỗi axit amin", hoặc thuật ngữ khác bất kỳ được sử dụng để chỉ chuỗi gồm hai hoặc nhiều axit amin, nằm trong định nghĩa về "polypeptit", và thuật ngữ "polypeptit" có thể được dùng thay cho, hoặc hoán đổi, các thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ này. Thuật ngữ "polypeptit" cũng dự định để chỉ sản phẩm của quá trình cải biến sau biểu hiện của polypeptit chứa, mà không chỉ giới hạn ở, quá trình glycosyl hóa, quá trình axetyl hóa, quá trình phosphoryl hóa, quá trình amit hóa, sự dẫn xuất bởi các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết, phân cắt bằng enzym phân hủy protein, hoặc cải biến bằng axit amin không có trong tự nhiên. Polypeptit có thể có nguồn gốc từ nguồn sinh học tự nhiên hoặc được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp, nhưng không nhất thiết được dịch mã từ trình tự axit nucleic đã được định danh. Nó có thể được tạo ra theo cách bất kỳ, bao gồm bằng phương pháp tổng hợp hóa học. Polypeptit có thể có cấu trúc ba chiều xác định, mặc dù chúng không nhất thiết phải có cấu trúc như vậy. Polypeptit với cấu trúc ba chiều xác định được gọi là cuộn xoắn, và polypeptit không có cấu trúc ba chiều xác định, nhưng có thể chấp nhận một lượng lớn các dạng cấu tạo khác nhau, và được gọi là không cuộn xoắn.

Thuật ngữ polypeptit hoặc biến thể "phân lập", hoặc dẫn xuất của chúng được dự định để chỉ polypeptit không phải là trong môi trường tự nhiên của nó. Không có yêu cầu về mức tinh khiết cụ thể. Ví dụ, polypeptit phân lập có thể được loại bỏ khỏi môi trường nguyên thể hoặc tự nhiên của nó. Polypeptit và protein được tạo ra bằng cách tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào vật chủ được xem là được phân lập nhằm mục đích của sáng chế, như là các polypeptit nguyên thể hoặc tái tổ hợp đã được tách, phân đoạn, hoặc được tinh chế một phần hoặc về cơ bản bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

“Tỷ lệ phần trăm (%) mức đồng nhất của trình tự axit amin” đối với trình tự polypeptit tham chiếu được xác định bằng tỷ lệ phần trăm của gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà đồng nhất với gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu,

sau khi sắp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất trình tự tối đa, và không xem xét sự thay thế bảo toàn bất kỳ như là một phần của mức đồng nhất trình tự. Sự sắp thẳng hàng nhằm mục đích xác định tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất của trình tự axit amin có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau nằm trong phạm vi hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có sẵn công khai như BLAST, BLAST-2, Clustal W, phần mềm Megalign (DNASTAR) hoặc gói chương trình FASTA. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để sắp thẳng hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp hàng tối đa so với chiều dài đầy đủ của các trình tự được so sánh. Nhằm các mục đích trong bản mô tả này, tuy nhiên, giá trị % mức đồng nhất của trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình ggsearch của gói phần mềm FASTA phiên bản 36.3.8c hoặc phiên bản mới hơn với ma trận so sánh BLOSUM50. Gói chương trình FASTA của tác giả W. R. Pearson và D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258; và Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36, và được công khai trên http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. Theo cách khác, máy chủ công cộng có thể truy cập tại http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi có thể được dùng để so sánh các trình tự, bằng cách sử dụng chương trình ggsearch (protein toàn cầu: protein) và các tùy chọn mặc định (BLOSUM50; điểm mở: -10; ext: -2; Ktup = 2) để đảm bảo thực hiện được sự sắp thẳng hàng toàn cầu, thay vì cục bộ. Tỷ lệ phần trăm mức đồng nhất axit amin được đưa ra trong tiêu đề sắp thẳng hàng đầu ra.

Thuật ngữ "polynucleotit" dùng để chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic phân lập, ví dụ, ARN thông tin (mARN), ARN có nguồn gốc từ virus, hoặc ADN plasmit (pADN). Polynucleotit có thể bao gồm gắn kết phosphodiester thông thường hoặc gắn kết không thông thường (ví dụ, gắn kết amit, như được tìm thấy trong axit peptit nucleic (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh axit nucleic bất kỳ, ví dụ, mảnh ADN hoặc ARN, có mặt trong polynucleotit.

Phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit "được phân lập" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, mà đã được loại bỏ khỏi môi trường nguyên thể của

nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa polypeptit chứa trong véc-tơ được xem là được phân lập nhằm các mục đích theo sáng chế. Các ví dụ khác nữa về polynucleotit được phân lập bao gồm polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong tế bào vật chủ khác loài hoặc polynucleotit đã được tinh chế (một phần hoặc về cơ bản) trong dung dịch. Polynucleotit được phân lập bao gồm phân tử polynucleotit chứa trong tế bào mà ban đầu chứa phân tử polynucleotit, nhưng phân tử polynucleotit có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó. Phân tử ARN được phân lập bao gồm sản phẩm phiên mã *ARN in vivo* hoặc *in vitro* theo sáng chế, cũng như dạng sợi dương và âm, và dạng sợi kép. Polynucleotit hoặc axit nucleic được phân lập theo sáng chế còn bao gồm các phân tử được tạo ra bằng cách tổng hợp này. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể bao gồm yếu tố điều hòa như gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, hoặc gen kết thúc phiên mã.

“Polynucleotit (hoặc axit nucleic) được phân lập mã hóa [ví dụ, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế]” dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể và/hoặc IL-2 polypeptit (hoặc các mảnh của chúng), bao gồm các phân tử polynucleotit như vậy trong một véc-tơ duy nhất hoặc các véc-tơ riêng biệt, và các phân tử axit nucleic này có mặt ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào vật chủ.

Thuật ngữ "cát-xét biểu hiện" dùng để chỉ polynucleotit được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc bằng cách tổng hợp, với nhiều yếu tố axit nucleic cụ thể cho phép quá trình phiên mã axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Cát-xét biểu hiện tái tổ hợp có thể được đưa vào plasmit, nhiễm sắc thể, ADN ty thể, ADN plastit, virus, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, phần cát-xét biểu hiện tái tổ hợp của véc-tơ biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần được phiên mã và gen khởi đầu. Theo một số phương án, cát-xét biểu hiện bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng.

Thuật ngữ “véc-tơ” hoặc “véc-tơ biểu hiện” dùng để chỉ phân tử ADN được sử dụng để đưa vào và định hướng sự biểu hiện của gen đặc hiệu mà được liên kết có điều khiển trong tế bào. Thuật ngữ này bao gồm véc-tơ dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như véc-tơ được đưa vào bộ gen của tế bào vật chủ mà nó được đưa vào. Véc-tơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện. Véc-tơ biểu hiện cho phép phiên mã một lượng lớn mARN ổn định. Ngay khi véc-tơ biểu hiện ở bên trong tế bào,

phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bởi gen này được tạo ra bằng cơ chế phiên mã tế bào và/hoặc dịch mã tế bào. Theo một phương án, véc-tơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện mà chứa trình tự polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng.

Các thuật ngữ "tế bào vật chủ", "dòng tế bào vật chủ," và "môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng hoán đổi cho nhau và để chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thể hệ con của các tế bào này. Tế bào vật chủ bao gồm "thể biến nạp" và "tế bào đã được biến nạp," bao gồm tế bào đã được biến nạp chính và thể hệ con thu được từ các tế bào này mà không liên quan đến số lần cấy chuyển. Thể hệ con có thể không hoàn toàn giống hệt về hàm lượng axit nucleic với tế bào bố mẹ, nhưng có thể chứa các đột biến. Thể hệ con đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn đối với tế bào được biến đổi ban đầu được bao gồm trong bản mô tả này. Một tế bào vật chủ là loại bất kỳ của hệ tế bào mà có thể được dùng để tạo ra thể liên hợp miễn dịch của sáng chế. Tế bào vật chủ bao gồm tế bào đã được nuôi cấy, ví dụ, tế bào động vật có vú đã được nuôi cấy như tế bào HEK, tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào YO u tuỷ, tế bào u tuỷ P3X63 ở chuột cống, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai hóa, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật, chỉ kể tên một vài tế bào, mà còn cả các tế bào chứa trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc mô động vật hoặc mô thực vật đã được nuôi cấy.

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

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản tương đồng, tức là các kháng thể riêng rẽ chứa trong quần thể là đồng nhất và/hoặc gắn kết cùng epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể sẵn có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc sinh ra trong quá trình tạo ra chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy nói chung có mặt với lượng nhỏ. Ngược lại với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà điển hình là bao gồm các kháng thể kháng nhau hướng đến các yếu tố quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại

yếu tố quyết định đơn lẻ trên kháng nguyên. Do đó, dạng cải biến “đơn dòng” chỉ ra đặc điểm của kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản tương đồng, và không được hiểu là yêu cầu tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng để dùng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp lai hóa, phương pháp AND tái tổ hợp, phương pháp hiển thị thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần locut globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp được lấy làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được đề cập trong bản mô tả này.

Kháng thể “được phân lập” là kháng thể đã được tách khỏi thành phần của môi trường tự nhiên của nó, tức là không phải trong môi trường tự nhiên của nó. Không đòi hỏi mức tinh khiết cụ thể. Ví dụ, kháng thể phân lập có thể được loại bỏ khỏi môi trường nguyên thể hoặc tự nhiên của nó. Kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào vật chủ được xem là được phân lập nhằm mục đích theo sáng chế, là kháng thể nguyên thể hoặc tái tổ hợp đã được tách, được phân đoạn, hoặc được tinh chế một phần hoặc về cơ bản bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ. Như vậy, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế là thể phân lập. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, điện di (ví dụ, SDS-PAGE, đẳng điện hội tụ (IEF), điện di mao quản) hoặc phương pháp sắc ký (ví dụ, HPLC trao đổi ion hoặc pha đảo). Để xem xét về phương pháp đo độ tinh khiết của kháng thể, xem, ví dụ, Flatman và các đồng tác giả, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Các thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ,” “kháng thể nguyên vẹn,” và “toàn bộ kháng thể” được sử dụng hoán đổi cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể nguyên thể.

“Mảnh kháng thể” dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn bao gồm phần kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết vào đó. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, kháng thể thể đôi, kháng thể tuyến tính, phân tử kháng thể sợi đơn (ví dụ, scFv), và kháng thể miền đơn. Để xem xét một số mảnh kháng thể nhất định, xem Holliger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005). Để xem xét các mảnh scFv, xem, ví dụ, Plückthun, trong *The Pharmacology of Monoclonal*

Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, các trang 269-315 (1994); cũng xem WO 93/16185; và các patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để mô tả về các mảnh Fab và F(ab')₂ bao gồm gốc epitop gắn kết thụ thể thu hồi và có chu kỳ bán rã *in vivo* tăng, xem patent Mỹ số 5,869,046. Kháng thể thể đôi là mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên có thể có hóa trị hai hoặc lưỡng đặc hiệu. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson và các đồng tác giả, Nat Med 9, 129-134 (2003); và Hollinger và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong Hudson và các đồng tác giả, Nat Med 9, 129-134 (2003). Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nhẹ của một kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,248,516 B1). Mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân cắt bằng enzym phân giải protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bằng tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ, E. coli hoặc thể thực khuẩn), như được đề cập trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “phân tử globulin miễn dịch” dùng để chỉ protein có cấu trúc của kháng thể có trong tự nhiên. Ví dụ, globulin miễn dịch của lớp IgG là các glycoprotein dị tetrame có kích thước khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được liên kết disulfua. Từ đầu tận cùng N đến C, mỗi chuỗi nặng có miền biến đổi (VH), cũng được gọi là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng, tiếp theo là ba miền ổn định (CH1, CH2, và CH3), cũng được gọi là vùng ổn định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận cùng N đến C, mỗi chuỗi nhẹ có miền biến đổi (VL), cũng được gọi là miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp theo là miền ổn định chuỗi nhẹ (CL), cũng được gọi là vùng ổn định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể được gán cho một trong năm kiểu, được gọi là α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số trong đó có thể được chia tiếp thành các kiểu phụ, ví dụ, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) và α_2 (IgA₂). Chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được gán cho một trong hai kiểu, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền ổn định của nó. Globulin miễn dịch về cơ bản được cấu thành bởi hai phân tử Fab và miền Fc, được liên kết qua vùng bản lề globulin miễn dịch.

Thuật ngữ "miền gắn kết kháng nguyên" dùng để chỉ phần kháng thể bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu với và bổ sung vào một phần hoặc toàn bộ kháng nguyên. Miền gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bởi, ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi kháng thể (còn được gọi là vùng biến đổi kháng thể). Cụ thể, miền gắn kết kháng nguyên bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể liên quan đến sự gắn kết của kháng thể vào kháng nguyên. Miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (lần lượt là VH và VL) của kháng thể nguyên thể thường có cấu trúc tương tự, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung bảo toàn (FR) và ba vùng siêu biến (HVR). Xem, ví dụ, Kindt và các đồng tác giả, *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Miền VH hoặc VL duy nhất có thể đủ để tạo ra tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Như được sử dụng trong bản mô tả khi nói đến trình tự vùng biến đổi, "đánh số theo hệ Kabat" dùng để chỉ hệ thống đánh số được nêu trong Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các vị trí axit amin của tất cả các vùng và miền ổn định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat được mô tả trong Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), để chỉ "đánh số theo Kabat" hoặc "đánh số Kabat" trong bản mô tả. Cụ thể, hệ thống đánh số Kabat (xem các trang 647-660 của Kabat, và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) được sử dụng cho miền ổn định chuỗi nhẹ CL của isotyp kappa và lambda và hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU (xem các trang 661-723) được sử dụng cho miền ổn định chuỗi nặng (CH1, vùng bản lề, CH2 và CH3), mà trong bản mô tả được làm rõ thêm bằng cách đề cập đến "đánh số theo chỉ số Kabat EU" trong trường hợp này.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ mỗi vùng của miền biến đổi kháng thể là siêu biến về trình tự ("vùng xác định bổ thể" hoặc "CDR") và/hoặc tạo ra vòng được xác định về mặt cấu trúc

(“vùng siêu biến”) và/hoặc chứa gốc tiếp xúc kháng nguyên (“tiếp xúc kháng nguyên”). Nói chung, kháng thể bao gồm sáu HVR; ba HVR trong VH (H1, H2, H3), và ba HVR trong VL (L1, L2, L3). HVR được lấy làm ví dụ trong bản mô tả bao gồm:

(a) vùng siêu biến xuất hiện ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR xuất hiện ở gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) các tiếp xúc kháng nguyên xuất hiện ở gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (MacCallum và các đồng tác giả *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); và

(d) tổ hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, gốc FR) được đánh số trong bản mô tả theo Kabat và các đồng tác giả, nêu trên.

"Vùng khung" hoặc "FR" dùng để chỉ gốc miền biến đổi không phải là gốc vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường được cấu thành bởi bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Kháng thể “được làm giống như kháng thể của người” dùng để chỉ kháng thể khảm bao gồm gốc axit amin từ HVR không phải của người và gốc axit amin từ FR của người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như kháng thể của người sẽ bao gồm về cơ bản tất cả ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả HVR (ví dụ, CDR) tương ứng với HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc về cơ bản tất cả FR tương ứng với FR của kháng thể của người. Các miền biến đổi này được dùng trong bản mô tả dùng để chỉ “vùng biến đổi được làm giống như kháng thể của người”. Kháng thể được làm giống như

kháng thể của người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần vùng ổn định kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm giống như kháng thể của người được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà từ đó gốc HVR được tạo ra, ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực kháng thể. “Dạng được làm giống như kháng thể của người” của kháng thể, ví dụ, của kháng thể không phải của người, dùng để chỉ kháng thể đã trải qua quá trình được làm giống như kháng thể của người. Dạng khác của “kháng thể được làm giống như kháng thể của người” nằm trong phạm vi của sáng chế là các kháng thể trong đó vùng ổn định đã được cải biến hoặc thay đổi thêm từ dạng kháng thể ban đầu để tạo ra các đặc tính theo sáng chế, đặc biệt là liên quan đến gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc (FcR).

“Kháng thể của người” là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể được tạo ra bởi người hoặc tế bào của người hoặc có nguồn gốc từ nguồn không phải của người mà sử dụng kho vốn kháng thể của người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể của người khác. Định nghĩa này về kháng thể của người không bao gồm cụ thể kháng thể được làm giống như kháng thể của người chứa gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người. Theo một số phương án, kháng thể của người có nguồn gốc từ động vật có vú chuyển gen không phải là người, ví dụ, chuột đồng, chuột nhắt, hoặc thỏ. Theo các phương án nhất định, kháng thể của người có nguồn gốc từ dòng tế bào lai. Kháng thể hoặc mảnh kháng thể được phân lập được từ thư viện kháng thể của người cũng được xem là kháng thể của người hoặc mảnh kháng thể của người trong bản mô tả.

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

Thuật ngữ “miền Fc” hoặc “vùng Fc” trong bản mô tả được sử dụng để xác định vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần vùng ổn định. Thuật ngữ này bao gồm vùng Fc trình tự nguyên thể và vùng Fc biến thể. Mặc dù các đường ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể thay đổi một chút, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định kéo dài từ Cys226, hoặc từ

Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, kháng thể được tạo ra bởi tế bào vật chủ có thể trải qua quá trình phân cắt sau dịch mã một hoặc nhiều, cụ thể là một hoặc hai, axit amin từ đầu tận cùng C của chuỗi nặng. Vì vậy, kháng thể được tạo ra bởi tế bào vật chủ nhờ sự biểu hiện của phân tử axit nucleic đặc hiệu mã hóa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ có thể chứa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, hoặc nó có thể chứa biến thể đã được phân cắt của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ (trong bản mô tả cũng được dùng để chỉ “biến thể chuỗi nặng đã được phân cắt”). Đây có thể là trường hợp trong đó hai axit amin đầu tận cùng C của chuỗi nặng cuối cùng là glyxin (G446) và lysin (K447, đánh số theo chỉ số Kabat EU). Vì vậy, lysin đầu tận cùng C (Lys447), hoặc glyxin đầu tận cùng C (Gly446) và lysin (K447), của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trình tự axit amin của chuỗi nặng bao gồm miền Fc (hoặc cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được xác định trong bản mô tả) được ký hiệu trong bản mô tả không có glyxin đầu tận cùng C-lysin dipeptit, nếu không có quy định khác. Theo một phương án theo sáng chế, chuỗi nặng bao gồm cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được đề cập trong bản mô tả này, chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, bao gồm glyxin đầu tận cùng C bổ sung - lysin dipeptit (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án theo sáng chế, chuỗi nặng bao gồm cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được mô tả trong bản mô tả này, chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, bao gồm gốc glyxin đầu tận cùng C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Dược phẩm theo sáng chế, như dược phẩm được đề cập trong bản mô tả này, bao gồm quần thể của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Quần thể của thể liên hợp miễn dịch có thể bao gồm các phân tử có chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và các phân tử có biến thể chuỗi nặng đã được phân cắt. Quần thể các thể liên hợp miễn dịch có thể bao gồm hỗn hợp của các phân tử có chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và các phân tử có biến thể chuỗi nặng đã được phân cắt, trong đó ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% thể liên hợp miễn dịch có biến thể chuỗi nặng đã được phân cắt. Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm này chứa quần thể của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm thể liên hợp miễn dịch chứa chuỗi nặng bao gồm cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được đề cập trong bản mô tả với glyxin đầu tận cùng C bổ sung - lysin dipeptit (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án theo sáng chế, dược phẩm chứa quần thể của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm thể liên hợp

miễn dịch chứa chuỗi nặng bao gồm cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được đề cập trong bản mô tả với gốc glyxin đầu tận cùng C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án theo sáng chế, được phẩm như vậy chứa quần thể của thể liên hợp miễn dịch chứa các phân tử bao gồm chuỗi nặng chứa cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được đề cập trong bản mô tả; các phân tử bao gồm chuỗi nặng chứa cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được đề cập trong bản mô tả với gốc glyxin đầu tận cùng C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat); và các phân tử bao gồm chuỗi nặng chứa cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc như được đề cập trong bản mô tả với glyxin đầu tận cùng C-lysine dipeptit bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, việc đánh số gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng ổn định tuân theo hệ thống đánh số EU, cũng được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (cũng xem trên đây). “Cấu trúc dưới đơn vị” của miền Fc như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ một trong số hai polypeptit tạo thành miền Fc dimer, tức là polypeptit chứa vùng ổn định đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, có khả năng tự kết hợp ổn định. Ví dụ, cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc IgG bao gồm miền ổn định IgG CH2 và IgG CH3.

“Cải biến thúc đẩy việc kết hợp giữa cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc” là việc thực hiện sự cải biến khung peptit hoặc cải biến sau dịch mã cấu trúc dưới đơn vị miền Fc để làm giảm hoặc ngăn ngừa sự kết hợp của polypeptit chứa cấu trúc dưới đơn vị miền Fc với polypeptit đồng nhất để tạo ra homodimer. Cải biến thúc đẩy việc kết hợp như được sử dụng trong bản mô tả cụ thể bao gồm sự cải biến riêng biệt được thực hiện cho mỗi trong số hai cấu trúc dưới đơn vị miền Fc mong muốn được kết hợp (tức là cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc), trong đó các cải biến này hỗ trợ với nhau để thúc đẩy sự kết hợp của hai cấu trúc dưới đơn vị miền Fc. Ví dụ, cải biến thúc đẩy việc kết hợp có thể biến đổi cấu trúc hoặc thay đổi một hoặc cả hai cấu trúc dưới đơn vị miền Fc để tạo ra sự kết hợp của chúng lần lượt về mặt không gian hoặc ở trạng thái tĩnh điện thuận lợi. Do đó, quá trình (dị) dimer hóa xảy ra giữa polypeptit chứa cấu trúc dưới đơn vị miền Fc thứ nhất và polypeptit chứa cấu trúc dưới đơn vị miền Fc thứ hai, có thể không đồng nhất trong trường hợp các thành phần khác nữa dung hợp vào mỗi

cấu trúc dưới đơn vị (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên) không giống nhau. Theo một số phương án, sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp bao gồm đột biến axit amin trong miền Fc, cụ thể là sự thay thế axit amin. Theo phương án cụ thể, cải biến thúc đẩy việc kết hợp bao gồm đột biến axit amin riêng biệt, cụ thể là sự thay thế axit amin, trong mỗi trong số hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc.

Thuật ngữ “chức năng tác động” khi được sử dụng liên quan đến kháng thể dùng để chỉ các hoạt tính sinh học của nó có thể góp phần vào vùng Fc của kháng thể, mà thay đổi theo isotyp kháng thể. Ví dụ về chức năng tác động kháng thể bao gồm: tính gây độc tế bào gắn kết C1q và phụ thuộc bổ thể (CDC), sự gắn kết thụ thể Fc, tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), thực bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), sự tiết xytokin, sự hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức hợp miễn dịch bởi tế bào trình diện kháng nguyên, sự điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B), và sự hoạt hóa tế bào B.

Tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) là cơ chế miễn dịch dẫn đến sự phân giải các tế bào đích được phủ kháng thể nhờ tế bào tác động miễn dịch. Các tế bào đích là các tế bào mà kháng thể hoặc dẫn xuất của chúng chứa vùng Fc gắn kết đặc hiệu vào, thường là qua phần protein là đầu tận cùng N với vùng Fc. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “giảm ADCC” được xác định là việc giảm số lượng tế bào đích mà được phân giải trong một thời gian nhất định, ở nồng độ kháng thể nhất định ở môi trường xung quanh các tế bào đích, bằng cơ chế của ADCC được xác định trên đây, và/hoặc việc tăng nồng độ kháng thể ở môi trường xung quanh các tế bào đích, cần đạt được mức phân giải số lượng nhất định của tế bào đích trong thời gian nhất định, nhờ cơ chế của ADCC. Việc giảm ADCC so với ADCC được tạo ra bởi cùng kháng thể được tạo ra bởi cùng tế bào vật chủ, bằng cách sử dụng phương pháp sản xuất, tinh chế và cất giữ chuẩn (đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này) giống nhau, nhưng chưa được thao tác di truyền. Ví dụ, việc giảm ADCC được tạo ra bởi kháng thể chứa trong miền Fc của nó, thay thế axit amin làm giảm ADCC, so với ADCC được tạo ra bởi cùng kháng thể mà không có sự thay thế axit amin trong miền Fc. Thử nghiệm thích hợp để đo ADCC là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Công bố đơn PCT số WO 2006/082515 hoặc Công bố đơn PCT số WO 2012/130831).

“Thụ thể Fc hoạt hóa” là thụ thể Fc mà sau khi gắn kết bởi miền Fc của kháng thể tạo ra các sự kiện truyền tín hiệu mà kích thích tế bào mang thụ thể thực hiện chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa của người bao gồm Fc γ RIIIa (CD16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32), và Fc α RI (CD89).

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “thao tác di truyền, được thao tác di truyền, việc thao tác di truyền”, được xem là bao gồm việc thực hiện sự cải biến thao tác bất kỳ khung peptit hoặc cải biến sau dịch mã polypeptit có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc mảnh của chúng. Thao tác di truyền bao gồm sự cải biến trình tự axit amin, kiểu glycosyl hóa, hoặc nhóm chuỗi bên của axit amin riêng lẻ, cũng như sự kết hợp của các phương pháp này.

“Gắn kết giảm”, ví dụ, gắn kết với thụ thể Fc hoặc CD25 giảm, dùng để chỉ sự giảm ái lực đối với tương tác tương ứng, như được đo, ví dụ, bằng SPR. Để làm rõ, thuật ngữ này cũng bao gồm sự giảm ái lực đến 0 (hoặc dưới giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích), tức là loại bỏ hoàn toàn tương tác. Ngược lại, “gắn kết tăng” dùng để chỉ sự tăng ái lực gắn kết đối với tương tác tương ứng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể liên hợp miễn dịch” dùng để chỉ phân tử polypeptit chứa ít nhất một phân tử IL-2 và ít nhất một kháng thể. Phân tử IL-2 này có thể được nối với kháng thể bằng các tương tác khác nhau và theo nhiều cấu dạng khác nhau như được đề cập trong bản mô tả này. Theo các phương án cụ thể, phân tử IL-2 được dung hợp vào kháng thể nhờ liên kết cầu nối peptit. Thể liên hợp miễn dịch cụ thể theo sáng chế về cơ bản bao gồm một phân tử IL-2 và kháng thể được nối bởi một hoặc nhiều trình tự cầu nối.

Thuật ngữ “được dung hợp” nghĩa là các thành phần (ví dụ, kháng thể và phân tử IL-2) được liên kết bởi liên kết peptit, hoặc trực tiếp hoặc qua một hoặc nhiều liên kết cầu nối peptit.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “thứ nhất” và “thứ hai” khi đề cập đến cấu trúc dưới đơn vị miền Fc v.v, được dùng nhằm làm thuận tiện cho việc phân biệt khi có nhiều hơn một trong số các gốc. Việc sử dụng các thuật ngữ này không nhằm mục đích đưa ra một hướng hoặc trình tự cụ thể của thể liên hợp miễn dịch, trừ khi có quy định rõ ràng.

"Lượng hữu hiệu" của chất dùng để chỉ lượng cần thiết để dẫn đến việc tạo ra sự thay đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà nó được dùng.

"Lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị" của chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng bệnh mong muốn. Lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của chất, ví dụ, khử bỏ, làm giảm, trì hoãn, giảm thiểu hoặc ngăn ngừa tác dụng phụ của bệnh lý.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Cụ thể, cá thể hoặc đối tượng là người.

Thuật ngữ "dược phẩm" dùng để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của hoạt chất chứa trong đó có hiệu quả, và không chứa các thành phần bổ sung có độc tính không thể chấp nhận được đối với đối tượng mà dược phẩm sẽ được cho dùng.

"Chất mang dược dụng" dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, ngoài hoạt chất, mà không độc với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phương pháp điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của chúng như "điều trị" hoặc "việc điều trị") dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm làm thay đổi tiến trình tự nhiên của bệnh lý ở cá thể cần được điều trị, và có thể được thực hiện để điều trị phòng hoặc trong thời kỳ biểu hiện bệnh lý lâm sàng. Hiệu quả mong muốn của việc điều trị này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh lý, giảm các triệu chứng, thuyên giảm hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh lý, ngăn ngừa sự di căn, giảm tốc độ tiến triển của bệnh lý, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh lý, và thuyên giảm hoặc tiên lượng cải thiện. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh lý hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh lý.

IL-2 polypeptit đột biến

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế chứa IL-2 polypeptit đột biến có các đặc tính có lợi đối với liệu pháp miễn dịch. Cụ thể, đặc tính dược lý của IL-2 góp phần vào độc tính nhưng không cần thiết cho hiệu lực của IL-2 được khử bỏ trong IL-2 polypeptit đột biến. IL-2 polypeptit đột biến này được mô tả chi tiết trong WO 2012/107417, toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. Như mô tả trên đây, các dạng thụ thể IL-2 khác nhau bao gồm các cấu trúc dưới đơn vị khác nhau và có ái lực khác nhau đối với IL-2. Thụ thể IL-2 có ái lực trung bình, được cấu thành bởi cấu trúc dưới đơn vị thụ thể β và γ , được biểu hiện trên tế bào tác động nghỉ và đủ để truyền tín hiệu IL-2. Thụ thể IL-2 có ái lực cao, còn bao gồm cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể, chủ yếu được biểu hiện trên tế bào T điều hòa (T_{reg}) cũng như trên tế bào tác động đã được hoạt hóa trong đó sự tham gia của nó nhờ IL-2 có thể thúc đẩy sự ức chế miễn dịch lần lượt qua trung gian tế bào T_{reg} hoặc quá trình gây chết tế bào gây ra bởi sự hoạt hóa (AICD). Do đó, không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, việc làm giảm hoặc loại bỏ ái lực của IL-2 với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 nên làm giảm sự điều hòa giảm gây ra bởi IL-2 của chức năng tế bào tác động bởi tế bào T điều hòa và sự phát triển của tính dung nạp khối u nhờ quy trình của AICD. Mặt khác, việc duy trì ái lực đối với thụ thể IL-2 có ái lực trung bình nên bảo toàn việc gây ra quá trình tăng sinh và hoạt hóa tế bào tác động như tế bào NK và tế bào T bằng IL-2.

Interleukin-2 (IL-2) polypeptit đột biến chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm ít nhất một đột biến axit amin mà khử bỏ hoặc làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 và bảo toàn ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với mỗi thụ thể IL-2 có ái lực trung bình so với IL-2 polypeptit kiểu dại.

IL-2 đột biến của người (hIL-2) với ái lực với CD25 giảm có thể, ví dụ, được tạo ra bởi sự thay thế axit amin ở vị trí axit amin 35, 38, 42, 43, 45 hoặc 72 hoặc các tổ hợp của chúng (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19). Các thay thế axit amin được lấy làm ví dụ bao gồm K35E, K35A, R38A, R38E, R38N, R38F, R38S, R38L, R38G, R38Y, R38W, F42L, F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, K43E, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, và L72K.

Thể đột biến IL-2 cụ thể hữu ích trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm đột biến axit amin ở vị trí axit amin tương ứng với gốc 42, 45, hoặc 72 của IL-2 của người, hoặc tổ hợp của chúng. Theo một phương án, đột biến axit amin này là sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, và L72K, cụ thể hơn là sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm F42A, Y45A và L72G. Các đột biến này về cơ bản có ái lực gắn kết tương tự với thụ thể IL-2 có ái lực trung bình, và về cơ bản có ái lực giảm đối với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 và thụ thể IL-2 có ái lực cao so với dạng kiểu đại của thể đột biến IL-2.

Các đặc điểm khác của các thể đột biến hữu ích có thể bao gồm khả năng gây ra quá trình tăng sinh của tế bào T và/hoặc tế bào NK mang thụ thể IL-2, khả năng tạo ra sự truyền tín hiệu IL-2 ở tế bào T và/hoặc tế bào NK mang thụ thể IL-2, khả năng tạo ra interferon (IFN)- γ dưới dạng xytokin thứ cấp bởi tế bào NK, giảm khả năng tạo ra xytokin thứ cấp – cụ thể là IL-10 và TNF- α – bởi tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), giảm khả năng hoạt hóa tế bào T điều hòa giảm, giảm khả năng tạo ra hiện tượng gây chết tế bào theo chương trình ở tế bào T, và giảm profin độc tính *in vivo*.

IL-2 polypeptit đột biến cụ thể hữu ích theo sáng chế bao gồm ba đột biến axit amin mà khử bỏ hoặc làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 nhưng bảo toàn ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với ái lực thụ thể IL-2 trung gian. Theo một phương án, ba đột biến axit amin này là ở các vị trí tương ứng với gốc 42, 45 và 72 của IL-2 của người. Theo một phương án, ba đột biến axit amin này là các thay thế axit amin. Theo một phương án, ba đột biến axit amin này là các thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm F42A, F42G, F42S, F42T, F42Q, F42E, F42N, F42D, F42R, F42K, Y45A, Y45G, Y45S, Y45T, Y45Q, Y45E, Y45N, Y45D, Y45R, Y45K, L72G, L72A, L72S, L72T, L72Q, L72E, L72N, L72D, L72R, và L72K. Theo phương án cụ thể, ba đột biến axit amin này là các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người nêu trong SEQ ID NO: 19).

Theo một số phương án, đột biến axit amin này làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 xuống ít nhất 5 lần, cụ thể là ít nhất 10 lần, cụ thể hơn là ít nhất 25 lần. Theo các phương án, khi có nhiều hơn

một đột biến axit amin mà làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2, tổ hợp của các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 xuống ít nhất 30 lần, ít nhất 50 lần, hoặc thậm chí là ít nhất 100 lần. Theo một phương án, đột biến axit amin này hoặc tổ hợp của đột biến axit amin khử bỏ ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 để không thể dò được gắn kết bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

Sự gắn kết về cơ bản tương tự với thụ thể có ái lực trung bình, tức là bảo toàn ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với thụ thể này, đạt được khi thể đột biến IL-2 có ái lực cao hơn khoảng 70% của dạng kiểu đại của thể đột biến IL-2 đối với thụ thể IL-2 có ái lực trung bình. Thể đột biến IL-2 theo sáng chế có thể có ái lực cao hơn khoảng 80% và thậm chí cao hơn khoảng 90%.

Việc giảm ái lực của IL-2 đối với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 kết hợp với sự khử bỏ O-glycosyl hóa của IL-2 dẫn đến thu được IL-2 protein có các đặc tính được cải thiện. Ví dụ, sự khử bỏ vị trí O-glycosyl hóa dẫn đến sản phẩm tương đồng hơn khi IL-2 polypeptit đột biến được biểu hiện trong tế bào động vật có vú như tế bào CHO hoặc HEK.

Do đó, theo một số phương án, IL-2 polypeptit đột biến bao gồm đột biến axit amin bổ sung mà khử bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 của người. Theo một phương án, đột biến axit amin bổ sung mà khử bỏ vị trí O-glycosyl hóa của IL-2 ở vị trí tương ứng với gốc 3 của IL-2 của người là sự thay thế axit amin. Sự thay thế axit amin được lấy làm ví dụ bao gồm T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K, và T3P. Theo phương án cụ thể, đột biến axit amin bổ sung này là sự thay thế axit amin T3A.

Theo một số phương án, IL-2 polypeptit đột biến về cơ bản là phân tử IL-2 có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 có ít nhất một đột biến axit amin khử bỏ hoặc làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 nhưng bảo toàn ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với thụ thể IL-2 ái lực trung gian, so với IL-2 polypeptit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 không có đột biến này. Theo phương án khác,

IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 có ít nhất một đột biến axit amin mà khử bỏ hoặc làm giảm ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với cấu trúc dưới đơn vị α của thụ thể IL-2 nhưng bảo toàn ái lực của IL-2 polypeptit đột biến với thụ thể IL-2 ái lực trung gian, so với IL-2 polypeptit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 không có đột biến này.

Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến có thể tạo ra một hoặc nhiều đáp ứng tế bào được chọn từ nhóm bao gồm: quá trình tăng sinh ở tế bào lympho T đã được hoạt hóa, quá trình biệt hóa ở tế bào lympho T đã được hoạt hóa, hoạt tính tế bào T gây độc tế bào (CTL), quá trình tăng sinh ở tế bào B đã được hoạt hóa, quá trình biệt hóa ở tế bào B đã được hoạt hóa, quá trình tăng sinh ở tế bào giết tự nhiên (NK), quá trình biệt hóa ở tế bào NK, sự tiết xytokin bởi tế bào T đã được hoạt hóa hoặc tế bào NK, và tính gây độc tế bào kháng khối u NK đã được hoạt hóa/tế bào lympho (LAK).

Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến có khả năng làm giảm tạo ra sự truyền tín hiệu IL-2 ở tế bào T điều hòa, so với IL-2 polypeptit kiểu đại. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến gây ra quá trình gây chết tế bào gây ra bởi sự hoạt hóa (activation-induced cell death - AICD) kém hơn ở tế bào T, so với IL-2 polypeptit kiểu đại. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến có profin độc tính *in vivo* giảm, so với IL-2 polypeptit kiểu đại. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến có chu kỳ bán rã huyết thanh kéo dài, so với IL-2 polypeptit kiểu đại.

IL-2 polypeptit đột biến hữu ích đặc biệt theo sáng chế bao gồm bốn sự thay thế axit amin ở các vị trí tương ứng với các gốc 3, 42, 45 và 72 của IL-2 của người. Các thay thế axit amin cụ thể là T3A, F42A, Y45A và L72G. Như đã chứng minh trong WO 2012/107417, IL-2 polypeptit đột biến bội bốn này không phát hiện thấy gắn kết với CD25, giảm khả năng tạo ra cơ chế gây chết theo chương trình ở tế bào T, khả năng tạo ra sự truyền tín hiệu IL-2 ở tế bào T_{reg} giảm, và giảm profin độc tính *in vivo*. Tuy nhiên, nó vẫn giữ khả năng hoạt hóa sự truyền tín hiệu IL-2 ở tế bào tác động, gây ra quá trình tăng sinh tế bào tác động, và tạo ra IFN- γ dưới dạng xytokin thứ cấp bằng tế bào NK.

Ngoài ra, IL-2 polypeptit đột biến này có các đặc tính có lợi khác nữa như tính kỵ nước bề mặt giảm, độ ổn định tốt, và hiệu suất biểu hiện tốt, như được mô tả trong

WO 2012/107417. Bất ngờ là, IL-2 polypeptit đột biến này cũng tạo ra chu kỳ bán rã huyết thanh kéo dài, so với IL-2 kiểu đại.

Thể đột biến IL-2 hữu ích theo sáng chế, ngoài việc có các đột biến trong vùng IL-2 tạo ra giao diện của IL-2 với CD25 hoặc vị trí glycosyl hóa, cũng có thể có một hoặc nhiều đột biến trong trình tự axit amin bên ngoài các vùng này. Đột biến bổ sung như vậy trong IL-2 của người có thể tạo ra lợi ích khác nữa như sự biểu hiện hoặc độ ổn định tăng. Ví dụ, cystein ở vị trí 125 có thể được thay thế bằng axit amin trung tính như serin, alanin, threonin hoặc valin, thu được lần lượt C125S IL-2, C125A IL-2, C125T IL-2 hoặc C125V IL-2, như được mô tả trong patent Mỹ số 4,518,584. Như được mô tả trong tài liệu này, cũng có thể gây khuyết đoạn gốc alanin đầu tận cùng N của IL-2 để thu được các thể đột biến như vậy như des-A1 C125S hoặc des-A1 C125A. Theo cách khác hoặc ở dạng kết hợp, thể đột biến IL-2 có thể bao gồm đột biến mà nhờ đó methionin thường xảy ra sự thay thế ở vị trí 104 của IL-2 kiểu đại của người bằng axit amin trung tính như alanin (xem patent Mỹ số 5,206,344). Các thể đột biến thu được, ví dụ, des-A1 M104A IL-2, des-A1 M104A C125S IL-2, M104A IL-2, M104A C125A IL-2, des-A1 M104A C125A IL-2, hoặc M104A C125S IL-2 (các thể đột biến này và các thể đột biến khác có thể được tìm thấy trong patent Mỹ số 5,116,943 và trong ấn phẩm của Weiger và các đồng tác giả, Eur J Biochem 180, 295-300 (1989)) có thể được dùng kết hợp với đột biến IL-2 cụ thể theo sáng chế.

Do đó, theo một số phương án, IL-2 polypeptit đột biến bao gồm đột biến axit amin bổ sung ở vị trí tương ứng với gốc 125 của IL-2 của người. Theo một phương án, đột biến axit amin bổ sung này là sự thay thế axit amin C125A.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được đột biến bổ sung có thể tạo ra lợi ích khác nữa nhằm mục đích theo sáng chế. Ví dụ, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng đột biến axit amin trong trình tự IL-2 làm giảm hoặc khử bỏ ái lực của IL-2 đối với thụ thể IL-2 có ái lực trung bình, như D20T, N88R hoặc Q126D (xem, ví dụ, US 2007/0036752), có thể không thích hợp để chứa trong IL-2 polypeptit đột biến theo sáng chế.

Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến bao gồm không nhiều hơn 12, không nhiều hơn 11, không nhiều hơn 10, không nhiều hơn 9, không nhiều hơn 8, không nhiều hơn 7, không nhiều hơn 6, hoặc không nhiều hơn 5 đột biến axit amin so

với trình tự IL-2 kiểu đại tương ứng, ví dụ, trình tự IL-2 của người nêu trong SEQ ID NO: 19. Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến bao gồm không nhiều hơn 5 đột biến axit amin so với trình tự IL-2 kiểu đại tương ứng, ví dụ, trình tự IL-2 của người nêu trong SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến được cấu thành bởi trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20.

Thể liên hợp miễn dịch

Thể liên hợp miễn dịch như được đề cập trong bản mô tả này bao gồm phân tử IL và kháng thể. Thể liên hợp miễn dịch như vậy làm tăng đáng kể hiệu lực của phương pháp trị liệu bằng IL-2 nhờ hướng đích trực tiếp IL-2, ví dụ, vào môi trường vi mô khối u. Theo sáng chế, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch có thể là toàn bộ kháng thể hoặc globulin miễn dịch, hoặc một phần hoặc biến thể của chúng có các chức năng sinh học như ái lực gắn kết đặc hiệu kháng nguyên.

Lợi ích chung của phương pháp điều trị bằng thể liên hợp miễn dịch là hiển nhiên rõ ràng. Ví dụ, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch nhận diện epitop đặc hiệu khối u và dẫn đến hướng đích phân tử thể liên hợp miễn dịch vào vị trí khối u. Vì vậy, IL-2 với nồng độ cao có thể được chuyển vào môi trường vi mô khối u, nhờ đó gây ra sự hoạt hóa và sự tăng sinh của các dạng tế bào tác động miễn dịch khác nhau được đề cập trong bản mô tả bằng cách dùng liều thể liên hợp miễn dịch thấp hơn nhiều so với liều dùng được yêu cầu đối với IL-2 không được liên hợp. Ngoài ra, do việc dùng IL-2 ở dạng thể liên hợp miễn dịch cho phép các liều dùng của chính xytokin thấp hơn, khả năng gây ra tác dụng phụ không mong muốn của IL-2 được hạn chế, và việc hướng đích IL-2 vào vị trí đặc hiệu trong cơ thể bằng thể liên hợp miễn dịch cũng có thể dẫn đến việc làm giảm sự phơi nhiễm nội hấp và do đó gây ra tác dụng phụ ít hơn so với IL-2 không được liên hợp. Ngoài ra, thời gian bán rã của thể liên hợp miễn dịch tăng so với IL-2 không được liên hợp góp phần làm tăng hiệu lực của thể liên hợp miễn dịch. Tuy nhiên, đặc điểm này của thể liên hợp miễn dịch IL-2 có thể một lần nữa làm trầm trọng thêm các tác dụng phụ tiềm ẩn của phân tử IL-2: Do thời gian bán rã tuần hoàn của thể liên hợp miễn dịch IL-2 trong dòng máu dài hơn đáng kể so với IL-2 không được liên hợp, xác suất cho IL-2 hoặc các vị trí khác của

phân tử protein dung hợp hoạt hóa các thành phần thường có mặt trong hệ mạch gia tăng. Mỗi quan tâm tương tự đối với các protein dung hợp khác chứa IL-2 dung hợp vào gốc khác như Fc hoặc albumin, dẫn đến chu kỳ bán rã của IL-2 trong tuần hoàn kéo dài. Vì vậy, thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến như được đề cập trong bản mô tả này và trong WO 2012/107417, có độc tính giảm so với IL-2 kiểu đại, là đặc biệt có lợi.

Như được mô tả trên đây, việc hướng đích IL-2 trực tiếp vào tế bào tác động miễn dịch thay vì tế bào khối u có thể có lợi đối với liệu pháp miễn dịch IL-2.

Do đó, sáng chế đề xuất IL-2 polypeptit đột biến như được mô tả trên đây, và kháng thể gắn kết với PD-1. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể tạo ra protein dung hợp, tức là IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit với kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể chứa miền Fc gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai. Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó với axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc, tùy ý thông qua peptit cầu nối. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, kháng thể là phân tử globulin miễn dịch, cụ thể là phân tử globulin miễn dịch lớp IgG, cụ thể hơn là phân tử globulin miễn dịch của phân lớp IgG₁. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với một trong số các globulin miễn dịch chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể là mảnh kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể là phân tử Fab hoặc phân tử scFv. Theo một phương án, kháng thể là phân tử Fab. Theo phương án khác, kháng thể là phân tử scFv. Thể liên hợp miễn dịch cũng có thể bao gồm nhiều hơn một kháng thể. Khi nhiều hơn một kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch, ví dụ, kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai, mỗi kháng thể có thể được chọn độc lập từ các dạng khác nhau của kháng thể và mảnh kháng thể. Ví dụ, kháng thể thứ nhất có thể là phân tử Fab và kháng thể thứ hai có thể là phân tử scFv. Theo phương án cụ thể, mỗi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai là phân tử scFv hoặc mỗi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai là phân tử Fab. Theo phương án cụ thể, mỗi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai là phân tử Fab. Theo một phương án, mỗi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai gắn kết với PD-1.

Cấu trúc thể liên hợp miễn dịch

Cấu trúc thể liên hợp miễn dịch được lấy làm ví dụ được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2011/020783, nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. Các thể liên hợp miễn dịch này chứa ít nhất hai kháng thể. Do đó, theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế chứa IL-2 polypeptit đột biến như được đề cập trong bản mô tả này, và ít nhất kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai. Theo phương án cụ thể, kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai độc lập được chọn từ nhóm bao gồm phân tử Fv, cụ thể là phân tử scFv, và phân tử Fab. Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino hoặc carboxy với kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino hoặc carboxy với hoặc i) IL-2 polypeptit đột biến hoặc ii) kháng thể thứ nhất. Theo phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch về cơ bản được cấu thành bởi IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai, cụ thể là các phân tử Fab, được nối bởi một hoặc nhiều trình tự cầu nối. Cấu trúc như vậy có lợi ở chỗ chúng gắn kết với ái lực cao với kháng nguyên đích (PD-1), nhưng chỉ tạo ra gắn kết monome với thụ thể IL-2, do đó tránh được việc hướng đích thể liên hợp miễn dịch vào thụ thể IL-2 mang tế bào miễn dịch ở các vị trí khác ngoài vị trí đích. Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với kháng thể thứ nhất, cụ thể là phân tử Fab thứ nhất, và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với kháng thể thứ hai, cụ thể là phân tử Fab thứ hai. Theo phương án khác, kháng thể thứ nhất, cụ thể là phân tử Fab thứ nhất, có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với IL-2 polypeptit đột biến, và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với kháng thể thứ hai, cụ thể là phân tử Fab thứ hai. Theo phương án khác, kháng thể thứ nhất, cụ thể là phân tử Fab thứ nhất, có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với IL-2 polypeptit đột biến thứ nhất, và còn có chung peptit đầu tận cùng carboxy với kháng thể thứ hai, cụ thể là phân tử Fab thứ hai. Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nặng thứ nhất và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với vùng biến đổi chuỗi nặng thứ hai. Theo phương án khác, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ thứ nhất và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với vùng biến đổi chuỗi nhẹ thứ hai. Theo phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng thứ nhất được nối bởi gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với IL-2 polypeptit đột biến

và được nối tiếp bởi gắn kết peptit đầu tận cùng amino với vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng thứ hai. Theo phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng thứ nhất được nối bởi gắn kết peptit đầu tận cùng amino với IL-2 polypeptit đột biến và được nối tiếp bởi gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng thứ hai. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng Fab thứ nhất và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng Fab thứ hai. Theo phương án khác, chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng Fab thứ nhất có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với IL-2 polypeptit đột biến và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng Fab thứ hai. Theo các phương án khác, chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng Fab thứ nhất có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với IL-2 polypeptit đột biến và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng Fab thứ hai. Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino với một hoặc nhiều phân tử scFv và còn có chung gắn kết peptit đầu tận cùng carboxy với một hoặc nhiều phân tử scFv.

Tuy nhiên, cấu trúc đặc biệt thích hợp đối với thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế chứa phân tử globulin miễn dịch dưới dạng kháng thể. Cấu trúc thể liên hợp miễn dịch như vậy được mô tả trong WO 2012/146628, nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Do đó, theo các phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến như được đề cập trong bản mô tả này và phân tử globulin miễn dịch gắn kết với PD-1, cụ thể là phân tử IgG, cụ thể hơn là phân tử IgG₁. Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa không nhiều hơn một IL-2 polypeptit đột biến. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch là phân tử globulin miễn dịch của người. Theo một phương án, phân tử globulin miễn dịch bao gồm vùng ổn định của người, ví dụ, miền CH1, CH2, CH3 và/hoặc CL của người. Theo một phương án, globulin miễn dịch bao gồm miền Fc của người, cụ thể là miền Fc IgG₁ của người. Theo một phương án, IL-2 polypeptit đột biến có chung gắn kết peptit đầu tận cùng amino hoặc carboxy với phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch về cơ bản được cấu thành bởi IL-2 polypeptit đột biến và phân tử globulin miễn dịch, cụ thể là phân tử IgG, cụ thể hơn là phân tử IgG₁, được nối bởi một hoặc nhiều trình tự cầu nối.

Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó với axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các globulin miễn dịch chuỗi nặng, tùy ý thông qua peptit cầu nối.

IL-2 polypeptit đột biến có thể được dung hợp vào kháng thể trực tiếp hoặc thông qua peptit cầu nối, bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường là khoảng 2-20 axit amin. Peptit cầu nối là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề cập trong bản mô tả này. Peptit cầu nối không gây miễn dịch, thích hợp bao gồm, ví dụ, peptit cầu nối $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$. “n” thường là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường là nằm trong khoảng từ 2 đến 4. Theo một phương án, peptit cầu nối có chiều dài ít nhất là 5 axit amin, theo một phương án, chiều dài nằm trong khoảng từ 5 đến 100, theo phương án khác nữa, là nằm trong khoảng từ 10 đến 50 axit amin. Theo phương án cụ thể, peptit cầu nối có chiều dài 15 axit amin. Theo một phương án, peptit cầu nối là $(GxS)_n$ hoặc $(GxS)_nG_m$ với G=glyxin, S=serin, và $(x=3, n=3, 4, 5 \text{ hoặc } 6, \text{ và } m=0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$ hoặc $(x=4, n=2, 3, 4 \text{ hoặc } 5 \text{ và } m=0, 1, 2 \text{ hoặc } 3)$, theo một phương án, $x=4$ và $n=2$ hoặc 3, theo phương án khác nữa, $x=4$ và $n=3$. Theo phương án cụ thể, peptit cầu nối là $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 21). Theo một phương án, peptit cầu nối có (hoặc được cấu thành bởi) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21.

Theo phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch chứa phân tử IL-2 đột biến và phân tử globulin miễn dịch, cụ thể là phân tử globulin miễn dịch của phân lớp IgG₁, gắn kết với PD-1, trong đó phân tử IL-2 đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó với axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các globulin miễn dịch chuỗi nặng thông qua peptit cầu nối của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21.

Theo phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch chứa phân tử IL-2 đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, trong đó kháng thể bao gồm miền Fc, cụ thể là miền Fc IgG₁ của người, gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai, và phân tử IL-2 đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó với axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc thông qua peptit cầu nối của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21.

Kháng thể PD-1

Kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế gắn kết với PD-1, cụ thể là PD-1 của người, và có thể định hướng IL-2 polypeptit đột biến vào vị trí đích tại đó PD-1 được biểu hiện, cụ thể là vào tế bào T biểu hiện PD-1, ví dụ, liên quan đến khối u.

Kháng thể PD-1 thích hợp có thể được dùng trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế được mô tả trong đơn PCT số PCT/EP2016/073248, nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể chứa hai hoặc nhiều kháng thể, mà có thể gắn kết với kháng nguyên giống nhau hoặc với kháng nguyên khác nhau. Theo các phương án cụ thể, tuy nhiên, mỗi kháng thể này gắn kết với PD-1. Theo một phương án, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế là đơn đặc hiệu. Theo phương án cụ thể, thể liên hợp miễn dịch chứa một kháng thể đơn đặc hiệu duy nhất, cụ thể là phân tử globulin miễn dịch đơn đặc hiệu.

Kháng thể có thể là dạng bất kỳ của kháng thể hoặc mảnh của chúng mà vẫn giữ gắn kết đặc hiệu với PD-1, cụ thể là PD-1 của người. Mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử Fv, phân tử scFv, phân tử Fab, và phân tử F(ab')₂. Tuy nhiên, theo các phương án cụ thể, kháng thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm miền Fc, gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai. Theo một số phương án, kháng thể là globulin miễn dịch, cụ thể là lớp IgG, cụ thể hơn là globulin miễn dịch của phân lớp IgG₁.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đơn dòng.

Theo một số phương án, kháng thể bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, FR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 ở các vị trí 71-73 theo hệ đánh số Kabat, HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

Theo một số phương án, kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và FR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 ở các vị trí

71-73 theo hệ đánh số Kabat, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ là vùng biến đổi được làm giống như kháng thể của người. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm vùng khung của người (framework region- FR).

Theo một số phương án, kháng thể bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13.

Theo một số phương án, kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ là vùng biến đổi được làm giống như kháng thể của người. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm vùng khung của người (FR).

Theo một số phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO:18. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%,

98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO:18.

Theo phương án cụ thể, kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể được làm giống như kháng thể của người. Theo một phương án, kháng thể là phân tử globulin miễn dịch bao gồm vùng ổn định của người, cụ thể là phân tử globulin miễn dịch lớp IgG bao gồm miền CH1, CH2, CH3 và/hoặc CL của người. Các trình tự của miền ổn định của người được lấy làm ví dụ được nêu trong SEQ ID NO 31 và 32 (lần lượt các miền CL kappa và lambda của người) và SEQ ID NO: 33 (miền ổn định chuỗi nặng IgG₁ của người CH1-CH2-CH3). Theo một số phương án, kháng thể bao gồm vùng ổn định chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31 hoặc SEQ ID NO: 32, cụ thể là trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33. Cụ thể, vùng ổn định chuỗi nặng có thể bao gồm đột biến axit amin trong miền Fc như được đề cập trong bản mô tả này.

Miền Fc

Theo các phương án cụ thể, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm miền Fc, gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai. Miền Fc của kháng thể được cấu thành bởi một cặp chuỗi polypeptit chứa miền chuỗi nặng của phân tử globulin miễn dịch. Ví dụ, miền Fc của phân tử globulin miễn dịch G (IgG) là đime, mỗi cấu trúc dưới đơn vị của miền ổn định chuỗi nặng CH2 và CH3 IgG. Hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc có khả năng kết hợp ổn định với nhau. Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm không nhiều hơn một miền Fc. Theo một phương án, miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch là miền Fc IgG. Theo phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc IgG₁. Theo phương án khác, miền Fc là miền Fc IgG₄. Theo phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí S228 (đánh số theo chỉ số Kabat EU), cụ thể là sự thay thế axit amin S228P. Sự thay thế axit amin này làm giảm sự trao

đổi cánh tay đòn Fab *in vivo* của kháng thể IgG₄ (xem Stubenrauch và các đồng tác giả, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). Theo phương án cụ thể khác nữa, miền Fc là miền Fc của người. Theo phương án cụ thể hơn nữa, miền Fc là miền Fc IgG₁ của người. Trình tự của vùng Fc IgG₁ của người được lấy làm ví dụ được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Cải biến miền Fc thúc đẩy dị đime hóa

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế chứa IL-2 polypeptit đột biến, cụ thể là một IL-2 polypeptit đột biến duy nhất (không nhiều hơn một), dung hợp vào một hoặc hai cấu trúc dưới đơn vị khác của miền Fc, do đó hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc thường chứa trong hai chuỗi polypeptit không đồng nhất. Sự biểu hiện đồng thời tái tổ hợp của các polypeptit này và đime hóa sau đó dẫn đến một số kết hợp có khả năng của hai polypeptit. Do đó, để cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của thể liên hợp miễn dịch trong sản xuất tái tổ hợp, sẽ thuận lợi nếu đưa vào miền Fc của kháng thể sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp của polypeptit mong muốn.

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc. Vị trí của tương tác protein-protein rộng nhất giữa hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc IgG của người là trong miền CH3 của miền Fc. Do đó, theo một phương án, cải biến này là trong miền CH3 của miền Fc. Có một số phương pháp cải biến trong miền CH3 của miền Fc để thúc đẩy quá trình dị đime hóa, được mô tả rõ, ví dụ, trong WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Thông thường, trong tất cả các phương pháp như vậy, miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc và miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc đều được thao tác di truyền theo cách bỏ thể để mỗi miền CH3 (hoặc chuỗi nặng bao gồm nó) không thể homodime hóa với chính nó nhưng được thúc đẩy quá trình dị đime hóa với miền CH3 khác đã được thao tác di truyền bỏ thể (để miền CH3 thứ nhất và thứ hai dị đime hóa và các homodime giữa hai miền CH3 thứ nhất hoặc thứ hai không được tạo ra).

Theo phương án cụ thể, cải biến này thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc được gọi là cải biến “núm vặn-vào-lỗ” (“knob-into-hole”), bao gồm cải biến “núm vặn” một trong số hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc và cải biến “lỗ” một trong số hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc kia.

Công nghệ núm vặn-vào-lỗ được mô tả, ví dụ, trong US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway và các đồng tác giả, Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Nói chung, phương pháp này bao gồm bước đưa vào phần nhô ra (“núm vặn”) ở giao diện của polypeptit thứ nhất và khoang tương ứng (“lỗ”) trong giao diện của polypeptit thứ hai, để phần nhô ra có thể được định vị trong khoang nhằm thúc đẩy sự tạo thành heterodime và sự tạo thành homodime ở phía sau. Phần nhô ra được cấu trúc bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin nhỏ từ giao diện của polypeptit thứ nhất với chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Khoang bù có kích thước giống nhau hoặc tương tự với phần nhô ra được tạo ra trong giao diện của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế chuỗi axit amin bên lớn hơn bằng chuỗi bên axit amin nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin).

Do đó, theo phương án cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất có thể định vị trong một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai trong phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất có thể định vị.

Tốt hơn là, gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y), và tryptophan (W).

Tốt hơn là, gốc axit amin này có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T), và valin (V).

Phần nhô ra và khoang có thể được tạo ra bằng cách biến đổi axit nucleic mã hóa polypeptit, ví dụ, bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí, hoặc bằng cách tổng hợp peptit.

Theo phương án cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc (cấu trúc dưới đơn vị “núm vặn”) gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc (cấu trúc dưới đơn vị “lỗ”) gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Theo một phương án, trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác nữa, trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C) hoặc gốc axit glutamic ở vị trí 356 được thay thế bằng gốc xystein (E356C) (cụ thể là gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Việc đưa vào hai gốc xystein này dẫn đến sự tạo thành cầu nối disulfua giữa hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc, làm ổn định hơn nữa đime (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Theo phương án cụ thể, cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm các thay thế axit amin S354C và T366W, và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm các thay thế axit amin Y349C, T366S, L368A và Y407V (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một số phương án, cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc ngoài ra bao gồm các thay thế axit amin H435R và Y436F (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án cụ thể, IL-2 polypeptit đột biến được dung hợp (tuỳ ý thông qua peptit cầu nối) vào cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc (bao gồm cải biến “núm vặn”). Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, sự dung hợp của IL-2 polypeptit đột biến vào cấu trúc dưới đơn vị chứa núm vặn của miền Fc sẽ (tiếp tục) giảm thiểu sự sản sinh thể liên hợp miễn dịch chứa hai IL-2 polypeptit đột biến (sự va chạm về mặt không gian của hai polypeptit chứa núm vặn).

Các kỹ thuật cải biến CH3 khác để thúc đẩy quá trình dị đime hóa được dự tính là lựa chọn thay thế theo sáng chế và được mô tả, ví dụ, trong WO 96/27011,

WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong EP 1870459, được sử dụng theo cách khác. Phương pháp này dựa trên việc đưa vào các axit amin tích điện với điện tích trái dấu tại các vị trí axit amin cụ thể trong giao diện miền CH₃/CH₃ giữa hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc. Kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế là đột biến axit amin R409D; K370E trong một trong số hai miền CH₃ (của miền Fc) và đột biến axit amin D399K; E357K trong một trong số các miền CH₃ khác của miền Fc (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm đột biến axit amin T366W trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin T366S, L368A, Y407V trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc, và ngoài ra là đột biến axit amin R409D; K370E trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin D399K; E357K trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm đột biến axit amin S354C, T366W trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin Y349C, T366S, L368A, Y407V trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc, hoặc kháng thể này bao gồm đột biến axit amin Y349C, T366W trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin S354C, T366S, L368A, Y407V trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc và ngoài ra đột biến axit amin R409D; K370E trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin D399K; E357K trong miền CH₃ của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc (tất cả đều đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2013/157953 được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH₃ thứ nhất bao gồm đột biến axit amin T366K và miền CH₃ thứ hai bao gồm đột biến axit amin

L351D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác, miền CH3 thứ nhất còn bao gồm đột biến axit amin L351K khác nữa. Theo phương án khác, miền CH3 thứ hai còn bao gồm đột biến axit amin được chọn từ Y349E, Y349D và L368E (tốt hơn là L368E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị đime hóa được mô tả trong WO 2012/058768 được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin L351Y, Y407A và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin T366A, K409F. Theo phương án khác, miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin khác nữa ở vị trí T411, D399, S400, F405, N390, hoặc K392, ví dụ, được chọn từ a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E hoặc T411W, b) D399R, D399W, D399Y hoặc D399K, c) S400E, S400D, S400R, hoặc S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V hoặc F405W, e) N390R, N390K hoặc N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F hoặc K392E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin L351Y, Y407A và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin T366V, K409F. Theo phương án khác nữa, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin Y407A và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin T366A, K409F. Theo phương án khác, miền CH3 thứ hai còn bao gồm đột biến axit amin K392E, T411E, D399R và S400R (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị đime hóa được mô tả trong WO 2011/143545 được sử dụng theo cách khác, ví dụ, với cải biến axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 368 và 409 (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị đime hóa được mô tả trong WO 2011/090762, cũng sử dụng công nghệ núng vắn-vào-lỗ được mô tả trên đây, được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin T366W và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin Y407A. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin T366Y và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin Y407T (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch hoặc miền Fc của nó là của phân lớp IgG2 và phương pháp dị đime hóa được mô tả trong WO 2010/129304 được sử dụng theo cách khác.

Theo phương án thay thế, sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến gây ra hiệu ứng dẫn lái tĩnh điện, ví dụ, như được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2009/089004. Nói chung, phương pháp này liên quan đến sự thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở giao diện của hai cấu trúc dưới đơn vị miền Fc bởi gốc axit amin tích điện để sự hình thành homodimer trở nên bất lợi về mặt tĩnh điện nhưng sự dị dimer hóa lại có lợi về mặt tĩnh điện. Theo phương án như vậy, miền CH3 thứ nhất bao gồm thay thế axit amin của K392 hoặc N392 bằng axit amin tích điện âm (ví dụ, axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D), tốt hơn là K392D hoặc N392D) và miền CH3 thứ hai bao gồm thay thế axit amin của D399, E356, D356, hoặc E357 bằng axit amin tích điện dương (ví dụ, lysin (K) hoặc arginin (R), tốt hơn là D399K, E356K, D356K, hoặc E357K, và tốt hơn nữa là D399K và E356K). Theo phương án khác, miền CH3 thứ nhất còn bao gồm thay thế axit amin của K409 hoặc R409 bằng axit amin tích điện âm (ví dụ, axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D), tốt hơn là K409D hoặc R409D). Theo phương án khác, miền CH3 thứ nhất còn bao gồm hoặc theo cách khác bao gồm thay thế axit amin của K439 và/hoặc K370 bằng axit amin tích điện âm (ví dụ, axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D)) (tất cả đều đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác nữa, phương pháp dị dimer hóa được mô tả trong WO 2007/147901 được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin K253E, D282K, và K322D và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin D239K, E240K, và K292D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác nữa, phương pháp dị dimer hóa được mô tả trong WO 2007/110205 có thể được dùng theo cách khác.

Theo một phương án, cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm thay thế axit amin K392D và K409D, và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm thay thế axit amin D356K và D399K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Cải biến miền Fc làm giảm gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động

Miền Fc liên quan đến các đặc tính dược động học có lợi của thể liên hợp miễn dịch, bao gồm thời gian bán rã trong huyết thanh dài góp phần vào sự tích lũy tốt trong mô đích và tỷ lệ phân phối máu-mô có lợi. Tuy nhiên, đồng thời, nó có thể dẫn đến việc hướng đích không mong muốn của thể liên hợp miễn dịch vào các tế bào biểu

hiện thụ thể Fc mà không phải là các tế bào mang kháng nguyên được ưu tiên. Hơn nữa, sự hoạt hóa đồng thời các con đường truyền tín hiệu thụ thể Fc có thể dẫn đến việc giải phóng xytokin, kết hợp với IL-2 polypeptit và thời gian bán rã dài của thể liên hợp miễn dịch, dẫn đến sự hoạt hóa quá mức thụ thể xytokin và tác dụng phụ nghiêm trọng khi sử dụng nội hấp. Cùng với điều này, các thể liên hợp miễn dịch IgG-IL-2 thông thường đã được mô tả là có liên quan đến các phản ứng viêm truyền (xem, ví dụ, King và các đồng tác giả, J Clin Oncol 22, 4463-4473 (2004)).

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc IgG₁ nguyên thể. Theo phương án như vậy, miền Fc (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc này) có thấp hơn 50%, tốt hơn là thấp hơn 20%, tốt hơn nữa là thấp hơn 10% và tốt nhất là thấp hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc, so với miền Fc IgG₁ nguyên thể (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc IgG₁ nguyên thể), và/hoặc thấp hơn 50%, tốt hơn là thấp hơn 20%, tốt hơn nữa là thấp hơn 10% và tốt nhất là thấp hơn 5% chức năng tác động, so với miền Fc IgG₁ nguyên thể (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc IgG₁ nguyên thể). Theo một phương án, miền Fc (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc này) về cơ bản không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc gây ra chức năng tác động. Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc của người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ hoạt hóa của người, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIIa của người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa của người. Theo một phương án, chức năng tác động là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm bao gồm CDC, ADCC, ADCP, và tiết xytokin. Theo phương án cụ thể, chức năng tác động là ADCC. Theo một phương án, miền Fc về cơ bản có ái lực gắn kết tương tự với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn), so với miền Fc IgG₁ nguyên thể. Sự gắn kết về cơ bản tương tự với FcRn đạt được khi miền Fc (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc này) có cao hơn khoảng 70%, cụ thể là cao hơn khoảng 80%, cụ thể hơn cao hơn khoảng 90% ái lực gắn kết của miền Fc IgG₁ nguyên thể (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc IgG₁ nguyên thể) với FcRn.

Theo một số phương án, miền Fc được thao tác di truyền để có ái lực gắn kết giảm với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được thao tác di truyền. Theo các phương án cụ thể, miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên

hợp miễn dịch chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Thông thường, cùng một hoặc nhiều đột biến axit amin có mặt trong mỗi trong số hai cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc là ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, hoặc ít nhất 10 lần. Theo các phương án, khi có nhiều hơn một đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc, tổ hợp của các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc là ít nhất 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc thậm chí là ít nhất 50 lần. Theo một phương án, kháng thể bao gồm miền Fc được thao tác di truyền có thấp hơn 20%, cụ thể là thấp hơn 10%, cụ thể hơn thấp hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc so với kháng thể bao gồm miền Fc không được thao tác di truyền. Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc của người. Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ hoạt hóa của người, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIa của người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa của người. Tốt hơn là, sự gắn kết với mỗi thụ thể này được giảm. Theo một số phương án, ái lực gắn kết với thành phần bổ thể, cụ thể là ái lực gắn kết với C1q, cũng được giảm. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) không được giảm. Sự gắn kết về cơ bản tương tự với FcRn, tức là bảo toàn ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể này, đạt được khi miền Fc (hoặc kháng thể bao gồm miền Fc này) có ái lực gắn kết cao hơn khoảng 70% của dạng không được thao tác di truyền của miền Fc (hoặc kháng thể bao gồm dạng không được thao tác di truyền này của miền Fc) với FcRn. Miền Fc, hoặc kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm miền Fc này, có thể có ái lực cao hơn khoảng 80% và thậm chí cao hơn khoảng 90% ái lực như vậy. Theo một số phương án, miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch được thao tác di truyền để có chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được thao tác di truyền. Chức năng tác động giảm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều đặc điểm sau: tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) giảm, tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) giảm, sự thực bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP) giảm, sự tiết xytokin giảm, sự hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức hợp miễn dịch bởi tế bào trình diện kháng nguyên giảm, sự gắn kết với tế bào NK

giảm, sự gắn kết với đại thực bào giảm, sự gắn kết với các bạch cầu đơn nhân giảm, sự gắn kết với tế bào đa nhân giảm, sự truyền tín hiệu trực tiếp gây ra cơ chế gây chết theo chương trình giảm, sự liên kết chéo của kháng thể gắn kết đích giảm, sự trưởng thành của tế bào tua giảm, hoặc sự môi tế bào T giảm. Theo một phương án, chức năng tác động giảm là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm bao gồm CDC giảm, ADCC giảm, ADCP giảm, và sự tiết xytokin giảm. Theo phương án cụ thể, chức năng tác động giảm là ADCC giảm. Theo một phương án, ADCC giảm thấp hơn 20% ADCC gây ra bởi miễn Fc không được thao tác di truyền (hoặc kháng thể bao gồm miễn Fc không được thao tác di truyền).

Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miễn Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động là thay thế axit amin. Theo một phương án, miễn Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm E233, L234, L235, N297, P331 và P329 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án cụ thể hơn, miễn Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm L234, L235 và P329 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một số phương án, miễn Fc bao gồm các thay thế axit amin L234A và L235A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án như vậy, miễn Fc là miễn Fc IgG₁, cụ thể là miễn Fc IgG₁ của người. Theo một phương án, miễn Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329. Theo phương án cụ thể hơn, sự thay thế axit amin là P329A hoặc P329G, cụ thể là P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án, miễn Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329 và sự thay thế axit amin khác nữa ở vị trí được chọn từ E233, L234, L235, N297 và P331 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án cụ thể hơn, sự thay thế axit amin khác nữa là E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo các phương án cụ thể, miễn Fc bao gồm thay thế axit amin ở các vị trí P329, L234 và L235 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo các phương án cụ thể hơn nữa, miễn Fc bao gồm đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (“P329G LALA”, “PGLALA” hoặc “LALAPG”). Cụ thể là, theo các phương án cụ thể, mỗi cấu trúc dưới đơn vị của miễn Fc bao gồm các thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU), tức là trong mỗi cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miễn Fc gốc leuxin ở vị trí 234 được thay thế bằng gốc alanin (L234A), gốc leuxin ở vị trí 235 được thay thế bằng gốc alanin (L235A) và gốc prolin ở vị trí 329 được thay thế bằng gốc glyxin (P329G)

(đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án như vậy, miền Fc là miền Fc IgG₁, cụ thể là miền Fc IgG₁ của người. Tổ hợp “P329G LALA” của thay thế axit amin khử bỏ hầu như hoàn toàn thụ thể Fcγ (cũng như bỏ thể) gắn kết của miền Fc IgG₁ của người, như được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831, nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. WO 2012/130831 cũng mô tả phương pháp tạo ra miền Fc đột biến như vậy và phương pháp xác định các đặc tính của nó như sự gắn kết thụ thể Fc hoặc chức năng tác động.

Kháng thể IgG4 có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và chức năng tác động giảm so với kháng thể IgG₁. Do đó, theo một số phương án, miền Fc của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế là miền Fc IgG₄, cụ thể là sự thay thế axit amin S228P (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Để làm giảm tiếp ái lực gắn kết của nó với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động của nó, theo một phương án, miền Fc IgG4 này bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí L235, cụ thể là sự thay thế axit amin L235E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác, miền Fc IgG₄ này bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329, cụ thể là sự thay thế axit amin P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án cụ thể, miền Fc IgG₄ này bao gồm sự thay thế axit amin ở các vị trí S228, L235 và P329, cụ thể là sự thay thế axit amin S228P, L235E và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Thể đột biến miền Fc IgG₄ như vậy và các đặc tính gắn kết thụ thể Fcγ của chúng được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831, toàn bộ nội dung của tài liệu được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Theo phương án cụ thể, miền Fc có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc IgG₁ nguyên thể, là miền Fc IgG₁ của người bao gồm các thay thế axit amin L234A, L235A và tùy ý P329G, hoặc miền Fc IgG₄ của người bao gồm các thay thế axit amin S228P, L235E và tùy ý P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một số phương án, quá trình N-glycosyl hóa miền Fc đã được khử bỏ. Theo phương án như vậy, miền Fc bao gồm đột biến axit amin ở vị trí N297, cụ thể là thay thế axit amin asparagin bằng alanin (N297A) hoặc axit aspartic (N297D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Ngoài miền Fc được mô tả trên đây và trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831, miền Fc với gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm cũng bao gồm miền Fc với sự thay thế một hoặc nhiều gốc của miền Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6,737,056) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Các thể đột biến Fc như vậy bao gồm thể đột biến Fc với các thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm cái được gọi là thể đột biến Fc “DANA” với sự thay thế gốc 265 và 297 bằng alanin (patent Mỹ số 7,332,581).

Miền Fc đột biến có thể được tạo ra bằng cách gây khuyết đoạn, thay thế, cài xen hoặc cải biến axit amin nhờ sử dụng các phương pháp hóa học hoặc di truyền đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm bước gây đột biến đặc hiệu vị trí trình tự ADN đã được mã hóa, PCR, tổng hợp gen, và các phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit đúng có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách giải trình tự.

Sự gắn kết với thụ thể Fc có thể dễ dàng được xác định, ví dụ, bằng ELISA, hoặc bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng cách sử dụng thiết bị chuẩn như thiết bị BIAcore (GE Healthcare), và thụ thể Fc có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Theo cách khác, ái lực gắn kết của miền Fc hoặc kháng thể bao gồm miền Fc đối với thụ thể Fc có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào đã biết để biểu hiện thụ thể Fc cụ thể, như tế bào NK của người biểu hiện thụ thể FcγIIIa.

Chức năng tác động của miền Fc, hoặc kháng thể bao gồm miền Fc, có thể được đo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm được mô tả trong patent Mỹ số 5,500,362; Hellstrom và các đồng tác giả Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) và Hellstrom và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patent Mỹ số 5,821,337; Bruggemann và các đồng tác giả, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo cách khác, phương pháp thử nghiệm không phóng xạ có thể được dùng (xem, ví dụ, thử nghiệm gây độc tế bào không phóng xạ ACTITM dùng cho phương pháp đếm tế bào dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm gây độc tế bào không phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình

động vật như mô hình được đề cập trong ấn phẩm của Clynes và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

Theo một số phương án, sự gắn kết của miền Fc với thành phần bổ thể, cụ thể là với C1q, giảm. Do đó, theo một số phương án trong đó miền Fc được thao tác di truyền để có chức năng tác động giảm, chức năng tác động giảm này bao gồm CDC giảm. Thử nghiệm gắn kết C1q có thể được thực hiện để xác định liệu miền Fc, hoặc kháng thể bao gồm miền Fc, có thể gắn kết C1q và do đó có hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro và các đồng tác giả, J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg và các đồng tác giả, Blood 101, 1045-1052 (2003); và Cragg và Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Các xác định việc gắn kết FcRn và mức thanh thải/chu kỳ bán rã *in vivo* cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Petkova, S.B. và các đồng tác giả, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929).

Các khía cạnh đặc biệt theo sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và

trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin T3A, F42A, Y45A, L72G và C125A (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và

trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20; và

trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15.

Theo một phương án theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên của sáng chế, kháng thể là globulin miễn dịch lớp IgG, bao gồm miền Fc IgG₁ của người gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai,

trong đó trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V) và tùy ý gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

và trong đó mỗi cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc bao gồm các thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án này, IL-2 polypeptit đột biến có thể được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó vào axit amin đầu tận cùng carboxy của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, thông qua peptit cầu nối của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24, và polypeptit

chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:25.

Polynucleotit

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit phân lập mã hóa thể liên hợp miễn dịch như được đề cập trong bản mô tả này hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, mảnh này là mảnh gắn kết kháng nguyên.

Polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được biểu hiện dưới dạng một polynucleotit duy nhất mã hóa toàn bộ thể liên hợp miễn dịch hoặc dưới dạng nhiều (ví dụ, hai hoặc nhiều) polynucleotit được biểu hiện đồng thời. Polypeptit mã hóa bởi polynucleotit được biểu hiện đồng thời có thể kết hợp thông qua, ví dụ, sự gắn kết disulfua hoặc các phương tiện khác để tạo ra thể liên hợp miễn dịch chức năng. Ví dụ, phần chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được mã hóa bởi polynucleotit riêng biệt từ phần thể liên hợp miễn dịch chứa phần chuỗi nặng của kháng thể và IL-2 polypeptit đột biến. Khi được biểu hiện đồng thời, polypeptit chuỗi nặng sẽ kết hợp với polypeptit chuỗi nhẹ để tạo ra thể liên hợp miễn dịch. Theo ví dụ khác, phần thể liên hợp miễn dịch chứa một trong hai cấu trúc dưới đơn vị miễn Fc và IL-2 polypeptit đột biến có thể được mã hóa bởi polynucleotit riêng biệt từ phần thể liên hợp miễn dịch chứa phần kia của hai cấu trúc dưới đơn vị miễn Fc. Khi được biểu hiện đồng thời, cấu trúc dưới đơn vị miễn Fc sẽ kết hợp để tạo ra miễn Fc.

Theo một số phương án, polynucleotit phân lập mã hóa toàn bộ thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế như được đề cập trong bản mô tả này. Theo các phương án khác, polynucleotit phân lập mã hóa polypeptit chứa trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế như được đề cập trong bản mô tả này.

Theo một phương án, polynucleotit phân lập theo sáng chế mã hóa chuỗi nặng của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch (ví dụ, globulin miễn dịch chuỗi nặng), và IL-2 polypeptit đột biến. Theo phương án khác, polynucleotit phân lập theo sáng chế mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể chứa trong thể liên hợp miễn dịch.

Theo một số phương án, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, ví dụ, ở dạng ARN thông tin (mARN). ARN theo sáng chế có thể là sợi đơn hoặc sợi kép.

Phương pháp tái tổ hợp

IL-2 polypeptit đột biến hữu ích theo sáng chế có thể được tạo ra bằng khuyết đoạn, thay thế, cài xen hoặc cải biến bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học hoặc di truyền đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm gây đột biến đặc hiệu vị trí trình tự ADN mã hóa, PCR, tổng hợp gen, và các phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit đúng có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách giải trình tự. Về vấn đề này, trình tự nucleotit của IL-2 nguyên thể đã được mô tả bởi Taniguchi và các đồng tác giả (Nature 302, 305-10 (1983)) và axit nucleic mã hóa IL-2 của người có sẵn từ các bộ lưu giữ công cộng như Bộ sưu tập môi trường nuôi cấy Mỹ (the American Type Culture Collection) (Rockville MD). Trình tự của IL-2 của người nguyên thể được nêu trong SEQ ID NO: 19. Thay thế hoặc cài xen có thể bao gồm gốc axit amin tự nhiên cũng như không có trong tự nhiên. Cải biến axit amin bao gồm các phương pháp cải biến hóa học đã biết như bổ sung vị trí glycosyl hóa hoặc gắn kết hydrat cacbon, và các phương pháp tương tự.

Thế liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit trạng thái rắn (ví dụ, tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc sản xuất tái tổ hợp. Để sản xuất tái tổ hợp một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa thế liên hợp miễn dịch (mảnh), ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều véc-tơ để tách dòng vô tính và/hoặc biểu hiện tiếp trong tế bào vật chủ. Polynucleotit như vậy có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một phương án, véc-tơ, tốt hơn là véc-tơ biểu hiện, bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế được đề xuất. Các phương pháp là đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng để cấu trúc véc-tơ biểu hiện chứa trình tự ghi mã của thế liên hợp miễn dịch (mảnh) cùng với tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp/tái tổ hợp di truyền *in vivo*. Xem, ví dụ, kỹ thuật được mô tả trong Maniatis và các đồng tác giả, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); và Ausubel và các đồng tác giả, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989). Véc-tơ biểu hiện có thể là một phần của plasmit, virus, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Véc-tơ biểu hiện bao gồm cát-xét biểu hiện mà polynucleotit mã hóa thế liên hợp miễn dịch (mảnh) (tức là vùng ghi mã)

được tách dòng vô tính trong sự kết hợp có điều khiển với gen khởi đầu và/hoặc các yếu tố kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng ghi mã" là một phần axit nucleic mà được cấu thành bởi các codon được dịch mã thành axit amin. Mặc dù "codon kết thúc" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nó có thể được xem là một phần của vùng ghi mã, nếu có, nhưng trình tự sườn bên bất kỳ, ví dụ, gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, gen kết thúc phiên mã, intron, các vùng chưa được dịch mã đầu 5' và 3', và các trình tự tương tự, không phải là một phần của vùng ghi mã. Hai hoặc nhiều vùng ghi mã có thể có mặt trong một cấu trúc polynucleotit duy nhất, ví dụ, trên một véc-tơ duy nhất, hoặc trong cấu trúc polynucleotit riêng biệt, ví dụ, trên véc-tơ (khác nhau) riêng biệt. Hơn nữa, véc-tơ bất kỳ có thể chứa vùng ghi mã duy nhất, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều vùng ghi mã, ví dụ, véc-tơ theo sáng chế có thể mã hóa một hoặc nhiều polypeptit, mà được tách sau dịch mã hoặc đồng thời khi dịch mã thành các protein cuối nhờ phân cắt bằng enzym phân hủy protein. Ngoài ra, véc-tơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa vùng ghi mã khác loài, hoặc được dung hợp hoặc không dung hợp vào polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng. Vùng ghi mã khác loài bao gồm, mà không bị giới hạn ở, các yếu tố hoặc mô-típ đặc hiệu như peptit truyền tín hiệu tiết hoặc miền chức năng khác loài. Sự kết hợp có điều khiển là khi vùng ghi mã cho sản phẩm gen, ví dụ, polypeptit, liên quan đến một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách để đặt sự biểu hiện của sản phẩm gen dưới sự tác động hoặc kiểm soát của trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng ghi mã polypeptit và gen khởi đầu kết hợp trong đó) "được kết hợp có điều khiển" nếu tạo ra chức năng của gen khởi đầu dẫn đến sự phiên mã của mARN mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết cầu nối giữa hai mảnh ADN không can thiệp vào khả năng của trình tự điều hòa biểu hiện để định hướng sự biểu hiện của sản phẩm gen hoặc can thiệp vào khả năng của khuôn mẫu ADN để được phiên mã. Do đó, vùng gen khởi đầu sẽ có liên quan có điều khiển đến axit nucleic mã hóa polypeptit nếu gen khởi đầu này có khả năng tác động đến sự phiên mã của axit nucleic đó. Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu đặc hiệu tế bào mà định hướng sự phiên mã đáng kể chỉ của ADN trong các tế bào đã được xác định sơ bộ. Các yếu tố kiểm soát sự phiên mã khác, ngoài gen khởi đầu, ví dụ, gen tăng cường, gen chỉ huy, gen ức chế, và tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể có liên quan có điều

khởi đầu polynucleotit để định hướng sự phiên mã đặc hiệu tế bào. Gen khởi đầu thích hợp và vùng kiểm soát sự phiên mã khác được bộc lộ trong bản mô tả. Sự đa dạng về vùng kiểm soát sự phiên mã là đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng này bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, vùng kiểm soát sự phiên mã, mà hoạt động chức năng trong tế bào động vật có xương sống, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, mảnh gen khởi đầu và gen tăng cường từ xytomegalovirut (ví dụ, gen khởi đầu sớm trung gian, kết hợp với intron-A), virut 40 của khỉ (ví dụ, gen khởi đầu sớm), và retrovirut (như, ví dụ, virut gây bệnh sarkom Rous). Các vùng kiểm soát sự phiên mã khác bao gồm các vùng có nguồn gốc từ gen của động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hormon sinh trưởng của bò và β -globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát sự biểu hiện gen ở tế bào có nhân điển hình. Vùng kiểm soát sự phiên mã thích hợp bổ sung bao gồm gen khởi đầu và gen tăng cường đặc hiệu mô cũng như gen khởi đầu tạo ra (ví dụ, gen khởi đầu tạo ra tetracyclin). Tương tự, sự đa dạng của các yếu tố kiểm soát sự dịch mã là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vị trí gắn kết ribosom, các codon khởi đầu dịch mã và kết thúc dịch mã, và các yếu tố có nguồn gốc từ hệ virut (cụ thể là vị trí tiếp nhận ribosom bên trong, hoặc IRES, cũng được gọi là trình tự CITE). Cát-xét biểu hiện cũng có thể bao gồm các đặc điểm khác như nguồn gốc sao chép, và/hoặc sự nhập nhiễm sắc thể các yếu tố như các lặp đoạn cuối dài retrovirut (LTR), hoặc lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR) virut liên quan đến adeno (AAV).

Polynucleotit và vùng mã hóa axit nucleic theo sáng chế có thể liên quan đến vùng mã hóa bổ sung mã hóa peptit tiết hoặc truyền tín hiệu, mà định hướng sự tiết của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Theo giả thuyết truyền tín hiệu, protein được tiết bởi tế bào động vật có vú có peptit truyền tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu tiết được phân cắt từ protein trưởng thành khi xuất vào chuỗi protein sinh trưởng qua mạng lưới nội chất thô đã được khơi mào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng polypeptit được tiết bởi tế bào động vật có xương sống thường có peptit truyền tín hiệu dung hợp vào đầu tận cùng N của polypeptit, được phân cắt từ polypeptit đã được dịch mã để tạo ra dạng polypeptit đã được tiết hoặc “trưởng thành”. Ví dụ, IL-2 của người được dịch mã với trình tự truyền tín hiệu 20 axit amin ở đầu tận cùng N của polypeptit, mà được phân cắt ra sau đó để

tạo ra 133 axit amin IL-2 của người trưởng thành. Theo một số phương án, peptit truyền tín hiệu nguyên thể, ví dụ, IL-2 peptit truyền tín hiệu hoặc globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự đó mà vẫn giữ khả năng định hướng sự tiết của polypeptit mà liên quan có điều khiển đến nó. Theo cách khác, peptit truyền tín hiệu khác loài của động vật có vú, hoặc dẫn xuất chức năng của chúng, có thể được dùng. Ví dụ, trình tự dẫn đầu kiểu đại có thể được thay thế bằng trình tự dẫn đầu của chất hoạt hóa plasminogen mô của người (TPA) hoặc β -glucuronidaza của chuột nhắt.

ADN mã hóa trình tự protein ngắn có thể được dùng để làm thuận tiện việc tinh chế sau đó (ví dụ, nhãn histidin) hoặc hỗ trợ việc dán nhãn thể liên hợp miễn dịch có thể được chứa trong hoặc ở các đoạn kết thúc của thể liên hợp miễn dịch (mảnh) mã hóa polynucleotit.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều véc-tơ theo sáng chế. Polynucleotit và véc-tơ có thể đưa vào đặc điểm bất kỳ, đơn lẻ hoặc kết hợp, được đề cập trong bản mô tả này liên quan đến lần lượt polynucleotit và véc-tơ. Theo một phương án, tế bào vật chủ như vậy bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm) một hoặc nhiều véc-tơ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào vật chủ" dùng để chỉ dạng hệ tế bào bất kỳ có thể được thao tác di truyền để tạo ra thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng. Tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và để hỗ trợ sự biểu hiện của thể liên hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào như vậy có thể được chuyển nhiễm hoặc được biến nạp khi thích hợp với véc-tơ biểu hiện cụ thể và lượng lớn véc-tơ chứa tế bào có thể được sinh trưởng để gieo mầm thiết bị lên men quy mô lớn để thu được lượng thể liên hợp miễn dịch đủ cho các ứng dụng lâm sàng. Tế bào vật chủ thích hợp bao gồm vi sinh vật chưa có nhân điển hình như E. coli, hoặc tế bào có nhân điển hình khác nhau như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary cell - CHO), tế bào côn trùng, hoặc các tế bào tương tự. Ví dụ, polypeptit có thể được tạo ra ở vi khuẩn cụ thể khi không cần quá trình glycosyl hóa. Sau khi biểu hiện, polypeptit có thể được phân lập từ huyền phù đặc chứa tế bào vi khuẩn trong phân đoạn hòa tan và có thể được tinh chế tiếp. Ngoài vi sinh vật chưa có

nhân điển hình, sinh vật có nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng vô tính hoặc biểu hiện thích hợp đối với véc-tơ mã hóa polypeptit, bao gồm chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã được “làm giống như kháng thể của người”, dẫn đến việc tạo ra polypeptit với kiểu glycosyl hóa của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), và Li và các đồng tác giả, Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện polypeptit (được glycosyl hóa) cũng có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Rất nhiều chủng virus hình que đã được nhận diện mà có thể được dùng kết hợp với tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được dùng làm vật chủ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để tạo ra kháng thể ở thực vật chuyển gen). Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được dùng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được làm thích nghi để sinh trưởng khi ức chế có thể là hữu ích. Ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng tế bào CV1 thận khi được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi của người (tế bào 293 hoặc tế bào 293T như được mô tả, ví dụ, trong Graham và các đồng tác giả, J Gen Virol 36, 59 (1977)), tế bào thận chuột Hamster non (BHK), tế bào Sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), tế bào thận khỉ (CV1), tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76), tế bào ung thư biểu mô cổ của người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột buffalo (BRL 3A), tế bào phổi của người (W138), tế bào gan của người (Hep G2), tế bào u vú chuột nhắt (MMT 060562), tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong Mather và các đồng tác giả, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), tế bào MRC 5, và tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary cells - CHO), bao gồm tế bào dhfr-CHO (Urlaub và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để xem xét về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú nhất định thích hợp để sản xuất protein, xem, ví dụ, Yazaki và Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), các trang 255-268 (2003). Tế bào vật chủ bao gồm tế bào nuôi cấy, ví dụ, tế bào

nuôi cấy động vật có vú, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật, chỉ liệt kê một vài tên, mà cả tế bào chứa trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật nuôi cấy hoặc mô động vật. Theo một phương án, tế bào vật chủ là tế bào có nhân điển hình, tốt hơn là tế bào động vật có vú, như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào thận phôi thai của người (HEK) hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20).

Các công nghệ chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để biểu hiện các gen ngoại lai trong các hệ thống này. Tế bào biểu hiện IL-2 polypeptit đột biến dung hợp vào chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được thao tác di truyền để cũng biểu hiện chuỗi kháng thể khác để sản phẩm dung hợp IL-2 đột biến đã được biểu hiện là kháng thể có cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra các thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ chứa một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa thể liên hợp miễn dịch, như được đề xuất trong bản mô tả này, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện thể liên hợp miễn dịch, và tùy ý thu hồi thể liên hợp miễn dịch từ tế bào vật chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ).

Trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, IL-2 polypeptit đột biến có thể được dung hợp về mặt di truyền vào kháng thể, hoặc có thể được liên hợp bằng hóa học với kháng thể. Sự dung hợp di truyền của IL-2 polypeptit vào kháng thể có thể được thiết kế để trình tự IL-2 được dung hợp trực tiếp vào polypeptit hoặc gián tiếp thông qua trình tự cầu nối. Dược phẩm và chiều dài của liên kết cầu nối có thể được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thử nghiệm về hiệu lực. Peptit cầu nối cụ thể được đề cập trong bản mô tả này. Cũng có thể bao gồm các trình tự bổ sung để đưa vị trí phân cắt vào các thành phần riêng biệt của quá trình dung hợp nếu muốn, ví dụ, trình tự nhận biến endopeptidaza. Ngoài ra, IL-2 protein dung hợp cũng có thể được tổng hợp bằng hóa học bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp polypeptit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, phương pháp tổng hợp pha rắn Merrifield). IL-2 polypeptit đột biến có thể được liên hợp bằng hóa học với các phân tử khác, ví dụ, kháng thể, bằng cách sử dụng các phương pháp liên hợp bằng hóa học đã biết. Chất tạo liên kết ngang chức năng kép như chất tạo liên kết ngang có nhóm chức đồng nhất và hai nhóm chức không giống nhau đã biết rõ

trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng nhằm mục đích này. Dạng chất tạo liên kết ngang để sử dụng phụ thuộc vào bản chất của phân tử được dung hợp vào IL-2 và có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, IL-2 và/hoặc phân tử đột biến mà dự định để liên hợp có thể được tạo dẫn xuất bằng hóa học để hai phân tử này được liên hợp trong phản ứng riêng biệt cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế chứa kháng thể. Phương pháp để tạo ra kháng thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Kháng thể không có trong tự nhiên có thể được cấu trúc bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn, có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp (ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 4,186,567) hoặc có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc các thư viện kết hợp chứa chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,969,108 cấp cho McCafferty). Thể liên hợp miễn dịch, kháng thể, và phương pháp tạo ra chúng cũng được mô tả chi tiết, ví dụ, trong các Công bố đơn PCT số WO 2011/020783, WO 2012/107417, và WO 2012/146628, nội dung của mỗi tài liệu được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Các loài động vật bất kỳ chứa kháng thể có thể được dùng trong thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Kháng thể hữu ích không giới hạn phạm vi của sáng chế có thể là kháng thể có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, động vật linh trưởng, hoặc người. Nếu thể liên hợp miễn dịch được dự định để dùng cho người, dạng khảm của kháng thể có thể được dùng trong đó vùng ổn định của kháng thể là từ người. Dạng kháng thể được làm giống như kháng thể của người hoặc dạng kháng thể của người hoàn toàn cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,565,332 cấp cho Winter). Việc làm giống như kháng thể của người có thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở (a) ghép CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể thể cho) vào khung của người (ví dụ, kháng thể thể nhận) và vùng ổn định có hoặc không có việc giữ gốc khung quan trọng (ví dụ, các gốc khung quan trọng để giữ ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc chức năng kháng thể tốt), (b) chỉ ghép vùng xác định tính đặc hiệu không phải của người (SDR hoặc a-CDR; gốc quan trọng đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên) vào khung của người và vùng ổn định, hoặc (c) cấy ghép toàn bộ miền biến

đôi không phải của người, nhưng "che phủ" chúng bằng phần giống như của người bằng cách thay thế gốc bề mặt. Kháng thể được làm giống như kháng thể của người và các phương pháp tạo ra chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), và được mô tả tiếp, ví dụ, trong Riechmann và các đồng tác giả, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen và các đồng tác giả, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); patent Mỹ số 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri và các đồng tác giả, *Methods* 36:25-34 (2005) (mô tả vùng xác định tính đặc hiệu (SDR) ghép); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (mô tả "sự tạo lại bề mặt"); Dall'Acqua và các đồng tác giả, *Methods* 36:43-60 (2005) (mô tả "tái sắp xếp FR"); và Osbourn và các đồng tác giả, *Methods* 36:61-68 (2005) và Klimka và các đồng tác giả, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (mô tả phương pháp "chọn lọc có chỉ dẫn" để tái sắp xếp FR). Vùng khung của người có thể được dùng để làm giống như kháng thể của người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, Sims và các đồng tác giả *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của kháng thể của người của phân nhóm vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cụ thể (xem, ví dụ, Carter và các đồng tác giả *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); và Presta và các đồng tác giả *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); vùng khung trưởng thành của người (được gây đột biến sinh dưỡng) hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); và vùng khung có nguồn gốc từ quá trình sàng lọc thư viện FR (xem, ví dụ, Baca và các đồng tác giả, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) và Rosok và các đồng tác giả, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể của người được mô tả chung trong van Dijk and van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách dùng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen đã được cải biến để tạo ra kháng thể nguyên vẹn của người hoặc kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi của người đáp ứng với sự tăng liều kháng nguyên. Các động vật như vậy thường chứa tất cả hoặc một phần locut globulin miễn dịch của người, mà thay thế cho locut globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc nhập ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của

động vật. Ở chuột nhắt chuyển gen như vậy, locut globulin miễn dịch nội sinh thường đã được làm bất hoạt. Để xem xét về các phương pháp thu nhận kháng thể của người từ động vật chuyển gen, xem Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Cũng xem, ví dụ, các patent Mỹ số 6,075,181 và 6,150,584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; patent Mỹ số 5,770,429 mô tả công nghệ HUMAB®; patent Mỹ số 7,041,870 mô tả công nghệ K-M MOUSE®, và Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Vùng biến đổi của người từ kháng thể nguyên vẹn được tạo ra từ các động vật như vậy có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với các vùng ổn định của người khác nhau.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp trên cơ sở thể lai hóa. Các dòng tế bào u tủy khác dòng u tủy của người và của chuột nhắt-người để tạo ra kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (xem, ví dụ, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur và các đồng tác giả, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, các trang 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner và các đồng tác giả, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Kháng thể của người được tạo ra bằng kỹ thuật lai hóa tế bào B của người cũng được mô tả trong Li và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp bổ sung bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,189,826 (mô tả phương pháp tạo ra kháng thể IgM đơn dòng của người từ các dòng tế bào thể lai hóa) và Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (mô tả thể lai hóa người-người). Kỹ thuật lai hóa của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập từ thư viện kháng thể của người, như được đề cập trong bản mô tả này.

Kháng thể hữu ích theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện kết hợp đối với kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Các phương pháp sàng lọc thư viện kết hợp được xem xét, ví dụ, trong Lerner và các đồng tác giả trong *Nature Reviews* 16:498-508 (2016). Ví dụ, sự đa dạng của các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra thư viện hiển thị thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện như vậy để kháng thể có các đặc điểm gắn kết mong muốn. Các

phương pháp như vậy được xem xét, ví dụ, trong Frenzel và các đồng tác giả trong *mAbs* 8:1177-1194 (2016); Bazan và các đồng tác giả trong *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) và Zhao và các đồng tác giả trong *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016) cũng như trong Hoogenboom và các đồng tác giả trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien và các đồng tác giả, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và trong Marks and Bradbury trong *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003).

Trong các phương pháp hiển thị thể thực khuẩn nhất định, kho vốn chứa gen VH và VL được tách dòng vô tính riêng biệt bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) và được kết hợp lại ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, sau đó có thể được sàng lọc thể thực khuẩn gắn kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter và các đồng tác giả trong *Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994). Thể thực khuẩn thường hiển thị mảnh kháng thể, hoặc dưới dạng mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc dưới dạng mảnh Fab. Thư viện từ các nguồn đã được gây miễn dịch tạo ra kháng thể ái lực cao đối với thể sinh miễn dịch không đòi hỏi về việc cấu trúc thể lai hóa. Theo cách khác, kho vốn nguyên thể có thể được tách dòng vô tính (ví dụ, từ người) để thu được một nguồn kháng thể duy nhất đến khoảng không phải tự kháng nguyên và cả tự kháng nguyên rộng không có khả năng miễn dịch bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths và các đồng tác giả trong *EMBO Journal* 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, thư viện nguyên thể cũng có thể được tạo ra bằng tổng hợp bằng cách tách dòng vô tính các mảnh gen V chưa được sắp xếp lại từ tế bào mầm, và bằng cách sử dụng đoạn môi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa vùng CDR3 biến thể cao và để thực hiện sự sắp xếp lại *in vitro*, như được mô tả bởi Hoogenboom and Winter trong *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992). Công bố patent mô tả thư viện thể thực khuẩn kháng thể của người bao gồm, ví dụ: patent Mỹ số 5,750,373; 7,985,840; 7,785,903 và 8,679,490 cũng như các Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 và 2007/0292936. Ví dụ khác nữa về các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để sàng lọc các thư viện kết hợp đối với kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn bao gồm hiển thị ribosom và mRNA, cũng như các phương pháp để hiển thị và chọn lọc kháng thể trên vi khuẩn, tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng hoặc tế bào nấm men. Các phương pháp hiển thị bề mặt nấm men được xem xét, ví dụ, trong Scholler và các đồng

tác giả trong *Methods in Molecular Biology* 503:135-56 (2012) và trong Cherf và các đồng tác giả trong *Methods in Molecular Biology* 1319:155-175 (2015) cũng như trong Zhao và các đồng tác giả trong *Methods in Molecular Biology* 889:73-84 (2012). Các phương pháp để hiển thị ribosom được mô tả, ví dụ, trong He và các đồng tác giả trong *Nucleic Acids Research* 25:5132-5134 (1997) và trong Hanes và các đồng tác giả trong *PNAS* 94:4937-4942 (1997).

Cải biến hóa học thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế khác nữa có thể được mô tả. Ví dụ, các vấn đề về tính sinh miễn dịch và chu kỳ bán rã ngắn có thể được cải thiện bằng cách liên hợp về cơ bản với polyme mạch thẳng như polyetylen glycol (PEG) hoặc polypropylen glycol (PPG) (xem, ví dụ, WO 87/00056).

Thể liên hợp miễn dịch được tạo ra như được đề cập trong bản mô tả này có thể được tinh chế bằng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ kích cỡ, và các kỹ thuật tương tự. Điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế protein cụ thể sẽ phụ thuộc, một phần, vào các yếu tố như điện tích toàn phần, tính kỵ nước, tính ưa nước v.v, và sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với sự tinh chế bằng sắc ký ái lực, kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên mà thể liên hợp miễn dịch gắn kết có thể được dùng. Ví dụ, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu IL-2 polypeptit đột biến, có thể được dùng. Đối với sự tinh chế bằng sắc ký ái lực thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, ma trận với protein A hoặc protein G có thể được dùng. Ví dụ, sắc ký ái lực và sắc ký loại trừ kích cỡ Protein A hoặc G có thể được dùng để phân lập thể liên hợp miễn dịch về cơ bản như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Độ tinh khiết của thể liên hợp miễn dịch có thể được xác định bằng các phương pháp phân tích đã biết bất kỳ bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, và các phương pháp tương tự.

Dược phẩm, chế phẩm, và đường dùng

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch như được đề cập trong bản mô tả này, ví dụ, để dùng trong các phương pháp điều trị bất kỳ dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả và chất mang dược dụng. Theo phương án khác,

được phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả và ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra các thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế ở dạng thích hợp để dùng *in vivo*, phương pháp này bao gồm (a) thu nhận thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, và (b) pha chế thể liên hợp miễn dịch có ít nhất một chất mang được dụng, nhờ đó chế phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch được pha chế để dùng *in vivo*.

Dược phẩm theo sáng chế chứa lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của thể liên hợp miễn dịch được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang được dụng. Cụm từ "được dụng hoặc được chấp nhận về mặt dược lý" dùng để chỉ thực thể phân tử và được phẩm thường không độc đối với đối tượng tiếp nhận ở liều lượng và nồng độ được dùng, tức là không tạo ra phản ứng bất lợi, dị ứng hoặc phản ứng không mong muốn khác khi được dùng cho động vật, như, ví dụ, người, khi thích hợp. Việc bào chế được phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch và tùy ý hoạt chất bổ sung là đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này khi xem xét sáng chế, như được lấy làm ví dụ bởi Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. Ngoài ra, đối với động vật (ví dụ, người) dùng, đã biết rằng các chế phẩm phải đáp ứng tiêu chuẩn vô trùng, tính gây sốt, an toàn chung và độ tinh khiết theo yêu cầu của FDA Office of Biological Standards hoặc cơ quan chức năng tương ứng ở các nước khác. Dược phẩm được ưu tiên là chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất mang được dụng" bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả dung môi, chất đệm, môi trường phân tán, chất phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, thuốc chống nấm), chất đẳng trương, chất làm chậm hấp thụ, muối, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, protein, thuốc, chất làm ổn định thuốc, polyme, gel, chất kết dính, tá dược, chất gây rã, chất bôi trơn, chất làm ngọt, chất tạo mùi, thuốc nhuộm, như các vật liệu và các hỗn hợp của chúng, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, các trang 1289-1329, được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn). Ngoại trừ chất mang thông thường bất kỳ không tương hợp với hoạt chất, việc sử dụng nó trong trị liệu hoặc dược phẩm cũng được dự tính.

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế (và tác nhân trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được dùng bằng phương tiện thích hợp bất kỳ, bao gồm ngoài đường tiêu hóa, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để điều trị khu trú, dùng trong thương tổn. Việc truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Việc định liều có thể bằng con đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm như tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da tiêm, phụ thuộc, một phần, vào việc dùng là ngắn hạn hay lâu dài.

Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dược phẩm được thiết kế để dùng bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm dưới da, trong da, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, nội tủy mạc hoặc trong màng bụng tiêm. Để tiêm, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được pha chế trong dung dịch nước, tốt hơn là trong các dung dịch đệm tương hợp với cơ thể như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm muối sinh lý. Dung dịch có thể chứa tác nhân điều chế như chất tạo huyền phù, chất làm ổn định và/hoặc chất gây rã. Theo cách khác, thể liên hợp miễn dịch có thể ở dạng bột để hoàn nguyên bằng tá dược thích hợp, ví dụ, nước không chứa chất gây sốt vô trùng, trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm vô trùng được tạo ra bằng cách đưa vào thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với với nhiều thành phần khác liệt kê dưới đây, theo yêu cầu. Việc làm vô trùng có thể được thực hiện dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Nói chung, việc phân tán được thực hiện bằng cách đưa các hoạt chất đã được làm vô trùng khác nhau vào tá dược vô trùng chứa môi trường phân tán bazơ và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp của bột vô trùng dùng để điều chế dung dịch tiêm, huyền phù hoặc nhũ tương vô trùng, các phương pháp điều chế được ưu tiên là kỹ thuật làm khô trong chân không hoặc làm đông khô thu được bột chứa hoạt chất cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ khác từ môi trường đã lọc vô trùng trước đó của chúng. Môi trường lỏng nên được tạo đệm phù hợp nếu cần và chất pha loãng lỏng trước tiên được làm cho đẳng trương trước khi tiêm bằng nước muối hoặc glucoza đủ. Dược phẩm phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và cất giữ, và được bảo quản chống lại các tác động nhiễm tạp của vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Cần phải hiểu rằng nhiễm tạp nội độc tố nên được giữ tối thiểu ở mức an toàn, ví dụ, thấp hơn 0,5 ng/mg protein. Chất mang dược thích hợp dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác;

chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadecyl dimethylbenzyl amoni clorua; hexameton clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; rượu phenolic, butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit có khối lượng phân tử thấp (thấp hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc đextrin; chất chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion trái dấu tạo thành muối như natri; phức hợp kim loại (ví dụ, phức hợp Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Huyền phù tiêm dạng nước có thể chứa hợp chất làm tăng độ nhớt của huyền phù, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, đextran, hoặc các hợp chất tương tự. Tuỳ ý, huyền phù cũng có thể chứa chất làm ổn định thích hợp hoặc tác nhân làm tăng độ hòa tan của hợp chất để cho phép điều chế được dung dịch cô đặc cao. Ngoài ra, huyền phù chứa hoạt chất có thể được tạo ra dưới dạng huyền phù tiêm dạng dầu thích hợp. Dung môi ưa chất béo hoặc chất dẫn thuốc thích hợp bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom.

Hoạt chất có thể được bẫy trong vi nang được tạo ra, ví dụ, lần lượt bằng kỹ thuật giọt tụ hoặc bằng quá trình polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, vi nang hydroxymetyl xenluloza hoặc gelatin-vi nang và poly(metylmetyxylat), trong hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt có kích thước nano và viên nang có kích thước nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật như vậy được đề cập trong Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được tạo ra. Ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm thể bán thấm của polyme kỵ nước rắn chứa polypeptit, mà thể này là ở dạng vật phẩm có hình, ví dụ màng, hoặc vi nang. Theo các phương án cụ thể, sự hấp thụ kéo dài được phẩm dùng để tiêm có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trong dược phẩm chứa tác nhân làm chậm sự hấp thụ như, ví dụ, alumin monostearat, gelatin hoặc các hỗn hợp của chúng.

Ngoài dược phẩm được mô tả trên đây, thể liên hợp miễn dịch cũng có thể được pha chế dưới dạng dược phẩm chứa. Dược phẩm tác động dài như vậy có thể được dùng bằng cách cấy ghép (ví dụ, dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Do đó, ví dụ, thể liên hợp miễn dịch có thể được pha chế bằng vật liệu polyme hoặc kỵ nước thích hợp (ví dụ, dưới dạng nhũ tương trong dầu chấp nhận được) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc dưới dạng dẫn xuất ít hòa tan, ví dụ, dưới dạng muối ít hòa tan.

Dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được sản xuất bằng quy trình trộn, hòa tan, nhũ hóa, tạo nang, sấy hoặc đông khô thông thường. Dược phẩm có thể được pha chế theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược, chất phụ trợ được chấp nhận dùng trong cơ thể giúp làm thuận lợi quá trình xử lý protein thành chế phẩm mà có thể được dùng trong dược phẩm. Chế phẩm phù hợp phụ thuộc vào đường dùng được chọn.

Thể liên hợp miễn dịch có thể được pha chế vào dược phẩm trong axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Muối được dùng là muối về cơ bản giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm muối cộng axit, ví dụ, các muối được tạo ra bằng nhóm amino tự do của dược phẩm có protein, hoặc được tạo ra bằng axit vô cơ như, ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như vậy như axit axetic, axit oxalic, axit tartaric hoặc axit mandelic. Muối được tạo ra bằng nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ như, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc bazơ hữu cơ như vậy như isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Muối được có xu hướng hòa tan hơn trong dung dịch nước và các dung môi proton khác so với thể bazơ tự do tương ứng.

Các phương pháp trị liệu và dược phẩm

Thể liên hợp miễn dịch bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả có thể được dùng trong các phương pháp trị liệu. Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng làm tác nhân trị liệu miễn dịch, ví dụ, để điều trị ung thư.

Để dùng trong các phương pháp trị liệu, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế sẽ được pha chế, định liều, và dùng theo cách phù hợp với việc ứng dụng thực tế thuốc tốt. Các yếu tố để xem xét trong bản mô tả bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân riêng lẻ, nguyên nhân

của rối loạn, vị trí dùng tác nhân, phương pháp dùng, lịch trình dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sỹ y khoa.

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể đặc biệt hữu ích để điều trị tình trạng bệnh lý trong đó kích thích hệ miễn dịch của vật chủ là có lợi, cụ thể là tình trạng bệnh mong muốn có phản ứng miễn dịch tế bào tăng cường. Các tình trạng bệnh lý này có thể bao gồm tình trạng bệnh lý trong đó đáp ứng miễn dịch vật chủ là không đủ hoặc thiếu hụt. Tình trạng bệnh lý mà thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng bao gồm, ví dụ, khối u hoặc nhiễm khuẩn trong đó đáp ứng miễn dịch tế bào sẽ là cơ chế quan trọng cho tính sinh miễn dịch đặc hiệu. Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng tự nó hoặc trong được phẩm thích hợp bất kỳ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế để dùng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế dùng để điều trị bệnh. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế để dùng trong phương pháp điều trị. Theo một phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch như được đề cập trong bản mô tả này dùng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị bệnh này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch để dùng trong phương pháp điều trị cá thể có bệnh bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của thể liên hợp miễn dịch. Theo một số phương án, bệnh được điều trị là chứng rối loạn tăng sinh. Theo phương án cụ thể, bệnh là ung thư. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh được điều trị là ung thư. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch dùng để kích thích hệ miễn dịch. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch để dùng trong phương pháp kích thích hệ miễn dịch ở cá thể bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của thể liên hợp miễn dịch để kích thích hệ miễn dịch. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là động vật có vú, tốt hơn là người. “Sự kích thích hệ miễn dịch” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể bao gồm sự tăng bất kỳ trong số một hoặc nhiều sự tăng chung về chức năng miễn dịch, sự tăng chức năng tế bào T, sự tăng chức năng tế bào B, sự phục hồi chức năng tế bào lympho, sự tăng mức biểu hiện thụ thể IL-2, sự tăng đáp ứng tế bào T, sự

tăng hoạt tính tế bào tiêu diệt tự nhiên hoặc hoạt tính tế bào tiêu diệt được hoạt hóa bởi lymphokine (LAK), và các chức năng tương tự.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả việc sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế để sản xuất hoặc điều chế thuốc. Theo một phương án, thuốc là dùng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị bệnh này. Theo một phương án, thuốc là dùng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của thuốc. Theo một số phương án, bệnh được điều trị là chứng rối loạn tăng sinh. Theo phương án cụ thể, bệnh là ung thư. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh được điều trị là ung thư. Theo phương án khác, thuốc là để kích thích hệ miễn dịch. Theo phương án khác, thuốc là để dùng trong phương pháp kích thích hệ miễn dịch ở cá thể bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của thuốc để kích thích hệ miễn dịch. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người. “Sự kích thích hệ miễn dịch” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể bao gồm sự tăng bất kỳ trong số một hoặc nhiều sự tăng chung về chức năng miễn dịch, sự tăng chức năng tế bào T, sự tăng chức năng tế bào B, sự phục hồi chức năng tế bào lympho, sự tăng mức biểu hiện thụ thể IL-2, sự tăng đáp ứng tế bào T, sự tăng hoạt tính tế bào tiêu diệt tự nhiên hoặc hoạt tính tế bào tiêu diệt được hoạt hóa bởi lymphokine (LAK), và các chức năng tương tự.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ở cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh như vậy dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Theo một phương án, dược phẩm được dùng cho cá thể này, chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một số phương án, bệnh được điều trị là chứng rối loạn tăng sinh. Theo phương án cụ thể, bệnh là ung thư. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh được điều trị là ung thư. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp kích thích hệ miễn dịch ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của thể liên hợp miễn dịch để kích thích hệ miễn dịch. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

“Sự kích thích hệ miễn dịch” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể bao gồm sự tăng bất kỳ trong số một hoặc nhiều sự tăng chung về chức năng miễn dịch, sự tăng chức năng tế bào T, sự tăng chức năng tế bào B, sự phục hồi chức năng tế bào lympho, sự tăng mức biểu hiện thụ thể IL-2, sự tăng đáp ứng tế bào T, sự tăng hoạt tính tế bào tiêu diệt tự nhiên hoặc hoạt tính tế bào tiêu diệt được hoạt hóa bởi lymphokin (LAK), và các chức năng tương tự.

Theo một số phương án, bệnh được điều trị là chứng rối loạn tăng sinh, cụ thể là ung thư. Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về ung thư bao gồm ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư dạ con, ung thư cổ, ung thư màng trong dạ con, ung thư thực quản, ung thư ruột kết, ung thư đại trực tràng, ung thư trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư máu, ung thư da, ung thư biểu mô tế bào hình vảy, ung thư xương, và ung thư thận. Rối loạn tăng sinh tế bào khác có thể được điều trị bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ung thư nằm ở: bụng, xương, vú, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung tâm và ngoại vi), hệ bạch huyết, khung xương chậu, da, mô mềm, lá lách, vùng ngực, và hệ niệu sinh dục. cũng bao gồm các tình trạng bệnh hoặc tổn thương tiền ung thư và các di căn ung thư. Theo một số phương án, ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư thận, ung thư da, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư vú, ung thư não, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tiền liệt và ung thư bàng quang. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng xác định được rằng trong một số trường hợp thể liên hợp miễn dịch có thể không tạo ra hiệu quả chữa bệnh mà chỉ có thể tạo ra được lợi ích một phần. Theo một số phương án, thay đổi sinh lý có một số lợi ích cũng là các lợi ích điều trị được xem xét. Do đó, theo một số phương án, một lượng thể liên hợp miễn dịch tạo ra thay đổi sinh lý được xem là "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị". Đối tượng, bệnh nhân, hoặc cá thể cần điều trị thường là động vật có vú, cụ thể hơn là người.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế được dùng cho tế bào. Theo các phương án khác, lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế được dùng cho cá thể để điều trị bệnh.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào dạng bệnh được điều trị, đường dùng, thể trọng của bệnh nhân, dạng phân tử (ví dụ, bao gồm hoặc không bao gồm miễn Fc), mức nghiêm trọng và thời gian bệnh, liệu thể liên hợp miễn dịch được dùng cho mục đích phòng bệnh hay chữa bệnh, các can thiệp điều trị trước đó hoặc đồng thời, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và sự đáp ứng với thể liên hợp miễn dịch, và sự quyết định của bác sỹ đang điều trị. Bác sỹ chịu trách nhiệm cho việc dùng sẽ, trong trường hợp bất kỳ, xác định nồng độ của hoạt chất trong dược phẩm và liều dùng thích hợp đối với đối tượng riêng rẽ. Phác đồ định liều khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc dùng một lần hoặc nhiều lần ở các thời điểm khác nhau, dùng viên thuốc to, và truyền xung cũng được dự tính trong bản mô tả.

Thể liên hợp miễn dịch được sử dụng phù hợp cho bệnh nhân tại một thời điểm hoặc qua nhiều phương pháp điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh lý, ví dụ, khoảng 1 µg/kg đến 15 mg/kg (ví dụ 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) của thể liên hợp miễn dịch có thể là liều ứng cử viên ban đầu cho bệnh nhân, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều hàng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1 µg/kg đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Đối với việc dùng lặp đi lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường sẽ được duy trì cho đến khi xảy ra sự ức chế mong muốn của các triệu chứng bệnh. Liều lượng được lấy làm ví dụ về thể liên hợp miễn dịch là nằm trong khoảng từ 0,005 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Theo ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế khác, liều dùng cũng có thể chứa trong khoảng từ 1 microgam/kg/thể trọng, khoảng 5 microgam/kg/thể trọng, khoảng 10 microgam/kg/thể trọng, khoảng 50 microgam/kg/thể trọng, khoảng 100 microgam/kg/thể trọng, khoảng 200 microgam/kg/thể trọng, khoảng 350 microgam/kg/thể trọng, khoảng 500 microgam/kg/thể trọng, khoảng 1 miligam/kg/thể trọng, khoảng 5 miligam/kg/thể trọng, khoảng 10 miligam/kg/thể trọng, khoảng 50 miligam/kg/thể trọng, khoảng 100 miligam/kg/thể trọng, khoảng 200 miligam/kg/thể trọng, khoảng 350 miligam/kg/thể trọng, khoảng 500 miligam/kg/thể trọng, đến khoảng 1000 mg/kg/thể trọng hoặc lớn hơn cho mỗi lần dùng, và khoảng dẫn xuất bất kỳ trong đó. Theo ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về khoảng dẫn xuất từ các con số được nêu trong bản mô tả này,

khoảng từ 5 mg/kg/thể trọng đến khoảng 100 mg/kg/thể trọng, khoảng 5 microgam/kg/thể trọng đến khoảng 500 miligam/kg/thể trọng, v.v., có thể được dùng, trên cơ sở các khoảng giá trị được mô tả trên đây. Do đó, một hoặc nhiều liều dùng khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng) có thể được dùng cho bệnh nhân. Liều như vậy có thể được dùng không liên tục, ví dụ, mỗi tuần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, bệnh nhân tiếp nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều thể liên hợp miễn dịch). Có thể dùng một liều ban đầu cao hơn, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thấp hơn. Tuy nhiên, phác đồ liều lượng khác có thể hữu ích. Tiến trình của liệu pháp này dễ dàng được theo dõi bằng các kỹ thuật và xét nghiệm thông thường.

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế nói chung sẽ được sử dụng một cách hiệu quả để đạt được mục đích đã định. Để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa chúng, được sử dụng hoặc dùng với lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị. Việc xác định lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị cũng nằm trong khả năng của người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, đặc biệt là theo thông tin chi tiết được cung cấp trong bản mô tả.

Đối với việc dùng nội hấp, lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm *in vitro*, như thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Sau đó, liều dùng có thể được xây dựng ở các mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn bao gồm IC₅₀ như được xác định trong nuôi cấy tế bào. Thông tin như vậy có thể được dùng để xác định chính xác hơn liều dùng hữu ích ở người.

Liều lượng ban đầu cũng có thể được ước tính từ dữ liệu *in vivo*, ví dụ: mô hình động vật, sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng tối ưu hóa việc dùng cho người dựa trên dữ liệu động vật.

Liều lượng và khoảng cách dùng có thể được điều chỉnh riêng biệt để tạo ra nồng độ thể liên hợp miễn dịch trong huyết tương đủ để duy trì hiệu quả điều trị. Liều dùng thông thường cho bệnh nhân bằng cách tiêm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50 mg/kg/ngày, thường là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1 mg/kg/ngày. Mức huyết tương có tác dụng điều trị có thể đạt được bằng cách dùng nhiều liều mỗi ngày. Mức huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng HPLC.

Trong trường hợp điều trị khu trú hoặc hấp thụ có chọn lọc, nồng độ tại chỗ hữu hiệu của thể liên hợp miễn dịch có thể không liên quan đến nồng độ trong huyết tương. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tối ưu hóa được liều lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị khu trú mà không cần thử nghiệm quá mức.

Liều hữu hiệu có tác dụng điều trị của thể liên hợp miễn dịch được đề cập trong bản mô tả này nói chung sẽ mang lại lợi ích điều trị mà không gây độc tính đáng kể. Độc tính và hiệu quả điều trị của thể liên hợp miễn dịch có thể được xác định bằng các quy trình được chuẩn trong nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm. Các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu trên động vật có thể được dùng để xác định LD₅₀ (liều gây chết tới 50% quần thể) và ED₅₀ (liều điều trị có tác dụng trong 50% quần thể). Tỷ lệ liều giữa tác dụng độc và trị liệu là chỉ số điều trị, mà có thể được biểu thị bằng tỷ lệ LD₅₀/ED₅₀. Thể liên hợp miễn dịch có chỉ số điều trị cao được ưu tiên. Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có chỉ số điều trị cao. Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu trên động vật có thể được dùng để xây dựng một loạt các liều lượng phù hợp để sử dụng ở người. Tốt hơn là, liều lượng này nằm trong khoảng từ nồng độ tuần hoàn bao gồm ED₅₀ với độc tính ít hoặc không có độc tính. Liều lượng có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ, dạng bào chế được sử dụng, cách dùng thuốc, tình trạng bệnh của đối tượng và các yếu tố tương tự. Công thức chính xác, đường dùng và liều lượng có thể được lựa chọn bởi từng bác sĩ theo quan điểm về tình trạng bệnh của bệnh nhân. (Xem, ví dụ, Fingl và các đồng tác giả, 1975, trong tài liệu: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1, p. 1, toàn bộ nội dung của tài liệu được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn).

Bác sĩ điều trị cho bệnh nhân được điều trị bằng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế sẽ biết cách thức và thời điểm chấm dứt, gián đoạn hoặc điều chỉnh việc dùng do độc tính, rối loạn chức năng nội tạng và các yếu tố tương tự. Ngược lại, bác sĩ điều trị cũng sẽ biết điều chỉnh việc điều trị ở mức cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng không đầy đủ (loại trừ độc tính). Tầm quan trọng của một liều dùng trong quản lý rối loạn đang quan tâm sẽ thay đổi theo mức nghiêm trọng của tình trạng bệnh cần điều trị, với lộ trình điều trị, và các yếu tố tương tự. Mức nghiêm trọng của tình trạng bệnh có thể, ví dụ, được đánh giá, một phần, bằng các phương pháp đánh giá tiên lượng chuẩn.

Hơn nữa, liều lượng và có lẽ cả tần suất dùng liều cũng sẽ thay đổi theo độ tuổi, thể trọng và phản ứng của từng bệnh nhân.

Liều dùng có tác dụng điều trị tối đa của thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến như được đề cập trong bản mô tả này có thể được tăng từ liều dùng được sử dụng đối với thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 kiểu đại.

Tác nhân khác và phương pháp điều trị

Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân khác trong trị liệu. Ví dụ, thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng đồng thời với ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung. Thuật ngữ "tác nhân trị liệu" bao gồm tác nhân bất kỳ được dùng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh lý ở cá thể cần điều trị bệnh này. Tác nhân trị liệu bổ sung như vậy có thể bao gồm hoạt chất bất kỳ thích hợp cho các dấu hiệu cụ thể được điều trị, tốt hơn là hoạt chất với hoạt tính bổ thể mà không gây tác động bất lợi cho nhau. Theo một số phương án, tác nhân trị liệu bổ sung là tác nhân điều biến miễn dịch, chất kìm hãm tế bào, chất ức chế sự bám dính tế bào, chất gây độc tế bào, chất hoạt hóa cơ chế gây chết theo chương trình của tế bào, hoặc tác nhân làm tăng tính nhạy của tế bào với chất gây ra cơ chế gây chết theo chương trình. Theo phương án cụ thể, tác nhân trị liệu bổ sung là chất chống ung thư, ví dụ, chất phá vỡ vi ống, chất chống trao đổi chất, chất ức chế topoisomeraza, chất cài xen ADN, chất alkyl hóa, tác nhân trị liệu bằng hormon, chất ức chế kinaza, chất đối kháng thụ thể, chất hoạt hóa cơ chế gây chết theo chương trình của tế bào khối u, hoặc chất chống tạo mạch.

Tác nhân khác như vậy có mặt thích hợp trong tổ hợp với lượng hữu hiệu nhằm mục đích đã dự định. Lượng hữu hiệu của tác nhân khác như vậy phụ thuộc vào lượng thể liên hợp miễn dịch được sử dụng, dạng rối loạn hoặc phương pháp điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận trên đây. Thể liên hợp miễn dịch thường được dùng trong cùng một liều lượng và với các đường dùng như được đề cập trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 99% như được đề cập trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và bằng đường dùng bất kỳ được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là phù hợp.

Liệu pháp kết hợp được lưu ý trên đây bao gồm việc dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều tác nhân trị liệu chứa trong cùng dược phẩm hoặc được phẩm riêng biệt),

và việc dùng riêng biệt, trong đó trường hợp, dùng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể xảy ra trước khi, đồng thời, và/hoặc sau khi, dùng tác nhân trị liệu bổ sung và/hoặc tá dược. Thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế cũng có thể được dùng kết hợp với xạ trị liệu.

Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa vật liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả trên đây. Vật phẩm bao gồm đồ chứa và nhãn dán hoặc tờ rơi trên hoặc có liên quan đến đồ chứa. Đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, ống tiêm, túi dung dịch IV, v.v. Đồ chứa có thể được tạo ra từ nhiều dạng vật liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo. Đồ chứa giữ được phẩm mà là chính nó hoặc được kết hợp với dược phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có công tiếp cận vô trùng (ví dụ, đồ chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nắp có thể chọc thủng được bằng mũi tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong dược phẩm là thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Nhãn hoặc tờ rơi chỉ ra dược phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lựa chọn. Ngoài ra, vật phẩm này có thể bao gồm (a) đồ chứa thứ nhất với dược phẩm chứa trong đó, trong đó dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế; và (b) đồ chứa thứ hai với dược phẩm chứa trong đó, trong đó dược phẩm bao gồm tác nhân gây độc tế bào khác nữa hoặc bằng cách khác là tác nhân trị liệu. Vật phẩm theo phương án này theo sáng chế có thể còn bao gồm tờ rơi chỉ ra dược phẩm có thể được dùng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn bao gồm đồ chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm dung dịch đệm dược dụng, như nước kìm khuẩn dùng để tiêm (BWFI), dung dịch nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các vật liệu khác mong muốn từ quan điểm thương mại và người dùng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, chất lọc, kim tiêm, và ống tiêm.

Trình tự axit amin

	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
--	--------------------	--------------

PD-1 tối thiểu HVR- H1	SSYT	1
PD-1 tối thiểu HVR- H2	SGGGRDIY	2
PD-1 tối thiểu HVR- H3	GRVYF	3
PD-1 tối thiểu HVR- L1	TSDNSF	4
PD-1 tối thiểu HVR- L2	RSSTLES	5
PD-1 tối thiểu HVR- L3	NYDVPW	6
mảnh FR-H3 (RDN ở vị trí Kabat 71-73)	RDN	7
PD-1 HVR- H1	GFSFSSY	8
PD-1 HVR- H2	GGR	9

PD-1 HVR-H3	TGRVYFALD	10
PD-1 HVR-L1	SESVDTSDNSF	11
PD-1 HVR-L2	RSS	12
PD-1 HVR-L3	NYDVPW	13
PD-1 VH (1, 2, 3, 4)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSW VRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDS WGQGTLVTVSS	14
PD-1 VL (1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIH WYQQKPGQSPKLLIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	15
PD-1 VL (2)	DVVM TQSPSLPVT LGQPASISCRASESVDTSDNSFIH WYQQRPGQSPRL LIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDFT TLKISRVEAEDVGVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	16
PD-1 VL (3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIH WYQQKPGQSPRL LIYRSSTLES GIPARFSGSGSGTDFT LTISSELPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	17
PD-1 VL (4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIH WYQQKPGQSPRL LIYRSSTLES GIPARFSGSGSGTDFT LTISSELPEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	18

IL-2 của người	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	19
IL-2 của người (T3A, F42A, Y45Y, L72G, C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	20
Cầu nối	GGGGSGGGGSGGGGS	21
PD-1 IL2v – HC với IL2v (núm vắn Fc, LALAPG)	evqllesggglvqpggslrlscaasgfsfssytmswvrqapgglewvatisggg rdiypdsvkgrftisrdnskntlylqmnsdraedtavyycvlltgrvyfaldswg qgtltvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfepvtvswngalts gvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepksc dkthtcppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckkvsnk algapiektiskakgqprepvytlppcrdeltknqvslwclvkgfypsdiavew esngqpennyktpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhh ytqkslsispggggsgggsggggsapassstkkqlqlehllldlqmilnginn yknpkltrmltakfampkkatelkhlqcleelkpleevlngaqsknfhlrprdli sninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfaqiistlt	22

PD-1 IL2v – HC không có IL2v (lỗ Fc, LALAPG)	evqllesggglvqp ggslrlscaasgfsfssytmswvrqapgkglewvatisggg rdiypdsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyycvlltgrvyfaldswg qgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngalts gvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepksc dkthtcppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk algapiektiskakgqprepqvctlppsrdeitknqvslscavkgfypsdiavew esngqpennykttpvldsdgsfflvskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhh ytqkslslsp	23
PD-1 IL2v – HC không có IL2v (lỗ Fc, LALAPG, HYRF)	evqllesggglvqp ggslrlscaasgfsfssytmswvrqapgkglewvatisggg rdiypdsvkgrftisrdnsntlylqmnsraedtavyycvlltgrvyfaldswg qgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngalts gvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepksc dkthtcppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk algapiektiskakgqprepqvctlppsrdeitknqvslscavkgfypsdiavew esngqpennykttpvldsdgsfflvskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhr ftqkslslsp	24
PD-1 IL2v – LC	divmtqspdslavslgeratinckasesvdtstdnsfihwyqqkpgqspklliyrrs tlesgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycqqnydvpwtfgggkveikrt vaapsvfifppsdeqlksgtasvvcilnnfypreakvqwkdnalqsgnsqesvt eqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec	25
hIL-2 peptit truyền tín hiệu	MYRMQLLSICIALSLALVTNS	26

hPD-1 (không có trình tự truyền tín hiệu)	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFS NTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDC RFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLA PKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ TLVVG VVGGLLGSLLVWVLAVICSRAARGTIGAR RTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVP CVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPL RPEDGHCSWPL	27
hPD-1 (có trình tự truyền tín hiệu)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPP TFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSP SNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHM SVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV ERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLL LLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVF SVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPG MGTSPPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	28
IL-2 của người (C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	29
Miền Fc IgG ₁ của người	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQ KSLSLSP	30

Miền kappa CL của người	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Miền lambda CL của người	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	32
Vùng ổn định chuỗi nặng IgG ₁ của người (CH1- CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	33
Dạng thay thế của PD-1 IL2v – HC loài gặm nhấm bằng IL2v	evqlqesgpglvkpsqslsltsvsgysitssyrwnwirkfpgnrlewmgyinsa gisnynpslkrisitrtdtsknqfflqvnsvttedaatycarsdnmgtpftywgq gtlvtvssaktpsvyplapgsaaqtnsmvtlgclvkgfyfepvtvtwnsgslss gvhtfpavlqsdlytlsssvtvpsswtvpsqvtctenvahpasstkvdkivprdcgc kpcictvpevssvfifppkpkdvltitltpkvctvvaaiskddpevqfswfvddv evhtaqtkpreeqinstfrsvselpimhqdwlngkefkcrvnsaafgapiektisk tkgrpkapqvtytippkeqmakdkvsltcmtnffpeditvewqwnqppaen ydntqpimtdtgsyfvysdlnvqksnweagntftcsvgheglhnhhtekslshs pgggggsgggsggggsapassstssstaeaqqqqqqqqqqhleqlldlq ellsrmenyrnlklprmltakfalpkqatelkdldqledelgplrhvldgtqsksfql edaenfisnirvtvklkgsdntfecqfddesatvvdflrrwiafaqsiiistspq	34

Dạng thay thế PD-1 IL2v – HC của loài gặm nhấm không có IL2v	evqlqesgpglvkpsqslscsvtgysitssyrwnwirkfpgnrlewmgysinsa gisnynpslkrtrisitrtdtsknqfflqvnsvttedaatyycarsdnmgtpftywgq gtltvtvssaktppsvyplapgsaaqtnsmvtlgclvkgyfpepvtvtwnsgslss gvhtfpavlqsdlytlsssvtvpstwpstvtcnvahpasstkvdkkivprdcgc kpcictvpevssvfifppkpkdvltitltpkvtevvvaiskddpevqfswfvddv evhtaqtkpreeqinstfrsvselpimhqdwlngkefkcrvnsaafgapiektisk tkgrpkapqvtytipppkkqmakdkvsltcmitnffpeditvewqwnqqaen ykntqpimktdgsyfvysklvqksnweagntftcsvlheglhnhhtekslshs p	35
Dạng thay thế PD-1 IL2v – LC của loài gặm nhấm	divmtqgtlpnpvpsgesvsitcrssksllysdgktylnwylqrpqspqliyw mstrasgvdrfsgsgsgtdftlkisgveadvgiyycqqglefptfgggtklelkr tdaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwkidgserqngvlnsw tdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivksfnrnc	36

PD-L1 IL2v – HC với IL2v (núm vắn Fc, LALAPG)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTK KTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKF AMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFAQSIISTLT	37
PD-L1 IL2v – HC không có IL2v (lỗ Fc, LALAPG)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN HYTQKSLSLSP	38

PD-L1 IL2v – LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	39
Dạng thay thế PD-L1 IL2v – HC của loài gặm nhấm bằng IL2v	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLTVSAAKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTL GCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIE KTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMIT DFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFV YSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLS HSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEEAQQQ QQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLLKLPR MLTAKFALPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDGTQ SKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTFECQFDDES ATVVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ	40

Dạng thay thế của PD-L1 IL2v – HC loài gặm nhấm không có IL2v	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDY WGQGTLLTVSAAKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTL GCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIE KTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMIT DFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFV YSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLS HSP	41
Dạng thay thế PD-L1 IL2v – LC của loài gặm nhấm	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQYLHPATFGQGTKVEIKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTITKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	42
Miền ngoại bào hPD-1 (ECD)	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFS NTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDC RFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLA PKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ TLV	43

muCEA HC- Fc (DD)- muIL2v	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVE AMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLT PKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTKPR EEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFG APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGS YFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTE KSLSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTA EA QQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLK LPRMLTAKFALPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLD GTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQF DDESATVVDLRRWIAFAQSIISTSPQ	44
muCEA HC- Fc (KK)- muIL2v	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTF TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVE AMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLT PKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTKPR EEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFG APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLT CMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDG SYFVYSKLVNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTE KSLSHSPGK	45

muCEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRA DAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVK WKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLT DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC	46
muFAP HC- Fc (DD)- muIL2v	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTKPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFF PEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSD LNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSP GGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEEAQQQQQQ QQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRMLT AKFALPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDGTQSKS FQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTFECQFDDESAT VVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ	47

muFAP HC-Fc (KK)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYW GQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT LSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPR DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEK TISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITN FFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSH SPGK	48
muFAP LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQ QKPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRADA AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINV KWIKDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	49

kháng muPD1- HC_mIgG2a- LALAPG	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSSYRWNW IRKFPGNRLEWMGYINSAGISNYNPSLKRRISITRDT KNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARSDNMGTTPFTYW GQGTLLTVSSASTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL GAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTL TCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSD GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPGK	50
kháng muPD1-LC	DIVMTQGTLNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYL NWYLQRPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFGSGSGT DFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFGGGTKLELK RTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTL TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	51

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về phương pháp và dược phẩm theo sáng chế. Cần hiểu rằng các phương án khác nhau có thể được ứng dụng thực tế, dựa trên phần mô tả chung được đề cập trên đây.

Ví dụ 1

Ví dụ 1A. Điều chế protein dung hợp PD1-IL2v

Cát-xét biểu hiện cho protein dung hợp chuỗi nặng kháng thể – interleukin-2 (IL-2) [vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng PD-1 của người, IgG₁ chuỗi nặng của người (mang đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số EU) để loại bỏ chức năng tác động, và đột biến S354C và T366W (đánh số EU) để dị dime hóa (“núm vắn”)), cầu nối (G4S)₃, và IL-2v của người (mang đột biến T3A, F42A, Y45A, L72G

và C125A)], cát-xét biểu hiện cho chuỗi nặng kháng thể [vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng PD-1 của người, và IgG₁ chuỗi nặng của người (mang đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số EU) để loại bỏ chức năng tác động, đột biến Y349C, T366S, L368A và Y410V (đánh số EU) để dị dime hóa (“lỗ”), và tùy ý đột biến H435R và Y436F (đánh số EU)] và cát-xét biểu hiện cho chuỗi nhẹ kháng thể [vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD-1 của người, và vùng ổn định C_{kappa} của người] và được tạo ra bằng tổng hợp gen.

Mỗi cát-xét này được tách dòng vô tính bằng cách phân cắt bằng HindIII và NheI thành véc-tơ biểu hiện trong điều kiện kiểm soát gen khởi đầu CMV tiếp theo là IntronA và được kết thúc bằng tín hiệu BGH-poly A. Véc-tơ còn chứa gen kháng ampicilin vi khuẩn và nguồn gốc sao chép từ *E.coli*.

Protein dung hợp PD1-IL-2v của người (SEQ ID NO 22, 24 và 25) được tạo ra bằng đồng chuyển nhiễm của tế bào HEK293F (Invitrogen) với véc-tơ được mô tả trên đây với tỷ lệ 1:1:1 trong bình lắc. Sau một tuần, dịch nổi bề mặt được thu hoạch và được lọc qua màng lọc vô trùng.

Protein dung hợp được tinh chế từ dịch nổi bề mặt bằng cách kết hợp sắc ký ái lực Protein A và sắc ký loại trừ kích cỡ. Sản phẩm thu được được đặc trưng để sự nhận diện bằng phép đo phổ khối và các đặc tính phân tích như độ tinh khiết bằng điện di mao quản (CE-SDS), thành phần monome và độ ổn định.

Protein dung hợp PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm (SEQ ID NO 34-36) được tạo ra tương tự. Phân tử thay thế bao gồm kháng thể PD-1 kháng chuột IgG₁ của loài gặm nhấm (mang đột biến Fc để loại bỏ chức năng tác động và để dị dime hóa) và interleukin-2 của loài gặm nhấm có đột biến tương tự với phân tử của người.

Cả hai protein dung hợp có thể được tạo ra với hiệu suất tốt và ổn định.

Ví dụ 1B. Điều chế protein dung hợp PD-L1-IL2v

Cát-xét biểu hiện cho protein dung hợp chuỗi nặng kháng thể – interleukin-2 (IL-2) [vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể PD-L1 kháng người, chuỗi nặng IgG₁ của người (mang đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số EU) để loại bỏ chức năng tác động, và đột biến S354C và T366W (đánh số EU) để dị dime hóa (“núm vắn”)), cầu nối (G4S)₃, và IL-2v của người (mang đột biến T3A, F42A, Y45A, L72G

và C125A)], cát-xét biểu hiện cho chuỗi nặng kháng thể [vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể PD-L1 kháng người, và chuỗi nặng IgG₁ của người (mang đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số EU) để loại bỏ chức năng tác động, đột biến Y349C, T366S, L368A và Y410V (đánh số EU) để dị dime hóa (“lỗ”)]], và cát-xét biểu hiện cho chuỗi nhẹ kháng thể [vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể PD-L1 kháng người, và vùng ổn định C_{kappa} của người] được tạo ra bằng tổng hợp gen. Sự biểu hiện kháng thể được điều khiển bằng gen khởi đầu MPSV thể khảm và trình tự truyền tín hiệu polyA tổng hợp nằm ở đầu 3’ của CDS. Ngoài ra, mỗi véc-tơ chứa trình tự EBV OriP.

Các phân tử được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293-EBNA sinh trưởng khi ức chế với véc-tơ biểu hiện ở động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Tế bào được chuyển nhiễm với véc-tơ biểu hiện tương ứng với tỷ lệ 1:1:2 (“chuỗi nặng véc-tơ (VH-CH1-CH2-CH3-IL2v)”): “chuỗi nặng véc-tơ (VH-CH1-CH2-CH3)”): “chuỗi nhẹ véc-tơ (VL-CL)”).

Để chuyển nhiễm, tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyền phù trong môi trường nuôi cấy Excell không chứa huyền thanh chứa 6 mM L-glutamin và môi trường nuôi cấy 250 mg/l G418. Để sản phẩm trong bình tubespin dung tích 600 ml (thể tích hoạt động tối đa là 400 mL) 600 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo mầm 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s², và dịch nổi bề mặt được thay thế bằng 20 ml môi trường CD CHO được làm ấm sơ bộ. Véc-tơ biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến lượng cuối là 400 µg ADN. Sau khi bổ sung 1080 µl dung dịch PEI (2,7 µg/ml), hỗn hợp được tạo xoáy trong 15 giây và tiếp theo là được ủ trong 10 phút ở tốc độ nhiệt độ trong phòng. Sau đó, tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình tubespin dung tích 600 ml và được ủ trong 3 giờ ở 37°C trong tủ ấm với khí quyển CO₂ 5%. Sau thời gian ủ môi trường 360 ml Excell + 6 mM L-glutamin + 5g/L Pepsoy + 1,0mM VPA được bổ sung và tế bào được cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm 7% Feed 7 được bổ sung. Sau 7 ngày cấy, dịch nổi bề mặt được thu gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 20 - 30 phút ở 36000 m/s² (máy ly tâm Sigma 8K), dung dịch được lọc vô trùng (màng lọc 0,22 mm) và natri azit ở nồng độ cuối là 0,01% (khối lượng/thể tích) được bổ sung. Dung dịch được giữ ở 4°C.

Cấu trúc PD-L1-IL2v của người (SEQ ID NO 37-39) được tinh chế bằng một bước ái lực bằng proteinA (MabSelectSure, GE Healthcare) tiếp theo là sắc ký loại trừ

kích cỡ (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare). Để sắc ký ái lực, dịch nổi bề mặt được đưa lên cột HiTrap ProteinA HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 25 ml natri phosphat 20 mM, natri xitrat 20 mM, pH 7,5. Protein chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 10 thể tích cột natri phosphat 20 mM, natri xitrat 20 mM, pH 7,5 và protein đích được rửa giải trong 6 thể tích cột natri xitrat 20 mM, natri clorua 100 mM, glyxin 100 mM, Tween20 0,01% pH 3,0. Dung dịch protein được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 0,5M natri phosphat, pH 8,0. Protein đích được cô và được lọc trước khi đưa lên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 20 mM histidin, 140 mM natri clorua, pH 6,0, Tween20 0,01%.

Cấu trúc PD-L1-IL2v của loài gặm nhấm (SEQ ID NO 40-42) cũng được tinh chế bằng một bước ái lực với proteinA (MabSelectSure, GE Healthcare) tiếp theo là sắc ký loại trừ kích cỡ (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare). Để sắc ký ái lực dịch nổi bề mặt được trộn 1:1 với glyxin 2 M, NaCl 0,6 M pH 8,6 và được đưa lên cột HiTrap ProteinA HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 25 ml glyxin 1 M, NaCl 0,3 M pH 8,6. Protein chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 10 thể tích cột của glyxin 1 M, NaCl 0,3 M pH 8,6 và protein đích được rửa giải trong 6 thể tích cột của glyxin 1 M, NaCl 0,3 M, pH 4,0. Dung dịch protein được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 natri phosphat 0,5 M, pH 8,0. Protein đích được cô và được lọc trước khi đưa lên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 20 mM histidin, 140 mM natri clorua, pH 6,0, Tween20 0,01%.

Chế phẩm cuối của PD-L1-IL2v của người chứa 99% monome (được xác định trên cột loại trừ kích cỡ phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4 , 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaN_3 , dung dịch đệm xử lý pH 6,7 ở 25°C) và có độ tinh khiết 100% (được xác định bằng điện di mao dẫn SDS không được khử trên hệ thống Caliper LabChip GXII (Caliper lifescience) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Hiệu suất sản xuất là 23 mg/L. Phép phân tích đo khối phổ đã cho thấy phân tử được lắp ráp chính xác nhất với các vết (<5%) của các phân tử không có interleukin-2 (đo khối phổ được thực hiện trên hệ thống Agilent LC-MS (Agilent Technologies) với cột NUCLEOGEL RP1000-8, 250 mm x 4,6 mm (MACHEREY-NAGEL GmbH) và gradien axetonitril-axit formic).

Đối với PD-L1-IL2v của loài gặm nhấm, thành phần monome là 96%, độ tinh khiết 100% và hiệu suất sản xuất 3,8 mg/L.

Ví dụ 1C. Điều chế CEA-IL2v thay thế của loài gặm nhấm và FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm

Phân tử thay thế đã được làm giống như kháng thể của loài gặm nhấm của xytokin miễn dịch CEA-IL2v của biến thể IL-2 hướng đích CEA, được gọi là muCEA-muIL2v (cũng được gọi là muCEA-IL2v), được tạo ra để dùng trong mô hình khối u *in vivo* ở chuột nhắt có sức đề kháng hoàn toàn để làm giảm sự tạo thành kháng thể kháng thuốc (ADA). Ngoài ra, phiên bản thể khảm đã được làm giống như kháng thể của loài gặm nhấm của xytokin miễn dịch FAP-IL2v của lần lượt biến thể IL-2 hướng đích FAP, được gọi là muFAP-muIL2v (cũng được gọi là muFAP-IL2v), được tạo ra để dùng trong mô hình khối u *in vivo* ở chuột nhắt có sức đề kháng hoàn toàn để làm giảm sự tạo thành kháng thể kháng thuốc (ADA). Ở các phân tử thay thế đã được làm giống như kháng thể của loài gặm nhấm, đột biến nùm vắn-vào-lỗ của miền Fc được thay thế bằng đột biến DDKK trên muIgG₁ và đột biến LALA P329G được thay thế bằng đột biến DAPG trên muIgG₁ (như được bộc lộ trong công bố đơn PCT số 2016/0330350 A1, toàn bộ nội dung của tài liệu được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Ví dụ, muCEA-muIL2v được đặc trưng bởi các đặc điểm sau. Đối với kháng thể bố mẹ, kháng thể IgG₁ thể khảm người-chuột nhắt được dùng với vùng biến đổi của người (đã được làm giống như kháng thể của người), mà là vùng ổn định của loài gặm nhấm. Để tránh tính sinh miễn dịch tiềm năng alen Black 6 tương ứng được sử dụng (trình tự được công bố bởi Dự án bộ gen chuột nhắt (Mouse Genomes Project)). Sự gắn kết với muIL2R α được khử bỏ bằng ba đột biến tương đồng với ba đột biến được xác định trong IL-2v của người và vị trí O-glycosyl hóa tương ứng được loại bỏ: T23A (O-Glyco), F76A, Y79A, L106G. Ngoài ra, như trong aldesleukin, gốc xystein được gây đột biến để tránh sự kết tập bởi đột biến C160A (đánh số trên cơ sở UniProt ID P04351 bao gồm peptit truyền tín hiệu). Mặc dù muIgG₁ đã làm giảm gắn kết Fc γ R, gắn kết với Fc γ Rs của loài gặm nhấm được làm mất hoàn toàn bằng cách đưa vào đột biến DAPG (D265A, P329G), trong khi gắn kết muFcRn vẫn được giữ. muIL-2v được dung hợp qua phần kết nối (G₄S)₂ không gây miễn dịch chỉ với đầu tận cùng C của một chuỗi nặng của kháng thể muIgG₁. Để đạt được điều này, xytokin miễn dịch được

thao tác di truyền bằng cách sử dụng sự điều khiển tĩnh điện nhờ đột biến DDKK trong miền Fc để cho phép dị đime hóa trong nền chuột nhắt.

Các trình tự polypeptit của muCEA-muIL2v là như sau:

Chuỗi nặng với đột biến DD và với muIL2v (SEQ ID NO:44) đã được dung hợp:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLE
WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
WDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL
VKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVT
CNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKV
TCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSVSELPIMHQD
WLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSL
TCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNW
EAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSS
STAEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTAKFAL
PKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTTVVKLKG
SDNTFECQFDDESATVVDLRRWIAFAQSIISTSPQ

Chuỗi nặng với đột biến KK (SEQ ID NO:45):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLE
WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
WDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL
VKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVT
CNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKV
TCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTFRSVSELPIMHQD
WLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSL
TCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLVNVQKSNW
EAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

Chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:46):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLI
YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQG

TKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER
QNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS
FNRNEC

Các trình tự polypeptit muFAP-muIL2v là như sau:

Chuỗi nặng với đột biến DD và với muIL2v (SEQ ID NO:47) đã được dung
hợp:

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG
WFGGFNYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP
EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHP
ASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVA
ISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE
FKCRVNSA AFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNF
FPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYS DLNVQKSNWEAGNTF
TCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAE AQ
QQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTAKFALPKQATE
LKDLQCLEDELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFEC
QFDDESATVVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ

Chuỗi nặng với đột biến KK (SEQ ID NO:48):

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG
WFGGFNYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP
EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHP
ASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVA
ISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE
FKCRVNSA AFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNF
FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSK LNVQKSNWEAGNTF
TCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK

Chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:49):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLIN
VGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTK
VEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQN
GVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN
RNEC

Các trình tự polypeptit muPD1 là như sau:

Chuỗi nặng (SEQ ID NO:50):

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRKFPGNRLEWM
GYINSAGISNYNPSLKRRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARSDNMG
TTPFTYWGGQTLVTVSSASTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEP
VTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASS
TKVDDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVV
VDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWM
SGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTC
MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNW
VERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK

Chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:51):

DIVMTQGTLNPNVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPQGQSP
QLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFG
GGTKLELKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGS
ERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV
KSFNRNEC

Thẻ liên hợp miễn dịch được tạo ra trong ví dụ này được sử dụng tiếp trong ví dụ sau.

Ví dụ 2

Ví dụ 2A. Gắn kết của PD1-IL2v với tế bào T CD8 và CD4 đã được hoạt hóa

PBMC mới phân lập từ đối tượng cho là người khỏe mạnh được kích thích qua đêm với CD3 và CD28 để gây ra quá trình điều hòa tăng của PD1 đối với tế bào T. PBMC được gieo mầm trong môi trường (RPMI1640, FCS 10%, Glutamin 2 mM) vào bình nuôi cấy tế bào được phủ trong 1 giờ ở 37°C với 1 µg/ml CD3 (dòng vô tính

OKT3, #317304, BioLegend). CD28 được bổ sung trong dung dịch vào PBMC ở nồng độ là 2 $\mu\text{g/ml}$ (dòng vô tính CD28,2, #302914, BioLegend). Vào ngày tiếp theo, PBMC được thu hoạch và được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 giếng (200.000 tế bào trong mỗi giếng). Tế bào được rửa bằng dung dịch đệm FACS (PBS, FBS 2%, 5 mM EDTA, NaN_3 0,025%) và được nhuộm bằng 40 μl các phân tử được chỉ định (PD1 IgG, PD1-IL2v và CEA-IL2v) trong dung dịch đệm FACS trong 30 phút ở tốc độ 4°C. Tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS để loại bỏ các phân tử không gắn kết. Sau đó, 40 μl kháng thể thứ cấp đặc hiệu Fc kháng người PE pha loãng (#109-116-170, Jackson ImmunoResearch) được bổ sung vào tế bào. Sau 30 phút ủ ở 4°C tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS. Để dò tế bào T, PBMC được nhuộm bằng 40 μl hỗn hợp của CD3 FITC (dòng vô tính UCHT1, #300406, BioLegend), CD4 APC (dòng vô tính RPA-T4, 300514, BioLegend) và CD8 BV421 (dòng vô tính RPA-T8, #301036, BioLegend) trong 30 phút ở tốc độ 4°C. Kháng thể không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS. Cuối cùng, tế bào được cố định bằng PFA 1% trong dung dịch đệm FACS và được đo bằng cách sử dụng BD Fortessa kiểm soát trên tế bào CD3+CD4+ (tế bào T CD4) và tế bào CD3+CD8+ (tế bào T CD8).

Như được thể hiện trên Fig. 2, PD1-IL2v và PD1 IgG tương ứng gắn kết tương tự với tế bào T CD4 và CD8. Xytokin miễn dịch tương tự: CEA-IL2v, hướng đích vào CEA trên tế bào khối u thay vì PD1 hoạt động như mẫu đối chứng chưa được hướng đích để so sánh với hiệu quả của xytokin miễn dịch một mình trên cơ sở IL2v không hướng đích vào PD1.

Ví dụ 2B. Hoạt hóa và tăng sinh tế bào T và tế bào NK bằng PD1-IL2v

PBMC mới phân lập từ đối tượng cho là người khỏe mạnh được ủ qua đêm và sau đó được dán nhãn bằng CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetat N-succinimidyl este, #21888, Sigma-Aldrich). Tóm lại, 30 triệu PBMC được rửa một lần bằng PBS. Đồng thời, dung dịch gốc CFSE (2 mM trong DMSO) được pha loãng 1:20 trong PBS. PBMC được tạo lại huyền phù trong 30 ml PBS đã được làm ấm sơ bộ, 30 μl dung dịch CFSE được bổ sung và tế bào được trộn ngay. Để dán nhãn tối ưu, tế bào được ủ trong 15 phút ở 37°C. Sau đó, 10 ml môi trường đã được làm ấm sơ bộ (RPMI1640, FCS 10%, Glutamin 1%) được bổ sung để dừng phản ứng dán nhãn. Tế bào được xoay

xuống trong 10 phút ở tốc độ 4000 m/s^2 và được tạo lại huyền phù trong 20 ml môi trường mới và được ủ thêm trong 30 phút nữa ở 37°C . Cuối cùng, tế bào được rửa một lần bằng môi trường và được tạo lại huyền phù trong môi trường mới ở mật độ 1 triệu tế bào trong mỗi ml. PBMC được dán nhãn được gieo mầm trong đĩa đáy tròn 96 giếng (200.000 tế bào trong mỗi giếng) và được xử lý trong 5 ngày với các phân tử được chỉ định (PD1-IL2v, CEA-IL2v, PD1 IgG, và tổ hợp của PD1 IgG cộng CEA-IL2v). Sau khi ủ, tế bào được rửa một lần bằng dung dịch đệm FACS và được nhuộm bằng 20 μl hỗn hợp của CD3 APC/Cy7 (dòng vô tính UCHT1, #300426, BioLegend), CD56 APC (dòng vô tính HCH56, 3#18310, BioLegend), CD4 PE (dòng vô tính RPA-T4, #300508, BioLegend) và CD25 BV421 (dòng vô tính M-A251, BioLegend) trong dung dịch đệm FACS trong 30 phút ở 4°C . Sau đó, PBMC được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS trước khi cố định chúng bằng PFA 1% trong dung dịch đệm FACS và đo huỳnh quang bằng BD Fortessa. Quá trình tăng sinh được xác định bằng cách đo mức pha loãng CFSE của tế bào T CD8 (CD3+CD4-), tế bào T CD4 (CD3+CD4+) và tế bào NK (CD3-CD56+).

Như được thể hiện trong Fig. 3, hoạt tính của PD1-IL2v là tương đương với hoạt tính của CEA-IL2v, và CEA-IL2v kết hợp với PD1 IgG. PD1 IgG một mình không có hoạt tính trong thiết lập này.

Fig. 4 cho thấy PD1-IL2v gây ra quá trình hoạt hóa (như được đo bằng quá trình điều hòa tăng CD25) của tế bào NK, tế bào T CD8 và tế bào T CD4. Quá trình hoạt hóa gây ra bởi CEA-IL2v và tổ hợp của CEA-IL2v với PD1 IgG là tương tự. PD1 IgG một mình không gây ra quá trình hoạt hóa trong thiết lập này.

Ví dụ 2C. Hoạt hóa và tăng sinh của tế bào T CD8 và CD4 đã được hoạt hóa sơ bộ bằng PD1-IL2v

PBMC mới phân lập từ đối tượng cho là người khỏe mạnh được dán nhãn bằng CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetat N-succinimidyl este, #21888, Sigma-Aldrich). Tóm lại, 30 triệu PBMC được rửa một lần bằng PBS. Đồng thời, dung dịch gốc CFSE (2 mM trong DMSO) được pha loãng 1:20 trong PBS. PBMC được tạo lại huyền phù trong 30 ml PBS đã được làm ấm sơ bộ, 30 μl dung dịch CFSE được bổ sung và tế bào được trộn ngay. Để dán nhãn tối ưu tế bào được ủ trong 15 phút ở 37°C . Sau đó, 10 ml môi trường đã được làm ấm sơ bộ (RPMI1640, FCS 10%, Glutamin 1%) được bổ sung

vào để dừng phản ứng dán nhãn. Tế bào được xoáy xuống trong 10 phút ở tốc độ 4000 m/s² và được tạo lại huyền phù trong 20 ml môi trường mới và được ủ thêm trong 30 phút ở 37°C. Cuối cùng, tế bào được rửa một lần bằng môi trường và được tạo lại huyền phù trong môi trường mới ở 1 triệu tế bào trong mỗi ml. PBMC đã được dán nhãn CFSE được hoạt hóa sơ bộ qua đêm bằng 1 µg/ml PHA (#L8902, Sigma-Aldrich) để gây ra quá trình điều hòa tăng của PD-1 trên T tế bào. Vào ngày tiếp theo, PBMC đã được hoạt hóa sơ bộ được thu gom và đếm. Sau đó, PBMC được gieo mầm trong đĩa đáy tròn 96 giếng (200.000 tế bào trong mỗi giếng) và được xử lý trong 4 ngày bằng các phân tử được chỉ định (PD1-IL2v, CEA-IL2v, PD1 IgG, và tổ hợp của PD1 IgG cộng CEA-IL2v). Sau khi ủ tế bào được rửa một lần bằng dung dịch đệm FACS và được nhuộm bằng 20 µl hỗn hợp của CD3 APC/Cy7 (dòng vô tính UCHT1, #300426, BioLegend), CD8 APC (dòng vô tính SK1, BioLegend) và CD25 BV421 (dòng vô tính M-A251, BioLegend) trong dung dịch đệm FACS trong 30 phút ở tốc độ 4°C. Sau đó, PBMC được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS trước khi cố định chúng bằng PFA 1% trong dung dịch đệm FACS và đo huỳnh quang bằng BD Fortessa. Quá trình tăng sinh được xác định bằng cách đo mức pha loãng của CFSE tế bào T CD8 (CD3+CD8+) và tế bào T CD4 (CD3+CD8-).

Fig. 5 cho thấy PD1-IL2v gây ra quá trình tăng sinh của tế bào T CD8 và CD4 đã được hoạt hóa PHA mà biểu hiện PD-1. Hoạt tính này là tương đương với CEA-IL2v và tổ hợp của CEA-IL2v với PD1 IgG. PD1 IgG một mình không có hoạt tính trong thiết lập này. Không quan sát được hiệu quả phong bế PD-1 bổ sung trong thiết lập này có lẽ là do sự không có mặt của tế bào khối u dương tính PD-L1.

Như được thể hiện trong Fig. 6, PD1-IL2v tạo ra hoạt hóa của tế bào T CD8 và CD4 đã được hoạt hóa PHA mà biểu hiện PD-1 (sử dụng CD25 biểu hiện làm gen đánh dấu sự hoạt hóa). CEA-IL2v và tổ hợp của CEA-IL2v với PD1 IgG tạo ra sự hoạt hóa tương đương của tế bào T. PD1 IgG một mình không có hoạt tính trong thiết lập này. Không quan sát được hiệu quả phong bế PD-1 bổ sung trong thiết lập này, có lẽ là do sự không có mặt của tế bào khối u dương tính PD-L1.

Ví dụ 2D. Quá trình tăng sinh của NK92 với PD1-IL2v và PD-L1-IL2v

Tế bào NK92 được thu hoạch, đếm và đánh giá về khả năng sống. Tế bào được rửa ba lần bằng PBS để loại bỏ IL-2 còn lại và được tạo huyền phù lại trong môi

trường (RPMI1640, FCS 10%, Glutamin 1%) không có IL-2. Tế bào NK92 đã rửa được ủ trong hai giờ trong tủ ấm nuôi cấy tế bào (bỏ đói không có IL-2). Sau khi bỏ đói, tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường mới không có IL-2 đến 200.000 tế bào trong mỗi ml và 50 μ l huyền phù tế bào được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 giếng chứa môi trường nuôi cấy tế bào đã được xử lý và được bổ sung 50 μ l kháng thể đã được pha loãng (trong môi trường không có IL-2), Proleukin (1,5 μ g/ml nồng độ cuối) hoặc môi trường (giếng đối chứng) để đạt đến thể tích cuối là 100 μ l trong mỗi giếng. Đĩa này được ủ trong 2 ngày trong tủ ấm. Sau 2 ngày, chất phản ứng CellTiter-Glo (Promega) và đĩa môi trường nuôi cấy tế bào được để cân bằng đến nhiệt độ trong phòng. Dung dịch CellTiter-Glo được tạo ra như được mô tả theo hướng dẫn của nhà sản xuất và 100 μ l dung dịch được bổ sung vào mỗi giếng. Sau 10 phút ủ, phần kết tủa còn lại được tạo huyền phù lại bằng cách nhỏ giọt và 150 μ l hỗn hợp được chuyển vào đĩa đáy tròn màu trắng. Sự phát quang được đo bằng thiết bị đọc đa chế độ Tecan Spark 10M.

Fig. 7A cho thấy PD-L1-IL2v gây ra quá trình tăng sinh của tế bào NK92 hiệu quả như CEA-IL2v. Fig. 7B cho thấy PD-L1-IL2v và PD1-IL2v có cùng hoạt tính trong việc gây ra quá trình tăng sinh của tế bào NK92. Tế bào NK92 là âm tính PD1.

Ví dụ 2E. Gắn kết của PD-L1-IL2v với tế bào CTLL2

Dòng tế bào T của loài gặm nhấm CTLL2 biểu hiện PD-L1. Các tế bào này được sử dụng để thử nghiệm gắn kết của PD-L1-IL2v (dạng thay thế của loài gặm nhấm) với PD-L1. Tế bào được thu hoạch, khả năng sống được kiểm tra và chúng được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 giếng (200.000 tế bào trong mỗi giếng). Tế bào được rửa bằng dung dịch đệm FACS (PBS, FBS 2%, 5 mM EDTA, NaN₃ 0,025%) và được nhuộm bằng 40 μ l phân tử được chỉ định trong dung dịch đệm FACS trong 30 phút ở tốc độ 4°C. Tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS để loại bỏ các phân tử không gắn kết. Sau đó, 40 μ l kháng thể thứ cấp đặc hiệu Fc kháng chuột APC đã được pha loãng (#115-136-071, Jackson ImmunoResearch) được bổ sung vào tế bào. Sau 30 phút ủ ở 4°C tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS. Tế bào được phân tích bằng BD LSR Fortessa.

Fig. 8 cho thấy PD-L1-IL2v gắn kết với tế bào CTLL2 tốt như PD-L1 mIgG₁ tương ứng. Các tế bào này là âm tính PD1.

Ví dụ 2F. Quá trình tăng sinh của tế bào CTLL2 với PD1-IL2v và PD-L1-IL2v

Tế bào CTLL2 được thu hoạch, đếm và đánh giá về khả năng sống. Tế bào được rửa ba lần bằng PBS (để loại bỏ IL-2 còn lại), được tạo lại huyền phù trong môi trường (RPMI1640, FCS 10%, Glutamin 1%) không có IL-2 và được ủ trong hai giờ trong tủ ấm nuôi cấy tế bào (bỏ đối không có IL-2). Sau khi bỏ đối, 200.000 tế bào CTLL2 trong mỗi ml được tạo huyền phù lại trong môi trường mới không có IL2 và 50 µl huyền phù tế bào được chuyển vào đĩa đáy tròn được xử lý môi trường nuôi cấy tế bào 96 giếng. 50 µl PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm đã được pha loãng, PD-L1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm, CEA-IL2v thay thế của loài gặm nhấm, Proleukin đã được pha loãng (1,5 µg/ml nồng độ cuối) hoặc môi trường một mình (tất cả đều sử dụng môi trường không chứa IL-2) được bổ sung vào giếng đến thể tích cuối là 100 µl/giếng. Các mẫu được ủ trong 3 ngày trong tủ ấm nuôi cấy tế bào và quá trình tăng sinh được đánh giá bằng cách sử dụng CellTiter-Glo theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, 100 µl chất phản ứng được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ trong 10 phút. Phần kết tủa còn lại được tạo huyền phù lại bằng cách nhỏ giọt và 150 µl hỗn hợp được chuyển vào đĩa đáy tròn màu trắng. Sự phát quang được đo bằng thiết bị đọc đa chế độ Tecan Spark 10M.

Fig. 9A cho thấy PD-L1-IL2v gây ra quá trình tăng sinh của tế bào CTLL2. Hoạt tính này dường như cao hơn so với CEA-IL2v, có lẽ là do biểu hiện PD-L1 trên tế bào CTLL2. Fig. 9B lại cho thấy PD1-IL2v gây ra quá trình tăng sinh của tế bào CTLL2. Hoạt tính này dường như thấp hơn so với PD-L1-IL2v có lẽ là do các tế bào này chỉ biểu hiện PD-L1 chứ không phải là PD1.

Ví dụ 3

Hiệu quả *in vivo* của PD1-IL2v và PD-L1-IL2v ở mô hình khối u chuột nhất đồng gen

Thể liên hợp miễn dịch PD1-IL2v và PD-L1-IL2v (dạng thay thế của loài gặm nhấm) được thử nghiệm một mình và so với kháng thể PD1 và PD-L1 tương ứng về hiệu quả kháng khối u của chúng ở mô hình đồng gen Panc02-Fluc.

Tế bào Panc02-H7 (ung thư biểu mô tuyến tụy của chuột nhất) thu được ban đầu từ Trung tâm Ung thư MD Anderson (MD Anderson cancer center) (Texas, Mỹ) và sau khi được lưu giữ mở rộng tại ngân hàng tế bào nội bộ Roche-Glycart. Dòng tế

bào Panc02-H7-Fluc được tạo ra trong nhà bằng kỹ thuật chuyển nhiễm canxi và tách dưới dòng vô tính. Panc02-H7-Fluc được nuôi cấy trong môi trường RPMI chứa FCS 10% (Sigma), 500 $\mu\text{g/ml}$ hygromixin và 1% Glutamax. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong không khí bão hòa nước ở CO₂ 5%. Ống 23 được sử dụng để cấy ghép. Khả năng sống của tế bào là 90,4%. 1×10^5 tế bào cho mỗi động vật được tiêm vào tuyến tụy của chuột nhắt Black 6 bằng cách sử dụng ống tiêm tuberculin dung tích 0,3 ml (BD Biosciences, Đức). Để thực hiện việc này, một vết mổ nhỏ đã được thực hiện tại vị trí bụng trái của chuột đã được gây mê. Thành phúc mạc được mở và tuyến tụy được tách ra cẩn thận bằng fooc-xép. 10 microlit (1×10^5 tế bào Panc02-H7-Fluc trong môi trường RPMI) huyền phù tế bào đã được tiêm vào phần đuôi của tuyến tụy. Thành phúc mạc và vết thương ngoài da được làm kín lại bằng cách sử dụng 5/0 chỉ khâu phân hủy.

Chuột nhắt Black 6 cái 10-12 tuần tuổi khi bắt đầu thí nghiệm (Charles Rivers, Lyon, Pháp) được duy trì trong điều kiện không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu với chu kỳ hàng ngày là 12 giờ sáng / 12 giờ tối theo các hướng dẫn đã được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Quy trình nghiên cứu thử nghiệm đã được xem xét và được chính quyền địa phương phê duyệt (ZH193/2014). Sau khi được đưa đến nơi thử nghiệm, các động vật được duy trì trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được thực hiện một cách thường xuyên.

Các con chuột nhắt được tiêm trong tụy vào ngày nghiên cứu 0 với 1×10^5 tế bào Panc02-Fluc, được sắp xếp ngẫu nhiên và cân. Một tuần sau khi tiêm tế bào khối u các con chuột được tiêm trong tĩnh mạch với kháng thể PD1-IL2v, PD-L1-IL2v hoặc PD1 và PD-L1, mỗi tuần một lần trong bốn tuần.

Tất cả chuột được tiêm trong tĩnh mạch với 200 μl dung dịch thích hợp. Các con chuột trong nhóm dùng chất dẫn thuốc được tiêm dung dịch đệm histidin và nhóm điều trị dùng PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm và thể liên hợp PD-L1-IL2v hoặc kháng thể PD1 và PD-L1 tương ứng, được pha loãng bằng dung dịch đệm histidin khi thích hợp. Lượng kháng thể được tiêm cho mỗi chuột nhắt theo mg/kg là như sau: 1,5 mg/kg kháng thể PD1-IL2v và PD-L1-IL2v, 10 mg/kg PD1 và PD-L1.

Fig. 10 và Bảng 1 cho thấy hiệu quả vượt trội đáng kể qua trung gian PD1-IL2v về mức sống sót trung bình và chung tăng cường so với tất cả các tác nhân riêng lẻ khác được thử nghiệm, đặc biệt là bao gồm PD-L1-IL2v.

Bảng 1. Mức sống sót trung bình và chung của chuột nhắt Black 6 được xử lý bằng kháng thể PD1-IL2v, PD-L1-IL2v, PD1 hoặc PD-L1, ở mô hình khối u đồng gen Panc02-Fluc.

Nhóm	Mức sống sót trung bình vào ngày	Giá trị p và mẫu đối chứng	Mức sống sót chung
muPD1-IL2v	Không đạt được	<0,0001***	7/8
muPD-L1-IL2v	43	0,0045*	0/8
muPD1	58	0,0002**	0/8
muPD-L1	28	0,0985	0/8
Chất dẫn thuốc	24	1	0/8

Để chụp ảnh phát quang sinh học bằng IVIS® SPECTRUM, những con chuột được tiêm vào màng bụng bằng 150 mg/kg D-Luciferin 10 phút trước khi thu được hình ảnh phát quang sinh học (BLI) và được gây mê sau đó bằng isoflurane 4%. Tiếp theo là, các con chuột nhắt này được chuyển vào buồng phân lập, mà được định vị trong phổ IVIS®. Việc đạt được BLI *in vivo* được thực hiện bằng tín hiệu phát quang đạt được trong 10-50 giây. Dữ liệu được lưu trữ dưới dạng Radiance (photon) / giây / cm² / sr. Việc phân tích dữ liệu BLI *in vivo* được thực hiện bằng phần mềm Living Image® 4.4 và được biểu thị bằng đường cong ức chế khối u.

Fig. 11 cho thấy hiệu quả vượt trội của PD1-IL2v về việc làm giảm tín hiệu phát quang sinh học (photon/giây) so với tất cả các nhóm khác, đặc biệt là bao gồm PD-L1-IL2v. Ngay sau khi dùng liệu pháp đầu tiên vào ngày 7, việc giảm tín hiệu phát quang sinh học Panc02-Fluc được phát hiện bằng phổ IVIS® trong một vài nhóm đã được xử lý, nhưng chỉ PD1-IL2v cho thấy sự biến mất hoàn toàn của tín hiệu BLI ở hầu hết các con chuột kéo dài toàn bộ thời gian của thí nghiệm, cho thấy phản ứng hoàn toàn ở 7 trên 8 con chuột.

Ví dụ 4

Hiệu quả của việc phân phối IL-2v đến tế bào T đặc hiệu virus đã bị suy giảm chức năng thông qua hoặc sự phong bế PD-1 hoặc PD-L1

Biểu hiện PD-1 đã được mô tả cho lần đầu tiên trên tế bào T đặc hiệu virus đã bị suy giảm chức năng như là hậu quả của việc phơi nhiễm mạn tính với kháng nguyên virus và nó có liên quan đến việc tế bào T không có khả năng thực hiện đáp ứng chống virus hiệu quả. Tế bào T CD4 đặc hiệu virus có khả năng đồng thời tiết IL-2 và IFN- γ mang lại khả năng bảo vệ chống lại việc gây bất hoạt lại virus ở nhiễm khuẩn mạn tính. Thực vậy, dấu hiệu đa chức năng của tế bào T CD4 có liên quan đến việc kiểm soát virus ở các cá thể khỏe mạnh bị lây nhiễm Cytomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV) và virus gây bệnh mụn giộp (HSV) cũng như ở các cá thể bị lây nhiễm virus gây thiếu hụt miễn dịch mắc phải của người (HIV) mà vẫn không có các triệu chứng trong vài năm.

Vì vậy, trong trường hợp của nhiễm khuẩn virus mạn tính, các tác giả sáng chế đã phát triển thử nghiệm *in-vitro* để đánh giá hiệu quả của việc hướng đích PD-1 và PD-L1 để chuyển phiên bản đã được gây đột biến của IL-2 (IL-2v) đến tế bào T đặc hiệu kháng nguyên rối loạn chức năng. Để tránh sự hạn chế đối với lượng thể nhận thích hợp đối với thử nghiệm theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã chọn lựa protein-virus sinh miễn dịch CMV (pp65) làm kháng nguyên nhắc lại đối với tế bào T cho rằng khoảng 80% quần thể có huyết thanh dương tính với CMV. Do đó, các tác giả sáng chế đã kích thích tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) thể nhận là người khỏe mạnh với CMV-pp65 trong một vài giờ trước khi bổ sung các cấu trúc ở nồng độ là 10 $\mu\text{g/ml}$. 43 giờ sau các tác giả sáng chế đã phong bế việc vận chuyển protein từ Golgi bằng cách bổ sung Golgi Plug (Brefeldin A) và Golgi Stop (Monensin) và ủ tế bào ở 37°C thêm trong 5 giờ. Sau đó, các tế bào được rửa, được nhuộm trên bề mặt bằng kháng thể kháng người CD3, CD4, CD8, CD62L và CD45RO trước khi được cố định/được thấm bằng dung dịch đệm Fix/Perm (BD Bioscience). Cuối cùng, các tác giả sáng chế đã thực hiện việc nhuộm nội bào cho IL-2, IFN- γ và Ki67 (cả hai đều từ eBioscience).

Các tác giả sáng chế đã quan sát được rằng cả PD1-IL2v và PD-L1-IL2v, cũng như tổ hợp của kháng thể IgG tương ứng với IL-2v, đã tăng, ở mức tương đương, tần suất của tế bào T CD4 đa chức (Fig. 12B) và lần lượt IL-2 và IFN- γ đơn chức (Fig. 12A và 12C), tạo ra hiệu quả tăng cường so với lần lượt sự phong bế kháng thể kháng PD-1 và kháng PD-L1. Quần thể mở rộng ở tế bào T CD4 đa chức (Fig. 13B) và IFN- γ

đơn chức (Fig. 13C và 13D) cho thấy profin hiệu ứng biệt hóa kết thúc và hiệu ứng-nhớ ($CD45RO^+ CD62L^-$) ($CD45RO^- CD62L^-$). Ngược lại, tế bào T CD4 IL-2-đơn chức gây ra bởi cơ chế đối kháng PD-L1, và được mở rộng tiếp bằng cách phân phối đồng thời IL-2v, cho thấy tín hiệu nguyên thể ($CD62L^+ CD45RO^-$) (Fig. 13A).

Các tác giả sáng chế có thể kết luận được rằng việc phân phối IL-2v đến tế bào T CD4 đặc hiệu CMV đã bị suy yếu chức năng thông qua protein dung hợp PD1-IL-2v dẫn đến việc mở rộng quần thể đặc hiệu virus bảo vệ sự tồn tại lâu dài, được đặc trưng bởi khả năng tiết đồng thời IL-2 và IFN- γ .

Ví dụ 5

Ví dụ 5A. Gắn kết ưu tiên của PD1-IL2v với tế bào T thông thường đã hoạt hóa so với tế bào T điều hòa đã được hoạt hóa

Các đặc tính gắn kết của PD1-IL2v với tế bào T điều hòa và thông thường đã được hoạt hóa được đánh giá trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Tế bào T điều hòa $CD4^+ CD25^+ CD127^{dim}$ (T_{reg}) được phân lập bằng kit phân lập tế bào T điều hòa hai bước (Miltenyi, #130-094-775). Đồng thời, tế bào T thông thường $CD4^+ CD25^-$ (T_{conv}) được phân lập bằng cách thu gom phân đoạn âm tính của quá trình chọn lọc dương tính CD25 (Miltenyi, #130-092-983), tiếp theo là làm giàu $CD4^+$ (Miltenyi, #130-045-101). T_{conv} được dán nhãn bằng CFSE (eBioscience, #65-0850-84) và T_{reg} được dán nhãn bằng Cell Trace Violet (ThermoFisher Scientific, C34557) để kiểm tra quá trình tăng sinh của cả hai quần thể. T_{conv} và T_{reg} cùng được gieo mầm vào đĩa nuôi cấy được phủ qua đêm ở 4°C với 1 μ g/ml CD3 (dòng vô tính OKT3, #317315, BioLegend). CD28 được bổ sung trong dung dịch ở nồng độ là 1 μ g/ml CD28 (dòng vô tính CD28,2, #302923, BioLegend). Sau 5 ngày kích thích, thử nghiệm gắn kết được thực hiện với PD1 (0376) và PD1-IL2v (0590), cả hai đều được dán nhãn trong nhà bằng AF647.

Kháng thể lưỡng đặc hiệu PD1-IL2v có profin gắn kết tương đương với PD1 (Fig. 14A và 14B). Fig. 14A thể hiện Delta của tần suất của kháng thể đã cho gắn kết trên T_{conv} và T_{reg} trong cùng một mẫu. Mỗi ký hiệu đại diện cho một thể cho riêng biệt, đường nằm ngang biểu thị trung vị với N=4. Cả hai phân tử đều có khả năng gắn kết với T_{conv} cao hơn so với T_{reg} do mức biểu hiện của PD-1 trên T_{conv} cao hơn so với trên T_{reg} (Fig. 14B; dữ liệu từ một thể cho đại diện cho thấy sự gắn kết với T_{conv} (đường

màu đen) và T_{reg} (đường màu xám)). Do đó, kháng thể lưỡng đặc hiệu PD1-IL2v duy trì đặc tính gắn kết của PD1 mặc dù IL2v được ngẫu hợp với kháng thể.

Ví dụ 5B. Cứu chữa chức năng tác động T_{conv} khi điều trị bằng PD1-IL2v trong thử nghiệm ức chế T_{reg}

Trong bước tiếp theo, nó được thử nghiệm, nếu PD1-IL2v có thể đảo ngược sự ức chế T_{reg} của T_{conv}. Vì vậy, thử nghiệm chức năng ức chế được thiết lập, trong đó T_{conv} và T_{reg} được nuôi cấy cùng nhau trong 5 ngày, có hoặc không có kháng thể phong bế, với sự có mặt của CD4⁺ CD25⁺ từ thể cho không liên quan đối với sự kích thích đặc hiệu khác loài. Nhằm mục đích này, T_{conv} và T_{reg} được phân lập và được dán nhãn như được mô tả trên đây. Việc tích tụ xytokin trong phức Golgi được tăng cường bằng cách dùng chất ức chế vận chuyển protein (GolgiPlug #555029, BD và GolgiStop #554724, BD) trong 5 giờ trước khi nhuộm FACS.

Khả năng của T_{conv} đã được làm tăng sinh để tiết granzym B (GrzB; Fig. 15A) và interferon gamma (IFN γ ; Fig. 15B) với sự có mặt và không có mặt của T_{reg} được đo. Mức ức chế T_{reg} được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ mức ức chế xytokin} = 100 - (\% \text{ xytokin}_{T_{conv}+T_{reg} \pm \text{kháng thể phong bế}}) / (\% \text{ xytokin}_{T_{conv} \text{ không được xử lý}}) * 100)$$

trong đó % xytokin_{T_{conv}+T_{reg} ± kháng thể phong bế} là mức xytokin được tiết bởi T_{conv} với sự có mặt của T_{reg} ± kháng thể phong bế, % xytokin_{T_{conv} không được xử lý} là mức xytokin được tiết bởi T_{conv} trung bình với sự không có mặt của T_{reg}. Trên Fig. 15A và 15B, mỗi ký hiệu đại diện cho một thể cho riêng biệt, đường nằm ngang biểu thị trung vị với N=5, đường chấm chấm ở 0% thể hiện không có sự ức chế bởi T_{reg}. P được tính bằng cách sử dụng ANOVA một chiều (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

Fig. 15A cho thấy việc điều trị bằng kháng thể PD1 (0376) dẫn đến mức ức chế chức năng T_{conv} bằng 47,7%, so với mức ức chế trung bình 68,6% ở nhóm không được xử lý (không có ý nghĩa thống kê). Tương tự, mức phong bế tương tác PD-1/PD-L1 bằng Atezolizumab, Nivolumab và Pembrolizumab cho thấy cùng xu hướng như đối với kháng thể PD1. Thú vị là, DP47-IL2v (giá trị trung bình = -11,3%, p = 0,0011) và PD1-IL2v (giá trị trung bình = -43,6%, p < 0,0001) đã cứu chữa chức năng tác động

T_{conv} GrzB từ sự ức chế T_{reg} . Hơn nữa, PD1-IL2v thậm chí còn mạnh hơn đáng kể ($p = 0,0026$) kháng thể PD1 một mình.

Đồng thời, phân tích tương tự đã được thực hiện đối với sự ức chế INF γ của T_{conv} nhờ T_{reg} (Fig. 15B). DP47-IL2v (giá trị trung bình = 51,77%, $p = 0,0251$) và PD1-IL2v (giá trị trung bình = 31,23%, $p < 0,0001$) đã cứu chữa chức năng tác động T_{conv} INF γ từ sự ức chế T_{reg} .

Ví dụ 6

Hiệu quả *in vivo* của thể liên hợp miễn dịch PD1-IL2v ở mô hình đồng gen của các dòng tế bào khối u chuột nhắt so với kháng thể PD1 và FAP-IL2v dưới dạng một tác nhân duy nhất và ở dạng kết hợp

Thể liên hợp miễn dịch thay thế PD1-IL2v của loài gặm nhấm (muPD1-IL2v) được thử nghiệm so với tổ hợp của kháng thể thay thế PD1 của loài gặm nhấm và FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm (muFAP-IL2v) về hiệu quả kháng khối u của nó ở mô hình đồng gen. Mô hình đồng gen được sử dụng là mô hình đồng gen tuyến tụy Panc02-Fluc.

Thể liên hợp miễn dịch thay thế PD1-IL2v của loài gặm nhấm được thử nghiệm ở dòng tế bào chuyển nhiễm Panc02-Fluc tuyến tụy ở chuột nhắt được tiêm vào tụy của chuột nhắt Black 6. Tế bào Panc02-H7 (ung thư biểu mô tuyến tụy của chuột nhắt) thu được ban đầu từ Trung Tâm Ung thư MD Anderson (Texas, Mỹ) và sau khi được lưu giữ mở rộng tại Ngân hàng tế bào nội bộ Roche-Glycart. Dòng tế bào Panc02-H7-Fluc được tạo ra trong nhà bằng kỹ thuật chuyển nhiễm canxi và tách dưới dòng vô tính. Panc02-H7-Fluc được nuôi cấy trong môi trường RPMI chứa FCS 10% (Sigma), 500 μ g/ml hygromixin và Glutamax 1%. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong không khí bão hòa nước ở CO₂ 5%. Ống 23 được sử dụng để cấy ghép. Khả năng sống của tế bào là 87,5%. 1×10^5 tế bào cho mỗi con chuột được tiêm vào tuyến tụy của chuột nhắt bằng cách sử dụng ống tiêm tuberculin dung tích 0,3 ml (BD Biosciences, Đức). Để thực hiện việc này, một vết mổ nhỏ đã được tạo ra tại vị trí bụng trái của chuột nhắt Black 6 đã được gây mê. Thành phúc mạc được mở và tuyến tụy được tách ra cẩn thận bằng fooc-xép. 10 microlit (1×10^5 tế bào Panc02-H7-Fluc trong môi trường RPMI) huyền phù tế bào được tiêm vào phần cuối của tuyến tụy. Thành phúc mạc và vết thương ngoài da được làm kín lại bằng cách sử dụng chỉ khâu phân hủy 5/0.

Chuột nhắt Black 6 cái 10-12 tuần tuổi khi bắt đầu thí nghiệm (Charles Rivers, Lyon, Pháp) được duy trì trong điều kiện không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu với chu kỳ hàng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn đã cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Quy trình nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và phê duyệt bởi chính quyền địa phương (ZH193/2014). Sau khi được đưa đến nơi thử nghiệm, các con chuột được duy trì trong một tuần để làm quen với môi trường mới và quan sát. Việc theo dõi sức khỏe được thực hiện một cách thường xuyên.

Chuột được tiêm trong tụy vào ngày nghiên cứu 0 với 1×10^5 tế bào Panc02-Fluc, được sắp xếp ngẫu nhiên và cân. Một tuần sau khi tiêm, tế bào khối u của chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch bằng hai liều dùng khác nhau của PD1-IL2v và so sánh với tổ hợp của kháng thể PD1 và FAP-IL2v, một lần mỗi tuần trong bốn tuần.

Tất cả các con chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch bằng 200 μ l dung dịch thích hợp. Các con chuột trong nhóm dùng chất dẫn thuốc được tiêm bằng dung dịch đậm histidin và nhóm điều trị được tiêm bằng kháng thể PD1-IL2v (0,5 mg/kg hoặc 1 mg/kg), PD1 (10 mg/kg) và FAP-IL2v (2,5 mg/kg) hoặc hỗn hợp của kháng thể PD1 và FAP-IL2v (10mg/kg PD1 và 2,5 mg/kg FAP-IL2v). Để thu được lượng thể liên hợp miễn dịch thích hợp trong mỗi 200 μ l, dung dịch gốc được pha loãng bằng dung dịch đậm histidin khi cần theo Bảng 2.

Bảng 2. Hợp chất, liều dùng, dung dịch đậm pha chế và nồng độ dung dịch gốc.

Hợp chất	Liều dùng	Dung dịch đậm pha chế	Nồng độ dung dịch gốc (mg/mL)
muPD1-IL2v	10 μ g và 30 μ g	20 mM Histidin, 140 mM NaCl, Tween20 0,01%; pH6,0	3,63
muFAP -IL2v	50 μ g	20 mM Histidin, 140 mM NaCl, Tween20 0,01%; pH6,0	4,91
muPD1	200 μ g	20 mM Histidin, 140 mM NaCl, Tween20 0,01%; pH6,0	5,84

Để tạo ảnh phát quang sinh học bằng phổ IVIS®, các con chuột được tiêm vào màng bụng bằng 150 mg/kg D-Luciferin 10 phút trước khi thu được hình ảnh phát quang sinh học (BLI) và được gây mê sau đó bằng isoflurane 4%. Tiếp theo, các con chuột được chuyển vào buồng phân lập, mà được đặt vào phổ IVIS®. Việc đạt được BLI *in vivo* được thực hiện bằng tín hiệu phát quang đạt được trong 10-50 giây. Dữ liệu được lưu trữ dưới dạng bức xạ (photon)/giây/cm²/sr. Phân tích dữ liệu BLI *in vivo* được thực hiện bằng phần mềm Living Image® 4.4 và được thể hiện bằng đường cong ức chế khối u.

Để đánh giá miễn dịch-dược lực học bằng mô học, 3 con chuột trong mỗi nhóm đã được giết 4 ngày sau lần trị liệu trật khớp cổ đầu tiên. Khối u tuyến tụy được thu hoạch và cố định ngay trong formalin 10%. Các mô được để trong dung dịch formalin qua đêm và sau đó được xử lý cho FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 µm được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Hóa mô miễn dịch CD3, PD1 và ICOS chuột nhất được thực hiện trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus.

Fig. 16 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm với FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm và kháng thể PD-1 thay thế của loài gặm nhấm dưới dạng một tác nhân duy nhất và ở dạng kết hợp. Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy chuyển nhiễm Panc02-H7-Fluc được tiêm vào tuyến tụy ở chuột nhất Black 6 để nghiên cứu mức sống sót ở mô hình đồng gen thẳng tuyến tụy. Lượng kháng thể được tiêm cho mỗi chuột nhất theo mg/kg là như sau: 0,5 và 1 mg/kg PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm, 10 mg/kg kháng thể thay thế PD1 của loài gặm nhấm và 2,5 mg/kg FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm kháng thể. Kháng thể được tiêm trong tĩnh mạch một lần mỗi tuần trong 4 tuần. Mức sống sót trung bình và chung vượt trội đáng kể quan sát được ở 0,5 và 1 mg/kg PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm so với tất cả các tác nhân duy nhất khác và hỗn hợp của kháng thể thay thế PD-1 của loài gặm nhấm và FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm. Fig. 16 và Bảng 3 cho thấy cả hai liều dùng có hiệu quả vượt trội qua trung gian PD1-IL2v về mức sống sót trung bình và chung tăng cường so với tất cả các tác nhân duy nhất khác, cũng như hỗn hợp của PD1 và FAP-IL2v.

Bảng 3: Mức sống sót trung bình và chung của chuột nhắt Black 6 được xử lý bằng PD1-IL2v, PD1, FAP-IL2v và hỗn hợp của kháng thể PD-1 và FAP-IL2v, ở mô hình khối u đồng gen Panc02-Fluc.

Nhóm	Mức sống sót trung bình vào ngày	Giá trị p và mẫu đối chứng	Mức sống sót chung
muPD1-IL2v (0,5 mg/kg)	Không đạt được	<0,0001***	4/7
muPD1-IL2v (1 mg/kg)	Không đạt được	<0,0001***	7/7
muPD1 (10 mg/kg)	63	0,0014*	0/7
muFAP-IL2v	45	0,0941	0/6
muPD-1 và muFAP-IL2v	75	0,0002***	1/7
Chất dẫn thuốc	37	1	0/6

Fig. 17 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh giữa PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm với FAP-IL2v, kháng thể thay thế PD1 của loài gặm nhấm và hỗn hợp của chúng. Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy chuyển nhiễm Panc02-H7-Fluc được tiêm vào tuyến tụy ở chuột nhắt Black 6 để nghiên cứu mức sống sót ở mô hình đồng gen thẳng tuyến tụy bằng phương pháp phát quang sinh học. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất vào ngày 7 mức giảm tín hiệu phát quang sinh học Panc02-Fluc được phát hiện bằng phổ IVIS® trong một vài nhóm đã được xử lý, nhưng chỉ PD1-IL2v mới cho thấy sự biến mất hoàn toàn của tín hiệu BLI ở hầu hết các con chuột kéo dài trong suốt thời gian thử nghiệm, cho thấy sự đáp ứng hoàn toàn ở 4 trên 7 con chuột đối với liều dùng 0,5 mg/kg và 7 trên 7 con chuột đối với liều dùng 1 mg/kg. Fig. 17 cho thấy cả hai liều dùng PD1-IL2v đều tạo ra hiệu quả vượt trội về việc giảm tín hiệu phát quang sinh học (photon/giây) so với tất cả các tác nhân duy nhất khác và nhóm kết hợp.

Fig. 18A và 18B thể hiện kết quả về hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể CD3 kháng chuột (Fig. 18A) và phân tích định lượng tế bào T (Fig. 18B). Nhuộm mô hóa miễn dịch tế bào T CD3 được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhất Black 6 có nguồn gốc từ các nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ động vật sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch CD3 chuột nhất được thực hiện với kháng thể CD3 kháng chuột (Diagnostic Biosystem, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Việc định lượng tế bào T dương tính μ CD3 được thực hiện bằng phần mềm Definiens (Definiens, Đức). Thống kê được phân tích bằng ANOVA 1 chiều với nhiều thử nghiệm so sánh. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất, vào ngày thứ 4, đã phát hiện sự gia tăng đáng kể số lượng tế bào T dương tính với CD3 trong nhóm được điều trị bằng PD1-IL2v so với nhóm dùng chất dẫn thuốc. Xu hướng tăng tế bào dương tính với CD3 cũng quan sát được trong hỗn hợp của kháng thể thay thế PD1 của loài gặm nhấm và FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm so với chất dẫn thuốc, nhưng không đáng kể. Fig. 18A và 18B cho thấy PD1-IL2v đã tạo ra mức gia tăng hiện tượng thâm nhập CD3 trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Fig. 19 thể hiện kết quả của hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể PD1 kháng chuột. Nhuộm mô hóa miễn dịch tế bào T dương tính với PD1 được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhất Black 6 có nguồn gốc từ nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ động vật sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch PD1 chuột nhất được thực hiện với kháng thể PD1 kháng chuột (R&D System, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất, vào ngày thứ 4, đã phát hiện mức gia tăng rất cao số lượng tế bào T dương tính với PD1 ở nhóm được điều trị bằng PD1-IL2v so với nhóm được dùng chất dẫn thuốc. Cũng quan

sát được mức gia tăng vừa phải tế bào dương tính với PD1 trong hỗn hợp của kháng thể thay thế PD1 của loài gặm nhấm và FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm khi so với chất dẫn thuốc. Fig. 19 cho thấy PD1-IL2v đã tạo ra mức gia tăng hiện tượng thâm nhập tế bào T dương tính với PD1 trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Fig. 20 thể hiện kết quả của hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể ICOS kháng chuột. Nhuộm mô hóa miễn dịch tế bào T dương tính với ICOS được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhắt Black 6 thu được từ nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ các con chuột sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch ICOS chuột nhắt được thực hiện với kháng thể ICOS kháng chuột (My Biosource, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất, vào ngày thứ 4, đã phát hiện mức giảm tế bào T dương tính với ICOS trong nhóm được điều trị PD1-IL2v so với nhóm được dùng chất dẫn thuốc. Fig. 20 cho thấy PD1-IL2v đã tạo ra mức giảm hiện tượng thâm nhập tế bào T dương tính với ICOS trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Ví dụ 7

Hiệu quả *in vivo* của thể liên hợp miễn dịch PD1-IL2v ở mô hình đồng gen của các dòng tế bào khối u chuột nhắt so với kháng thể PD1 và FAP-IL2v (hai liều dùng khác nhau) dưới dạng một tác nhân duy nhất và ở dạng kết hợp.

Thể liên hợp miễn dịch PD1-IL2v được thử nghiệm so với kháng thể thay thế PD1 của loài gặm nhấm cộng với hỗn hợp FAP-IL2v thay thế của loài gặm nhấm với hai liều dùng khác nhau cho hiệu quả kháng khối u của nó ở một mô hình đồng gen. Mô hình đồng gen được sử dụng là mô hình đồng gen tuyến tụy Panc02-Fluc. Thể liên hợp miễn dịch PD1-IL2v thay thế của loài gặm nhấm được thử nghiệm ở dòng tế bào chuyển nhiễm Panc02-Fluc tuyến tụy chuột nhắt được tiêm vào tụy của chuột nhắt Black 6. Tế bào Panc02-H7 (ung thư biểu mô tuyến tụy của chuột nhắt) thu được ban đầu từ Trung tâm Ung thư MD Anderson (Texas, Mỹ) và sau khi được lưu giữ mở

rộng tại Ngân hàng tế bào nội bộ Roche-Glycart. Dòng tế bào Panc02-H7-Fluc được tạo ra trong nhà bằng kỹ thuật chuyển nhiễm canxi và tách dưới dòng vô tính. Panc02-H7-Fluc được nuôi cấy trong môi trường RPMI chứa FCS 10% (Sigma), 500 µg/ml hygromixin và Glutamax 1%. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong không khí bão hòa nước ở CO₂ 5%. Ống 16 được sử dụng để cấy ghép. Khả năng sống của tế bào là 83,3%. 1x10⁵ tế bào cho mỗi con chuột được tiêm vào tuyến tụy của chuột nhắt bằng cách sử dụng ống tiêm tuberculin dung tích 0,3 ml (BD Biosciences, Đức). Để thực hiện điều này, một vết mổ nhỏ đã được tạo ra tại vị trí bụng bên trái của chuột nhắt Black 6 đã được gây mê. Thành phúc mạc được mở và tuyến tụy được tách ra cẩn thận bằng forceps-xếp. 10 microlit (1x10⁵ tế bào Panc02-H7-Fluc trong môi trường RPMI) huyền phù tế bào được tiêm vào phần cuối của tuyến tụy. Thành phúc mạc và vết thương ngoài da được làm kín lại bằng cách sử dụng chỉ khâu phân hủy 5/0.

Chuột nhắt Black 6 cái 10-12 tuần tuổi khi bắt đầu thử nghiệm (Charles Rivers, Lyon, Pháp) được duy trì trong điều kiện không có tác nhân gây bệnh đặc hiệu với chu kỳ hàng ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn đã cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Quy trình nghiên cứu thử nghiệm đã được xem xét và phê duyệt bởi chính quyền địa phương (ZH193/2014). Sau khi được đưa đến nơi thử nghiệm, động vật được duy trì trong một tuần để làm quen với môi trường mới và quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được thực hiện một cách thường xuyên.

Chuột được tiêm trong tụy vào ngày nghiên cứu 0 bằng 1x10⁵ tế bào Panc02-Fluc, được lấy ngẫu nhiên và cân. Một tuần sau khi tiêm, tế bào khối u chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch bằng PD1-IL2v và so sánh với hỗn hợp của PD1 + FAP-IL2v Mabs với hai liều dùng khác nhau, mỗi tuần một lần trong ba tuần.

Tất cả các con chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch bằng 200 µl dung dịch thích hợp. Chuột nhắt trong nhóm được dùng chất dẫn thuốc được tiêm dung dịch đậm histidin và nhóm điều trị bằng kháng thể PD1-IL2v (1 mg/kg), PD1 (10 mg/kg) và FAP-IL2v (0,625 mg/kg hoặc 1,25 mg/kg) hoặc hỗn hợp của kháng thể PD1 + FAP-IL2v (10 mg/kg + 1,25 mg/kg hoặc 10 mg/kg + 0,625 mg/kg). Để thu được lượng thể liên hợp miễn dịch thích hợp trong mỗi 200 µl, dung dịch gốc được pha loãng bằng dung dịch đậm histidin khi cần theo Bảng 4.

Bảng 4. Hợp chất, liều dùng, dung dịch đậm pha chế và nồng độ dung dịch gốc.

Hợp chất	Liều dùng	Dung dịch đệm pha chế	Nồng độ dung dịch gốc (mg/mL)
muPD1-IL2v	10 µg và 30 µg	20 mM Histidin, 140 mM NaCl, Tween20 0,01%; pH6,0	3,63
muFAP-IL2v	50 µg	20 mM Histidin, 140 mM NaCl, Tween20 0,01%; pH6,0	4,91
muPD1	200 µg	20 mM Histidin, 140 mM NaCl, Tween20 0,01%; pH6,0	5,84

Để tạo ảnh phát quang sinh học bằng phổ IVIS®, chuột nhắt được tiêm vào màng bụng bằng 150 mg/kg D-Luciferin 10 phút trước khi thu được hình ảnh phát quang sinh học (BLI) và được gây mê sau đó bằng isoflurane 4%. Tiếp theo, chuột nhắt được chuyển vào buồng phân lập, mà được đặt vào phổ IVIS®. Việc đạt được BLI *in vivo* được thực hiện bằng tín hiệu phát quang đạt được trong 10-50 giây. Dữ liệu được lưu trữ dưới dạng Bức xạ (photon)/giây/cm²/sr. Phân tích dữ liệu BLI *in vivo* được thực hiện bằng phần mềm Living Image® 4.4 và được thể hiện bằng đường cong ức chế khối u.

Để đánh giá miễn dịch-dược lực học bằng mô học, 3 chuột nhắt từ nhóm đã chọn lọc được giết 4 ngày sau lần trị liệu trật khớp cổ thứ nhất. Khối u tuyến tụy được thu hoạch và cố định ngay trong formalin 10%. Các mô được đặt trong dung dịch formalin qua đêm và sau đó được xử lý về FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 µm được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch CD3, CD8, PD1 và Granzym B chuột nhắt được thực hiện trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus.

Fig. 21 và Bảng 5 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh giữa kháng thể muPD1-IL2v với kháng thể muFAP-IL2v và muPD-1 dưới dạng một tác nhân duy

nhất và ở dạng kết hợp. Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy chuyển nhiễm Panc02-H7-Fluc được tiêm vào tuyến tụy ở chuột nhắt Black 6 để nghiên cứu mức sống sót ở mô hình đồng gen thẳng tuyến tụy. Lượng kháng thể được tiêm cho mỗi chuột nhắt theo mg/kg là như sau: 1 mg/kg kháng thể muPD1-IL2v, 10 mg/kg muPD1 và 0,625 hoặc 1,25 mg/kg muFAP-IL2v. Kháng thể được tiêm trong tĩnh mạch một lần mỗi tuần trong 4 tuần. Mức sống sót trung bình và chung vượt trội đáng kể quan sát được trong 1 mg/kg muPD1-IL2v so với tất cả các tác nhân duy nhất khác và hỗn hợp của muPD-1 + muFAP-IL2v ở cả hai liều dùng được thử nghiệm. Do đó, có thể kết luận được rằng hiệu quả vượt trội qua trung gian PD1-IL2v về mức sống sót trung bình và chung tăng cường so với tất cả các tác nhân duy nhất khác, cũng như hỗn hợp của PD1 + FAP-IL2v ở cả hai liều dùng được thử nghiệm.

Bảng 5: Mức sống sót trung bình và chung của chuột nhắt Black 6 được xử lý bằng PD1-IL2v, PD1, FAP-IL2v và hỗn hợp của kháng thể PD-1 và FAP-IL2v, ở mô hình khối u đồng gen Panc02-Fluc.

Nhóm	Mức sống sót trung bình vào ngày	Giá trị p và mẫu đối chứng	Mức sống sót chung
Chất dẫn thuốc	30	1,0000	0/6
1 mg/kg muPD-1-IL2v	Không đạt được	<0,0001***	6/6
10 mg/kg muPD1 + 0,625 mg/kg muFAP-IL2v	62	0,0053*	1/6
10 mg/kg muPD1 + 1,25 mg/kg muFAP-IL2v	86	0,0005**	0/6
0,625 mg/kg muFAP-IL2v	36	0,2607	0/6
1,25 mg/kg muFAP-IL2v	31	0,6834	0/6

10 mg/kg muPD1	48	0,0005**	0/6
----------------	----	----------	-----

Fig. 22 thể hiện kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh muPD1-IL2v với FAP-IL2v, muPD1 và hỗn hợp của chúng với hai liều dùng khác nhau. Dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy chuyển nhiễm Panc02-H7-Fluc được tiêm vào tuyến tụy ở chuột nhắt Black 6 để nghiên cứu mức sống sót ở mô hình đồng gen thẳng tuyến tụy bằng phương pháp phát quang sinh học. Trong quá trình nghiên cứu, dò được sự giảm tín hiệu phát quang sinh học Panc02-Fluc bằng phổ IVIS® trong một vài nhóm đã được xử lý, nhưng chỉ có liệu pháp muPD1-IL2v cho thấy sự biến mất hoàn toàn của tín hiệu BLI ở tất cả các con chuột kéo dài trong suốt thời gian thử nghiệm, cho thấy phản ứng hoàn toàn ở cả 6 con chuột nhắt. Fig. 22 cho thấy hiệu quả vượt trội qua trung gian PD1-IL2v về mức giảm tín hiệu phát quang sinh học (photon/giây) so với tất cả các tác nhân duy nhất khác, cũng như nhóm hỗn hợp.

Fig. 23 thể hiện kết quả của hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể CD3 kháng chuột. Nhuộm mô hóa miễn dịch tế bào T CD3 được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhắt Black 6 thu được từ nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ các con chuột sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPE (Leica 1020, Đức). Phần parafin 4 μ m tiếp theo được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch chuột nhắt CD3 được thực hiện với kháng thể CD3 kháng chuột (Diagnostic Biosystem, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất, ở ngày 4, đã phát hiện được mức rất cao về số lượng tế bào T dương tính với CD3 trong nhóm được điều trị bằng muPD1-IL2v so với nhóm được dùng chất dẫn thuốc. Cũng quan sát được mức tăng vừa phải tế bào dương tính với CD3 ở tất cả các nhóm điều trị khác so với nhóm dùng chất dẫn thuốc. Fig. 23 cho thấy PD1-IL2v tạo ra sự gia tăng hiện tượng thâm nhập tế bào T dương tính với CD3 trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Fig. 24A và 24B và Bảng 6 thể hiện kết quả của hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm đối với kháng thể CD8 kháng chuột (Fig. 24A) và phân tích định lượng tế bào T (Fig. 24B). Nhuộm mô hóa miễn dịch tế bào T CD8 được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhắt Black 6 thu được từ nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ các con chuột sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch CD8 chuột nhắt được thực hiện với kháng thể CD8 kháng chuột (Serotec, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Việc định lượng tế bào T dương tính với muCD8 được thực hiện bằng phần mềm Definiens (Definiens, Đức). Việc thống kê được phân tích theo ANOVA một chiều với nhiều thử nghiệm so sánh. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất, vào ngày 4, sự gia tăng đáng kể số lượng tế bào T dương tính CD8 đã được phát hiện trong nhóm được điều trị bằng muPD1-IL2v so với tất cả các nhóm khác. Xu hướng tăng tế bào dương tính với CD8 cũng được thấy trong tất cả các nhóm trị liệu khác được thử nghiệm, nhưng không đáng kể. Do đó, Fig. 24A và 24B cho thấy PD1-IL2v tạo ra sự gia tăng hiện tượng thâm nhập CD8 trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Bảng 6. Tế bào T dương tính với CD8.

Nhóm	Số lượng tế bào T dương tính với CD8/mm ²	Giá trị p và mẫu đối chứng
muPD1-IL2v 1 mg/kg	4914	0,0032**
muPD1 10 mg/kg	974	0,7395
muFAP-IL2v 1,25 mg/kg	872	0,8066
muPD-1 10 mg/kg + muFAP-IL2v 1,25 mg/kg	1899	0,2703

Chất dẫn thuốc	590	1
----------------	-----	---

Fig. 25A và Fig. 25B và Bảng 7 thể hiện kết quả của hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm đối với phân tích định lượng vùng đánh dấu kháng Granzym B (5A) và Granzym B (5B). Nhuộm mô hóa miễn dịch Granzym B được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhắt Black 6 thu được từ nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ các con chuột sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPE (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch Granzym B chuột nhắt được thực hiện với Granzym B kháng chuột nhắt (Abcam, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Việc định lượng vùng gen đánh dấu Granzym B được thực hiện bằng phần mềm Definiens (Definiens, Đức). Việc thống kê được phân tích bằng ANOVA một chiều với nhiều thử nghiệm so sánh. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất dùng, vào ngày 4, sự gia tăng đáng kể về Granzyme B đã được phát hiện trong nhóm được điều trị bằng muPD1-IL2v so với tất cả các nhóm khác. Xu hướng tăng vùng gen đánh dấu Granzyme B cũng được thấy trong tất cả các nhóm trị liệu khác được thử nghiệm, nhưng không đáng kể. Do đó, Fig. 25A và 25B cho thấy PD1-IL2v tạo ra sự gia tăng vùng dương tính với Granzym B trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Bảng 7. Vùng dương tính với Granzym B.

Nhóm	% vùng dương tính với Granzym B	Giá trị p và mẫu đối chứng
muPD1-IL2v 1 mg/kg	16,67	0,0006**
muPD1 10 mg/kg	1,867	0,6709
muFAP-IL2v 1,25 mg/kg	1,533	0,7442

muPD-1 10 mg/kg + muFAP-IL2v 1,25 mg/kg	2,033	0,6355
Chất dẫn thuốc	0,44	1

Fig. 26A và 26B và Bảng 8 thể hiện kết quả của hình ảnh hóa mô miễn dịch của khối u tuyến tụy được nhuộm cho kháng thể PD1 kháng chuột (Fig. 26A) và phân tích định lượng tế bào dương tính với PD1 (Fig. 26B). Nhuộm mô hóa miễn dịch tế bào PD1 được thực hiện trên khối u tuyến tụy chuột nhắt Black 6 thu được từ nhóm điều trị được chỉ định. Mẫu mô được tạo ra để nhuộm mô hóa miễn dịch: khối u được thu hoạch từ các con chuột sau khi được điều trị, cố định trong formalin 10% (Sigma, Đức) và sau đó được xử lý về FFPET (Leica 1020, Đức). Tiếp theo, phần parafin 4 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu (Leica RM2235, Đức). Mô hóa miễn dịch PD1 chuột nhắt được thực hiện với kháng thể PD1 kháng chuột (Serotec, Đức) trong thiết bị nhuộm tự động Leica (Leica ST5010, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất. Hình ảnh được quét bằng máy quét Olympus. Việc định lượng tế bào dương tính với muPD1 được thực hiện bằng phần mềm Definiens (Definiens, Đức). Việc thống kê được phân tích bằng ANOVA một chiều với nhiều thử nghiệm so sánh. Ngay sau lần trị liệu thứ nhất, ở ngày 4, mức gia tăng đáng kể về số lượng của tế bào dương tính với PD1 được phát hiện trong nhóm được điều trị bằng muPD1-IL2v so với tất cả các nhóm khác. Xu hướng gia tăng tế bào dương tính với PD1 cũng thấy được trong tất cả các nhóm điều trị khác được thử nghiệm, nhưng không đáng kể. Do đó, Fig. 26A và 26B cho thấy PD1-IL2v tạo ra sự gia tăng tế bào dương tính với PD1 trong khối u tuyến tụy 4 ngày sau lần trị liệu thứ nhất so với tất cả các nhóm.

Bảng 8. Tế bào dương tính với PD1.

Nhóm	Số lượng tế bào dương tính với PD1/mm ²	Giá trị p và mẫu đối chứng
muPD1-IL2v 1 mg/kg	6628	0,0004**

muPD1 10 mg/kg	1582	0,5331
muFAP-IL2v 1,25 mg/kg	1350	0,6705
muPD-1 10 mg/kg + muFAP-IL2v 1,25 mg/kg	3038	0,0803
Chất dẫn thuốc	858	1

Ví dụ 7

Hiệu quả của sự phân phối IL-2v đến tế bào T đặc hiệu virus đã bị suy giảm chức năng thông qua sự phong bế PD-1

Sự biểu hiện PD-1 đã được mô tả lần đầu tiên ở các tế bào T đặc hiệu virus đã bị suy giảm chức năng do phơi nhiễm mạn tính với các kháng nguyên virus và nó có liên quan đến việc tế bào T không có khả năng tạo ra đáp ứng chống virus hiệu quả. Tế bào T CD4 đặc hiệu virus có thể tiết đồng thời IL-2 và IFN- γ giúp bảo vệ tránh khỏi sự hoạt hóa lại virus trong các nhiễm khuẩn mạn tính. Thật vậy, dấu hiệu đa chức năng của các tế bào T CD4 có liên quan đến sự kiểm soát virus ở các cá thể khỏe mạnh bị lây nhiễm Cytomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV) và virus gây bệnh mụn giộp (HSV) cũng như ở các cá thể bị lây nhiễm virus gây thiếu hụt miễn dịch mắc phải của người (HIV), mà vẫn không có triệu chứng trong vài năm.

Vì vậy, trong phạm vi nhiễm khuẩn virus mạn tính, các tác giả sáng chế đã phát triển thử nghiệm *in-vitro* để đánh giá hiệu quả của việc hướng đích PD-1 để phân phối phiên bản đã được gây đột biến của IL-2 (IL-2v) vào tế bào T đặc hiệu kháng nguyên rối loạn chức năng. Để tránh sự hạn chế về lượng thể cho thích hợp cho các thử nghiệm theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã chọn lựa protein virus sinh miễn dịch CMV (pp65) làm kháng nguyên nhớ lại cho các tế bào T với khoảng 80% quần thể là phản ứng dương tính với CMV. Do đó, các tác giả sáng chế đã kích thích tế bào đơn nhân máu ngoại vi của thể nhận là người khỏe mạnh (PBMC) với CMV-pp65 (Miltenyi) với sự có mặt của cấu trúc theo sáng chế ở nồng độ là 10 μ g/ml. 43 giờ sau, các tác giả sáng chế đã phong bế sự vận chuyển protein từ Golgi bằng cách bổ sung

Golgi Plug (BD Bioscience, Brefeldin A) và Golgi Stop (BD Bioscience, Monensin) và ủ tế bào ở 37°C thêm trong 5 giờ. Sau đó, các tế bào được rửa, được nhuộm lên bề mặt bằng kháng thể CD3, CD4, CD8, CD62L và CD45RO kháng người trước khi được cố định/được thấm bằng bộ dung dịch nhuộm yếu tố phiên mã FoxP3 (eBioscience). Cuối cùng, các tác giả sáng chế đã thực hiện nhuộm nội bào đối với IL-2, IFN- γ và Ki67 (tất cả đều từ eBioscience) để đo quá trình tăng sinh tế bào.

Fig. 27 thể hiện khả năng của tế bào T CD4 để tiết IL-2 (A), IL-2 và IFN- γ (B) hoặc IFN- γ (C) và để tăng sinh (D) sau 48 giờ nhớ lại bằng protein sinh miễn dịch CMV pp65 với sự có mặt của hoặc kháng thể kháng PD-1 một mình, kết hợp với IL-2v, hoặc dưới dạng protein dung hợp. Các tác giả sáng chế đã quan sát được xu hướng về khả năng của PD1-IL2v để làm tăng tần suất của tế bào T CD4 đa chức, có khả năng tiết đồng thời IL-2 và IFN- γ (Fig. 21B), và gia tăng đáng kể quần thể tiết IFN- γ đơn lẻ (Fig. 21C), khi so với các mẫu được xử lý bằng pp65 và kháng thể kháng PD1. Ngược lại, hỗn hợp của pp65 và IL-2v (DP47-IL2v) không được hướng đích làm tăng tần suất của tế bào T CD4 đơn chức IL-2 (Fig. 21A). Như mong muốn, tất cả các tế bào được điều trị bằng IL-2v hướng đích hoặc không được hướng đích đã tăng sinh như được chỉ ra bởi sự dương tính với việc nhuộm Ki67

Fig. 28 thể hiện trạng thái biệt hóa, cho mỗi sự biểu hiện của CD45RO và CD62L, tế bào T CD4 đặc hiệu virus tiết IFN- γ sau 48 giờ thu hồi protein sinh miễn dịch CMV pp65 với sự có mặt của kháng thể kháng PD-1 một mình, kết hợp với IL-2v, hoặc dưới dạng protein dung hợp. Đặc điểm phenotyp của tế bào T CD4 đặc hiệu virus tiết IFN- γ đã được mở rộng (Fig. 22) đã cho thấy profin hiệu ứng nhớ (CD45RO+CD62L-). Các tác giả sáng chế có thể kết luận được rằng việc phân phối IL-2v đến tế bào T CD4 đặc hiệu CMV đã suy yếu về mặt chức năng thông qua protein dung hợp PD1-IL2v dẫn đến việc mở rộng quần thể đặc hiệu virus bảo vệ cuộc sống kéo dài được đặc trưng bởi profin nhớ đã được biệt hóa và khả năng tiết cả IL-2 lẫn IFN- γ .

Ví dụ 8

Ví dụ 8A. Hoạt hóa tế bào của thể cho 1 và 2 (thử nghiệm pSTAT5)

PBMC mới phân lập từ các thể cho khỏe mạnh được gieo mầm trong môi trường ấm (RPMI1640, FCS 10%, 2 mM Glutamin) vào đĩa đáy tròn 96 giếng

(200.000 tế bào/giếng). Các đĩa này được ly tâm ở 3000m/s^2 trong 10 phút và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 50 μl môi trường chứa các phân tử IL2 và được kích thích trong 20 phút ở 37°C . Để bảo quản trạng thái phosphoryl hóa, tế bào được cố định ngay sau khi kích thích bằng lượng bằng nhau của dung dịch đệm Cytofix được làm ấm sơ bộ (554655, BD Bioscience) trong 10 phút ở 37°C . Sau đó, các đĩa này được ly tâm trong 10 phút ở 3000 m/s^2 và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Để cho phép nhuộm nội bào, tế bào được thấm trong 200 μl dung dịch đệm Phosflow Perm III (558050, BD Bioscience) trong 30 phút ở 4°C . Sau đó, tế bào được rửa hai lần bằng 150 μl dung dịch đệm FACS lạnh và được tách vào hai đĩa đáy tròn 96 giếng và mỗi đĩa được nhuộm bằng 20 μl hỗn hợp kháng thể I hoặc II trong 60 phút trong tủ lạnh. Hỗn hợp kháng thể I được sử dụng để nhuộm pSTAT5 trong tế bào T CD4 và tế bào T điều hòa và hỗn hợp kháng thể II được sử dụng để nhuộm pSTAT5 trong tế bào T CD8 và tế bào NK. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và được tạo lại huyền phù trong 200 μl dung dịch đệm FACS chứa PFA 2% trong mỗi giếng. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào dòng BD Fortessa.

Hỗn hợp kháng thể FACS theo Bảng 9 và Bảng 10 được sử dụng.

Bảng 9. Hỗn hợp kháng thể FACS I (tế bào T CD4 và tế bào T điều hòa)

Kháng thể	Thể tích/Mẫu
CD4 PE/Cy7, dòng vô tính SK3, IgG ₁ chuột nhắt, κ (557852, BD Bioscience)	0,5 μl /giếng
CD25 APC, dòng vô tính M-A251, IgG ₁ chuột nhắt, κ (356110, BioLegend)	4 μl /giếng
FoxP3 kháng người của chuột nhắt PE, dòng vô tính 259D/C7 (560046, BD Bioscience)	1 μl /giếng
A488 pSTAT5 (pY694), dòng vô tính 47, IgG ₁ chuột nhắt (562075, BD Bioscience)	1 μl /giếng

Bảng 10. Hỗn hợp kháng thể FACS II (tế bào T CD8 và tế bào NK)

Kháng thể	Thể tích/mẫu
CD3 PE/Cy7, dòng vô tính UCHT1, IgG ₁ chuột nhắt, κ (300420, BioLegend)	1 μl /giếng
CD56 APC, dòng vô tính HCD56, IgG ₁ chuột nhắt, κ (318310, BioLegend)	1 μl /giếng
CD8 PE, dòng vô tính HIT8a, IgG ₁ chuột nhắt (555635, BD Bioscience)	1 μl /giếng
A488 pSTAT5 (pY694), dòng vô tính 47, IgG ₁ chuột nhắt (BD Bioscience)	1 μl /giếng

Fig. 29 thể hiện quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào T CD8 (A), tế bào NK (B), tế bào T CD4 (C) và tế bào T điều hòa (D) khi điều trị PBMC nghỉ của thể cho 1 bằng PD1-IL2v, FAP-IL2v và FAP-IL2wt. Tất cả ba phân tử đã thử nghiệm đều có tiềm năng như nhau đối với tế bào T CD8, tế bào NK và tế bào T CD4 (ngoại trừ Tregs). FAP-IL2wt có tiềm năng hơn khi khử quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong Tregs tiếp theo là PD1-IL2v. FAP-IL2v có hoạt tính thấp nhất đối với Tregs.

Fig. 30 thể hiện quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào T CD4 (A), tế bào T CD8 (B), tế bào T điều hòa (C) và tế bào NK (D) khi điều trị PBMC nghỉ của thể cho 2 bằng FAP-IL2v, PD1-IL2c, FAP-IL2wt và PD1-TIM3-IL2v. Tất cả bốn phân tử đã thử nghiệm đều có hoạt tính tương đương đối với tế bào T CD8, tế bào NK và tế bào T CD4 (ngoại trừ Tregs). FAP-IL2wt có tiềm năng hơn khi khử quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong Tregs tiếp theo là PD1-IL2v. FAP-IL2v có hoạt tính thấp nhất đối với Tregs.

Ví dụ 8B. Hoạt hóa tế bào của các thể cho 3 và 4 (thử nghiệm pSTAT5)

PBMC đông lạnh phân lập từ thể cho khỏe mạnh được giã đông và nuôi cấy qua đêm ở 37°C. Vào ngày tiếp theo, tế bào được gieo mầm trong môi trường ấm (RPMI1640, FCS 10%, 2 mM Glutamin) vào đĩa đáy tròn 96 giếng (200.000 tế

bào/giếng). Các đĩa này được ly tâm ở 3000 m/s² trong 10 phút và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Tế bào được tạo huyền phù lại trong 50 µl môi trường chứa phân tử IL2 và được kích thích trong 20 phút ở 37°C. Để bảo quản trạng thái phosphoryl hóa, các tế bào được cố định ngay sau khi kích thích bằng lượng bằng nhau của dung dịch đậm Cytofix được làm ấm sơ bộ (554655, BD Bioscience) trong 10 phút ở 37°C. Sau đó, các đĩa này được ly tâm trong 10 phút ở 3000 m/s² và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Để cho phép nhuộm nội bào, tế bào được thấm trong 200 µl dung dịch đậm Phosflow Perm III (558050, BD Bioscience) trong 30 phút ở tốc độ 4°C. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng 150 µl dung dịch đậm FACS lạnh và được tách vào hai đĩa đáy tròn 96 giếng và mỗi đĩa được nhuộm bằng 20 µl hỗn hợp kháng thể I hoặc II trong 60 phút trong tủ lạnh. Hỗn hợp kháng thể I được sử dụng để nhuộm pSTAT5 trong tế bào T CD4 và tế bào T điều hòa và hỗn hợp kháng thể II được sử dụng để nhuộm pSTAT5 trong tế bào T CD8 và tế bào NK. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đậm FACS và được tạo lại huyền phù trong 200 µl dung dịch đậm FACS chứa PFA 2% trong mỗi giếng. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào dòng BD Fortessa. Hỗn hợp kháng thể FACS theo Bảng 11 và Bảng 12 được sử dụng.

Bảng 11. Hỗn hợp kháng thể FACS I (tế bào T CD4 và tế bào T điều hòa)

Kháng thể	Thể tích/Mẫu
CD4 PE/Cy7, dòng vô tính SK3, IgG ₁ chuột nhắt, κ (557852, BD Bioscience)	0,5 µl /giếng
CD25 APC, dòng vô tính M-A251, IgG ₁ chuột nhắt, κ (356110, BioLegend)	4 µl /giếng
FoxP3 kháng người của chuột nhắt PE, dòng vô tính 259D/C7 (560046, BD Bioscience)	1 µl /giếng
A488 pSTAT5 (pY694), dòng vô tính 47, IgG ₁ chuột nhắt (562075, BD Bioscience)	1 µl /giếng

Bảng 12. Hỗn hợp kháng thể FACS II (tế bào T CD8 và tế bào NK)

Kháng thể	Thể tích/mẫu
CD3 PE/Cy7, dòng vô tính UCHT1, IgG ₁ chuột nhắt, κ (300420, BioLegend)	1 µl /giếng
CD56 APC, dòng vô tính HCD56, IgG ₁ chuột nhắt, κ (318310, BioLegend)	1 µl /giếng
CD8 PE, dòng vô tính HIT8a, IgG ₁ chuột nhắt (555635, BD Bioscience)	1 µl /giếng
A488 pSTAT5 (pY694), dòng vô tính 47, IgG ₁ chuột nhắt (BD Bioscience)	1 µl /giếng

Fig. 31 thể hiện quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào T CD8 (A), tế bào NK (B), tế bào T CD4 (C) và tế bào T điều hòa (D) khi điều trị PBMC nghỉ của thể cho 3 bằng FAP-IL2v, PD1-IL2v, FAP-IL2wt, PD1-TIM3-IL2v. Tất cả bốn phân tử đã thử nghiệm đều có hoạt tính tương đương đối với tế bào T CD8, tế bào NK và tế bào T CD4 (ngoại trừ Tregs). FAP-IL2wt có tiềm năng hơn khi khử quá trình phosphoryl hóa STAT5 ở Tregs tiếp theo là PD1-IL2v. FAP-IL2v có hoạt tính thấp nhất đối với Tregs.

Fig. 32 thể hiện quá trình phosphoryl hóa STAT5 trong tế bào T CD8 (A), tế bào NK (B), tế bào T CD4 (C) và tế bào T điều hòa (D) khi điều trị PBMC nghỉ của thể cho 4 bằng FAP-IL2v, PD1-IL2v, FAP-IL2wt, PD1-TIM3-IL2v. Tất cả bốn phân tử đã thử nghiệm đều có hoạt tính tương đương đối với tế bào T CD8, tế bào NK và tế bào T CD4 (ngoại trừ Tregs). FAP-IL2wt có tiềm năng hơn khi khử quá trình phosphoryl hóa STAT5 ở Tregs tiếp theo là PD1-IL2v. FAP-IL2v có hoạt tính thấp nhất đối với Tregs.

Các khía cạnh khác nữa theo sáng chế

1. Thể liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19).

2. Thở liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và

trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và FR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 ở các vị trí 71-73 theo hệ đánh số Kabat, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

3. Thở liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và

trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, HVR-H2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, và HVR-H3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, HVR-L2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12, và HVR-L3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13.

4. Thở liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 của người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G (đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19); và

trong đó kháng thể bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO:18.

5. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 4, trong đó IL-2 polypeptit đột biến còn bao gồm sự thay thế axit amin T3A và/hoặc sự thay thế axit amin C125A.

6. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 5, trong đó IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20.

7. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 6, trong đó thể liên hợp miễn dịch chứa không nhiều hơn một IL-2 polypeptit đột biến.

8. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 7, trong đó kháng thể chứa miền Fc gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai.

9. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh 8, trong đó miền Fc là lớp IgG, cụ thể là phân lớp IgG₁, miền Fc.

10. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh 8 hoặc 9, trong đó miền Fc là miền Fc của người.

11. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 10, trong đó kháng thể là lớp IgG, cụ thể là globulin miễn dịch của phân lớp IgG₁.

12. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 8 đến 11, trong đó miền Fc bao gồm sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc.

13. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 8 đến 12, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc

axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất mà có thể định vị trong một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai trong phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất có thể định vị.

14. Thẻ liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 8 đến 13, trong đó trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V) và tùy ý gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

15. Thẻ liên hợp miễn dịch theo khía cạnh 14, trong đó trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C) hoặc gốc axit glutamic ở vị trí 356 được thay thế bằng gốc xystein (E356C), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

16. Thẻ liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 8 đến 15, trong đó IL-2 polypeptit đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó vào axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc, cụ thể là cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, tùy ý thông qua peptit cầu nối.

17. Thẻ liên hợp miễn dịch theo khía cạnh 16, trong đó peptit cầu nối có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

18. Thẻ liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 8 đến 16, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin làm giảm gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là thụ thể Fcγ, và/hoặc chức năng tác động, cụ thể là tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC).

19. Thở liên hợp miễn dịch theo khía cạnh 18, trong đó một hoặc nhiều thay thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm L234, L235, và P329 (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

20. Thở liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 8 đến 19, trong đó mỗi cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc bao gồm các thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

21. Thở liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 20, bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24, và polypeptit chứa trình tự axit amin có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:25.

22. Thở liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 21, về cơ bản được cấu thành bởi IL-2 polypeptit đột biến và phân tử globulin miễn dịch IgG₁, được nối bởi trình tự cầu nối.

23. Một hoặc nhiều polynucleotit phân lập mã hóa thở liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22.

24. Một hoặc nhiều véc-tơ, cụ thể là véc-tơ biểu hiện, bao gồm (các) polynucleotit theo khía cạnh 23.

25. Tế bào vật chủ bao gồm (các) polynucleotit theo khía cạnh 23 hoặc (các) véc-tơ theo khía cạnh 24.

26. Phương pháp tạo ra các thở liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, bao gồm (a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo khía cạnh 25 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện thở liên hợp miễn dịch, và tùy ý (b) thu hồi thở liên hợp miễn dịch này.

27. Thở liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, được tạo ra bằng phương pháp theo khía cạnh 26.

28. Dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22 hoặc 27 và chất mang dược dụng.

29. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22 hoặc 27 để dùng làm thuốc.

30. Thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22 hoặc 27 dùng để điều trị bệnh.

31. Thể liên hợp miễn dịch để dùng trong điều trị bệnh theo khía cạnh 30, trong đó bệnh này là bệnh ung thư.

32. Sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22 hoặc 27 để bào chế thuốc điều trị bệnh.

33. Sử dụng theo khía cạnh 32, trong đó bệnh này là bệnh ung thư.

34. Phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22 hoặc 27 ở dạng dược dụng.

35. Phương pháp theo khía cạnh 34, trong đó bệnh này là bệnh ung thư.

36. Phương pháp kích thích hệ miễn dịch của cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22 hoặc 27 ở dạng dược dụng.

37. Sáng chế như được mô tả trên đây.

Mặc dù sáng chế nêu trên được mô tả một cách chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích rõ ràng, cần hiểu rằng phần mô tả và phần Ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn phạm vi của sáng chế. Phần bộc lộ của tất cả nội dung các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn trong bản mô tả được đưa một cách rõ ràng vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thẻ liên hợp miễn dịch chứa (i) kháng thể gắn kết với PD-1 và (ii) IL-2 polypeptit đột biến,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là IL-2 polypeptit ở người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19.

2. Thẻ liên hợp miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-2 polypeptit là IL-2 polypeptit đột biến,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 ở người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G, đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19; và

trong đó kháng thể này bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1, HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và FR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 ở các vị trí 71-73 theo đánh số Kabat, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

3. Thẻ liên hợp miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-2 polypeptit là IL-2 polypeptit đột biến,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 ở người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G, đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO: 19; và

trong đó kháng thể này bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9, và HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11, HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12, và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13.

4. Thẻ liên hợp miễn dịch theo điểm 1, trong đó IL-2 polypeptit là IL-2 polypeptit đột biến,

trong đó IL-2 polypeptit đột biến là phân tử IL-2 ở người bao gồm các thay thế axit amin F42A, Y45A và L72G, đánh số theo trình tự IL-2 của người SEQ ID NO:19; và

trong đó kháng thể này bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin mà có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin mà có mức đồng nhất ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, và SEQ ID NO: 18.

5. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó IL-2 polypeptit đột biến còn bao gồm sự thay thế axit amin T3A và/hoặc sự thay thế axit amin C125A.
6. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó IL-2 polypeptit đột biến chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20.
7. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó thể liên hợp miễn dịch này chứa không nhiều hơn một IL-2 polypeptit đột biến.
8. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này chứa miền Fc bao gồm cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai.
9. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 8, trong đó miền Fc là lớp IgG, cụ thể là phân lớp IgG1, miền Fc.
10. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 8 hoặc 9, trong đó miền Fc là miền Fc của người.
11. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể này là lớp IgG, cụ thể là globulin miễn dịch của phân lớp IgG₁.
12. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó miền Fc bao gồm sự cải biến thúc đẩy việc kết hợp của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất và cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc.
13. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 12, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần nhô ra bên trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất mà có thể được định vị trong một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit

amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra một khoang trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ hai trong phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất có thể được định vị.

14. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 13, trong đó trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V) và tùy ý gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A), đánh số theo chỉ số Kabat EU.

15. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 14, trong đó trong cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C) hoặc gốc axit glutamic ở vị trí 356 được thay thế bằng gốc xystein (E356C), và trong cấu trúc dưới đơn vị thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C), đánh số theo chỉ số Kabat EU.

16. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 15, trong đó IL-2 polypeptit đột biến được dung hợp ở axit amin đầu tận cùng amino của nó vào axit amin đầu tận cùng carboxy của một trong số các cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc, cụ thể là cấu trúc dưới đơn vị thứ nhất của miền Fc, tùy ý thông qua peptit cầu nối.

17. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 16, trong đó peptit cầu nối có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

18. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 16, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin làm giảm gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là thụ thể Fc γ , và/hoặc chức năng tác động, cụ thể là tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC).

19. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 18, trong đó một hoặc nhiều thay thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm bao gồm L234, L235, và P329, đánh số theo chỉ số Kabat EU.

20. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 19, trong đó mỗi cấu trúc dưới đơn vị của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin L234A, L235A và P329G, đánh số theo chỉ số Kabat EU.

21. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20, trong đó thở liên hợp miễn dịch này chứa polypeptit chứa trình tự axit amin mà có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:22, polypeptit chứa trình tự axit amin mà có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:23 hoặc SEQ ID NO:24, và polypeptit chứa trình tự axit amin mà có mức đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:25.
22. Thở liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó thở liên hợp miễn dịch về cơ bản được cấu thành bởi IL-2 polypeptit đột biến và phân tử globulin miễn dịch IgG₁, được nối bởi trình tự cầu nối.
23. Polynucleotit được phân lập mã hóa thở liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22.
24. Véc-tơ, cụ thể là véc-tơ biểu hiện, chứa polynucleotit theo điểm 23.
25. Tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit theo điểm 23 hoặc véc-tơ theo điểm 24.
26. Phương pháp tạo ra thở liên hợp miễn dịch chứa IL-2 polypeptit đột biến và kháng thể gắn kết với PD-1, bao gồm các bước (a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 25 trong các điều thích hợp để biểu hiện thở liên hợp miễn dịch, và tùy ý (b) thu hồi thở liên hợp miễn dịch này.
27. Dược phẩm chứa thở liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Thẻ liên hợp miễn dịch của kháng thể kháng PD-1 chứa thẻ đột biến Interleukin-2 (IL-2) hoặc Interleukin-15 (IL-15), phương pháp tạo ra thẻ liên hợp miễn dịch và dược phẩm chứa chúng

<130> P34189

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Ser Ser Tyr Thr

1

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr

1

5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Gly Arg Val Tyr Phe

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 4

Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 5

Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 6

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1 5

<210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 7

Arg Asp Asn
 1

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 8

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Gly Gly Arg
1

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
1 5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 12
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Arg Ser Ser
1

<210> 13
<211> 6

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1 5

<210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<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 Thr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 20
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 22
<211> 597
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 465 470 475 480

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 485 490 495

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
 500 505 510

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 515 520 525

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 530 535 540

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 545 550 555 560

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 565 570 575

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 580 585 590

Ile Ser Thr Leu Thr
 595

<210> 23
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 24
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 25
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 26
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser
 20

<210> 27
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

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

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

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

Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 260 265

<210> 28
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

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

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285
 <210> 29
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 29
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 30
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro
 225

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 32
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 33

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 34

<211> 607

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 34

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Ile Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Asp Asn Met Gly Thr Thr Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 340 345 350

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser
 450 455 460

Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 465 470 475 480

Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu
 485 490 495

Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu
 500 505 510

Thr Ala Lys Phe Ala Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu
 515 520 525

Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Gly
 530 535 540

Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser
 545 550 555 560

Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe
 565 570 575

Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg
 580 585 590

Arg Trp Ile Ala Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 595 600 605

<210> 35
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 35

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

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 340 345 350

Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440

<210> 36
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

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

Glu Ser Val Ser Ile Thr Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
 50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
 85 90 95

Leu Glu Phe Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 115 120 125

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 145 150 155 160

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 180 185 190

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 37
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37

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 Asp Ser
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro
 450 455 460

Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 465 470 475 480

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
 485 490 495

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala
 500 505 510

Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 515 520 525

Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
 530 535 540

Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
 545 550 555 560

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
 565 570 575

Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser
 580 585 590

Thr Leu Thr
595

<210> 38
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

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 Asp Ser
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 39
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 40
 <211> 605
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

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 Asp Ser
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220

Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270

Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320

Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335

Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 340 345 350

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380

Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 420 425 430

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Ser
 450 455 460

Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 465 470 475 480

Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser
 485 490 495

Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Ala
 500 505 510

Lys Phe Ala Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys
 515 520 525

Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Gly Thr Gln
 530 535 540

Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile
 545 550 555 560

35760

Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys
565 570 575

Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp
580 585 590

Ile Ala Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
595 600 605

```
<210> 41
<211> 440
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 41

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 Asp Ser
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220

Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 260 265 270

Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 305 310 315 320

Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335

Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln
 340 345 350

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 385 390 395 400

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 420 425 430

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 435 440

<210> 42
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 42

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 43
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 44
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 44

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
 340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365
 Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 405 410 415
 Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
 420 425 430
 His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
 435 440 445
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
 450 455 460
 Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 465 470 475 480
 Gln Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu
 485 490 495
 Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met
 500 505 510
 Leu Thr Ala Lys Phe Ala Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp
 515 520 525
 Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp
 530 535 540
 Gly Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile
 545 550 555 560
 Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr
 565 570 575

Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu
 580 585 590

Arg Arg Trp Ile Ala Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 595 600 605

<210> 45
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 45

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
 340 345 350

Lys Lys Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365

Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 46

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 46

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 47
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 47

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser 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 Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
180 185 190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
210 215 220

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315 320

Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro
355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
370 375 380

Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
385 390 395 400

Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
465 470 475 480

Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg
485 490 495

Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Ala Lys
500 505 510

Phe Ala Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu
515 520 525

Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Gly Thr Gln Ser
530 535 540

Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg
 545 550 555 560

Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln
 565 570 575

Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile
 580 585 590

Ala Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 595 600

<210> 48
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 48

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser 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 Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
180 185 190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
210 215 220

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315 320

Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met
340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro
 355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
 370 375 380

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
 405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 49
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 49

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

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

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 50
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 50

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Ile Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Arg Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Asn Met Gly Thr Thr Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser
 180 185 190
 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile
 210 215 220
 Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 260 265 270
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 275 280 285

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
 290 295 300

Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
 355 360 365

Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
 370 375 380

Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
 405 410 415

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
 420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 51
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 51

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

Glu Ser Val Ser Ile Thr Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
 50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
 85 90 95

Leu Glu Phe Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 115 120 125

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

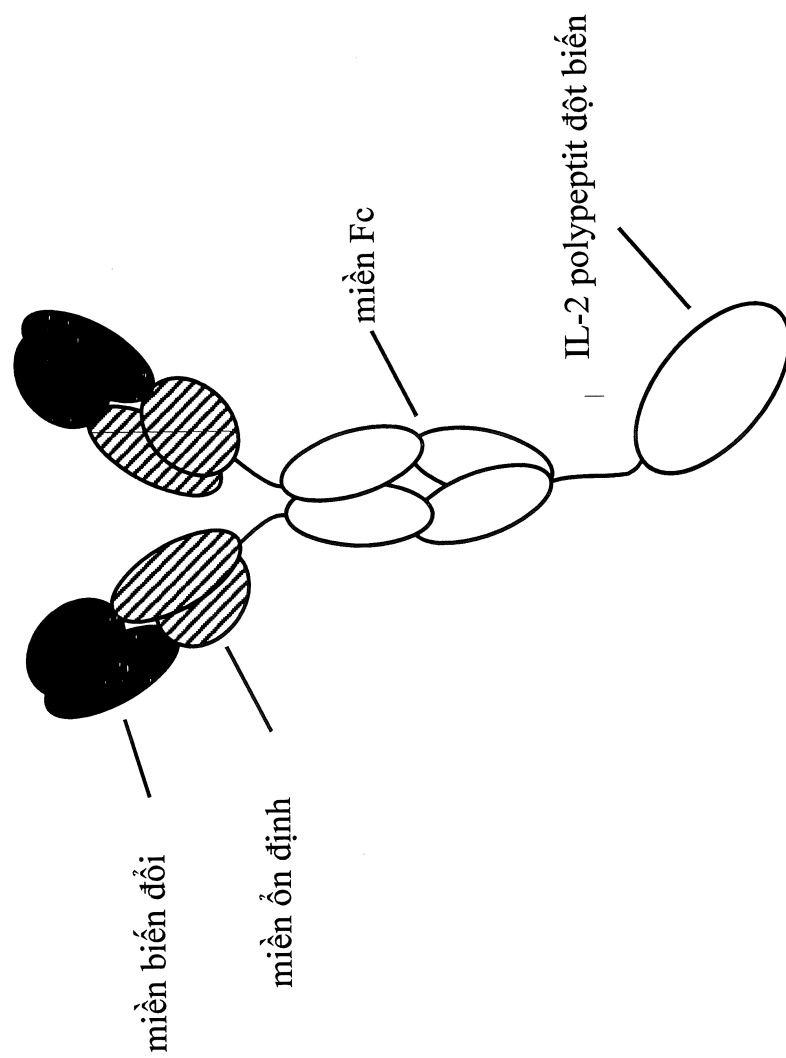
Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 145 150 155 160

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 180 185 190

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

**Fig.1**

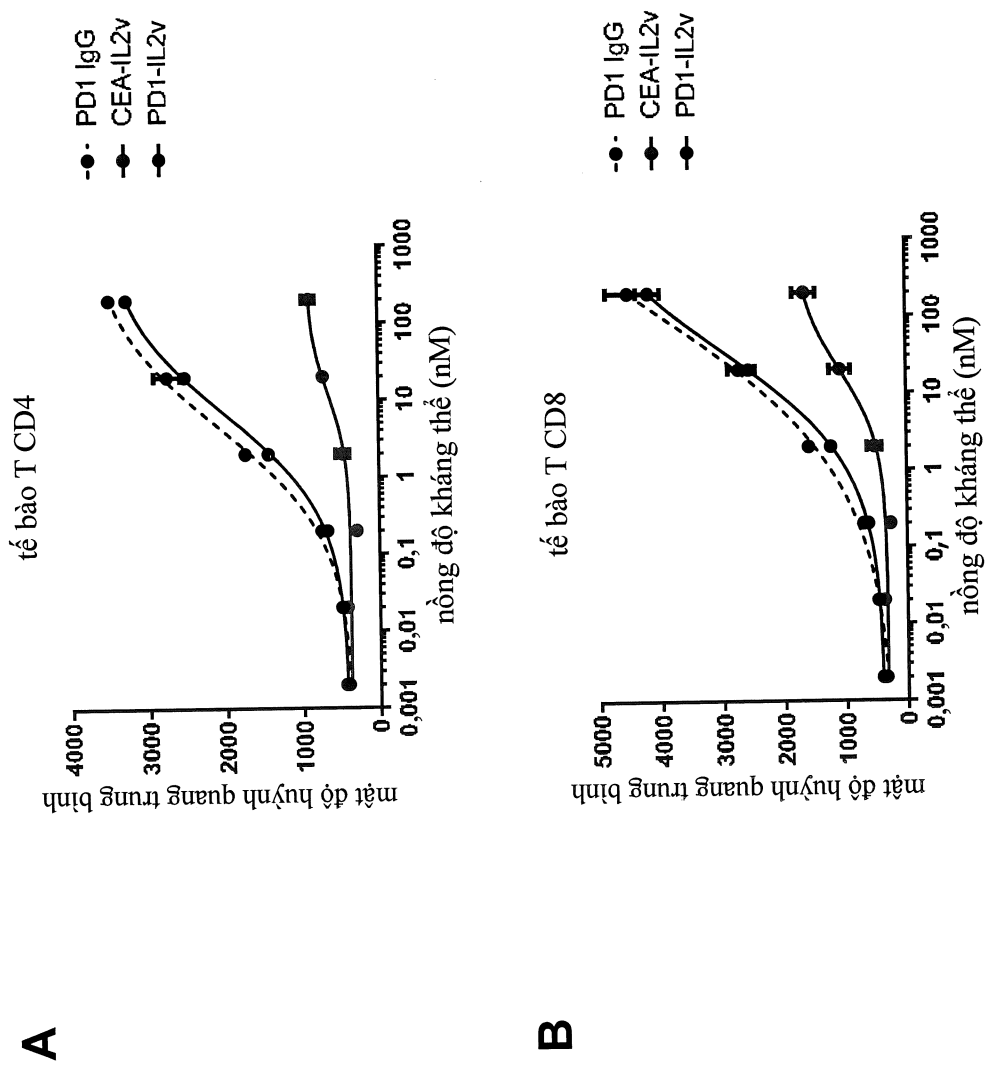


Fig.2

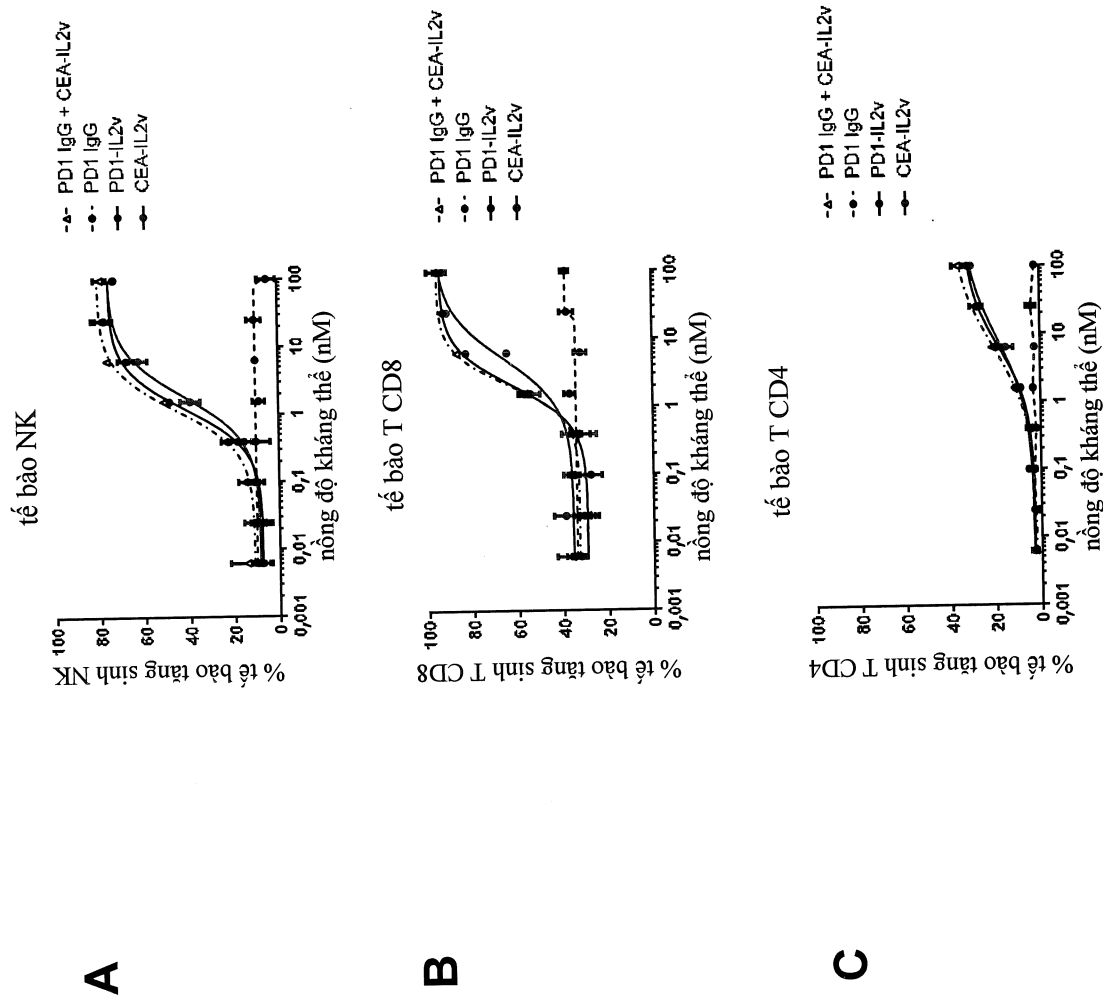


Fig.3

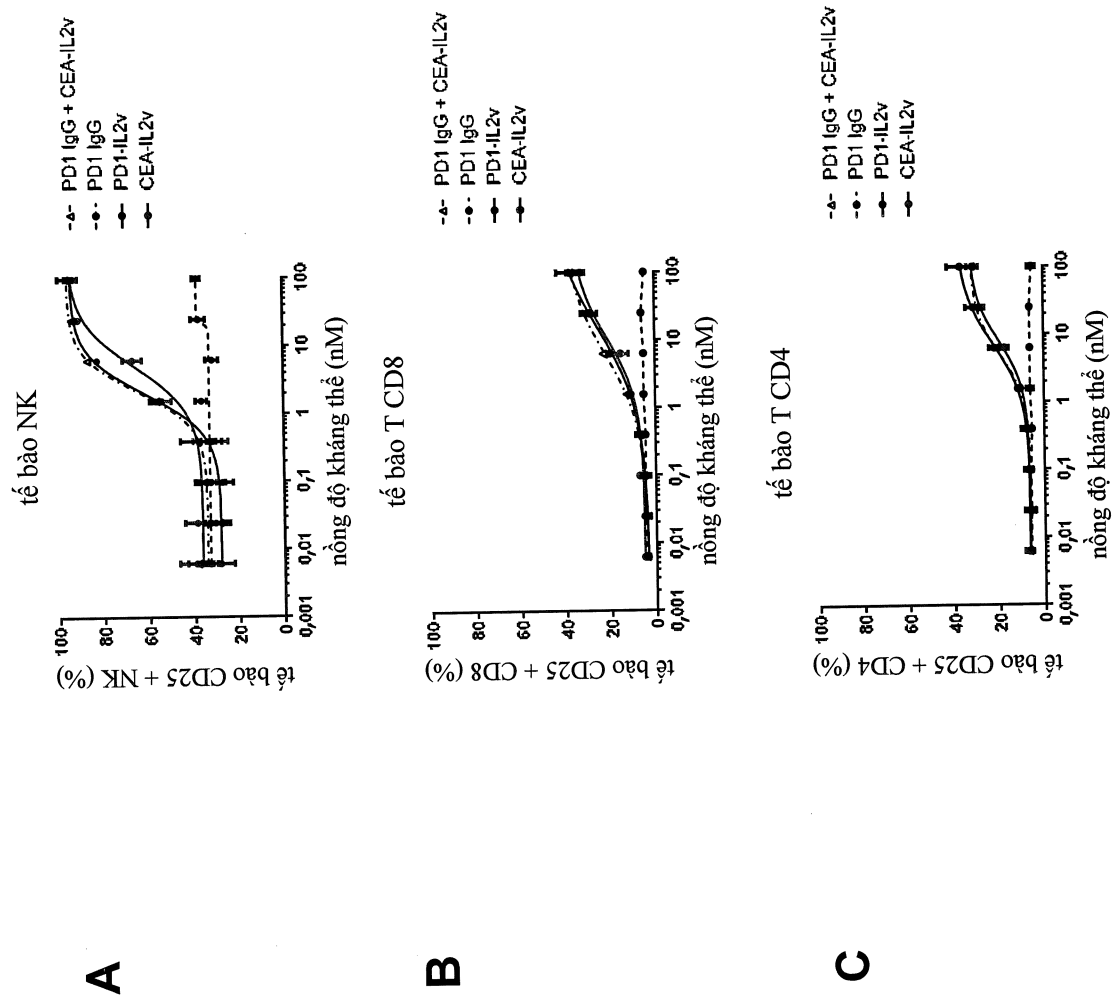


Fig.4

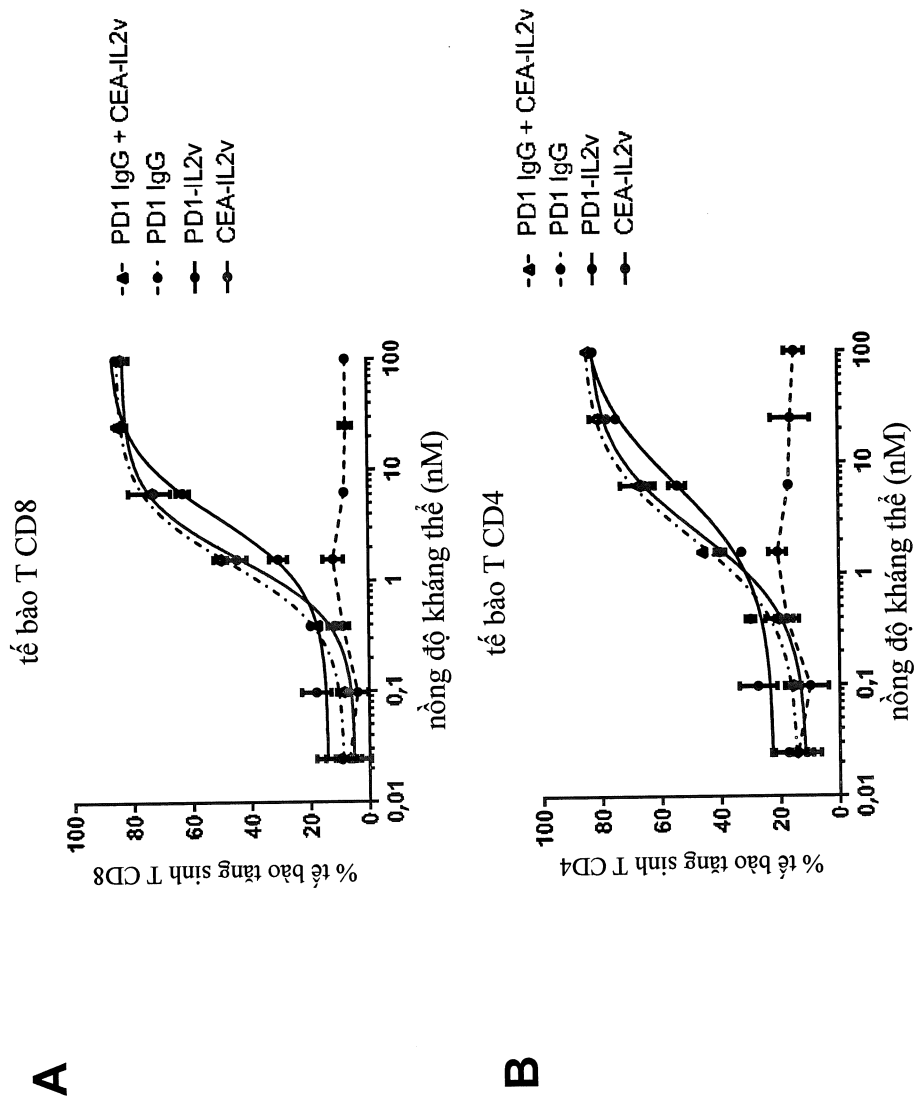


Fig.5

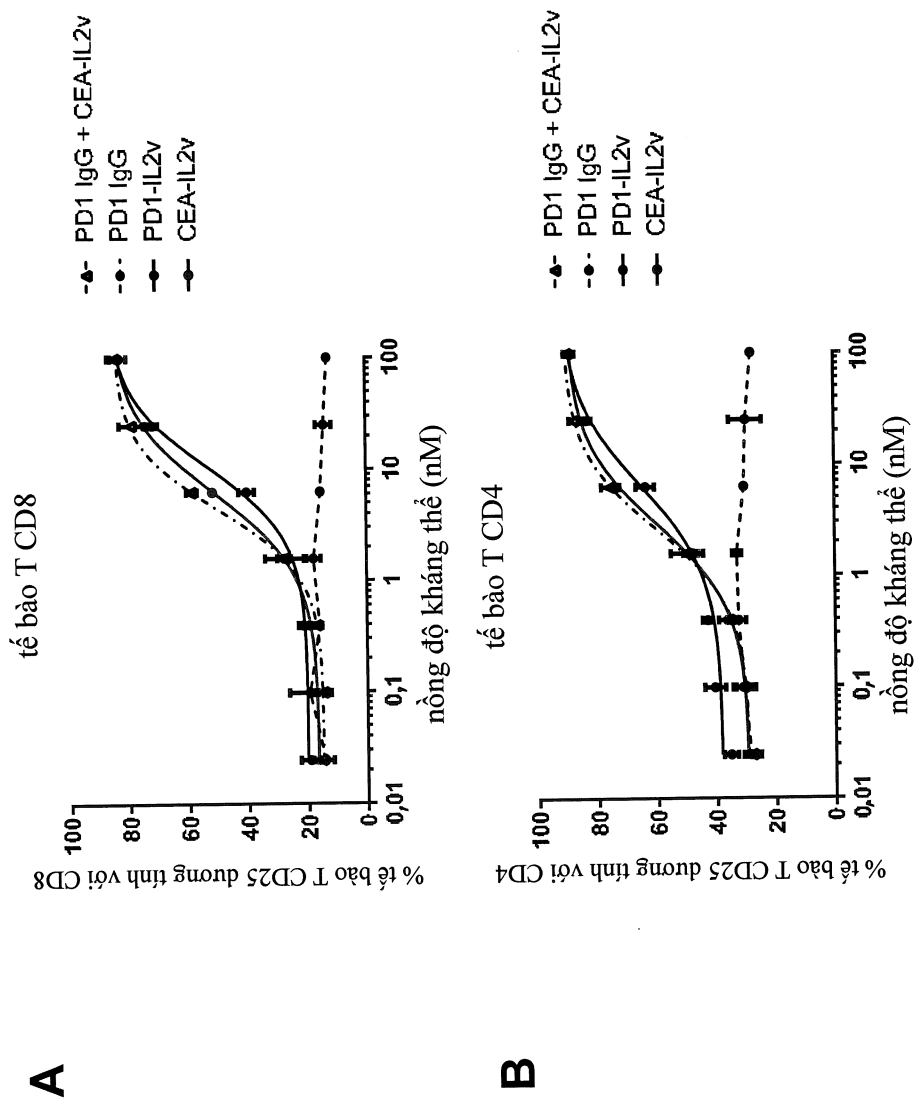


Fig.6

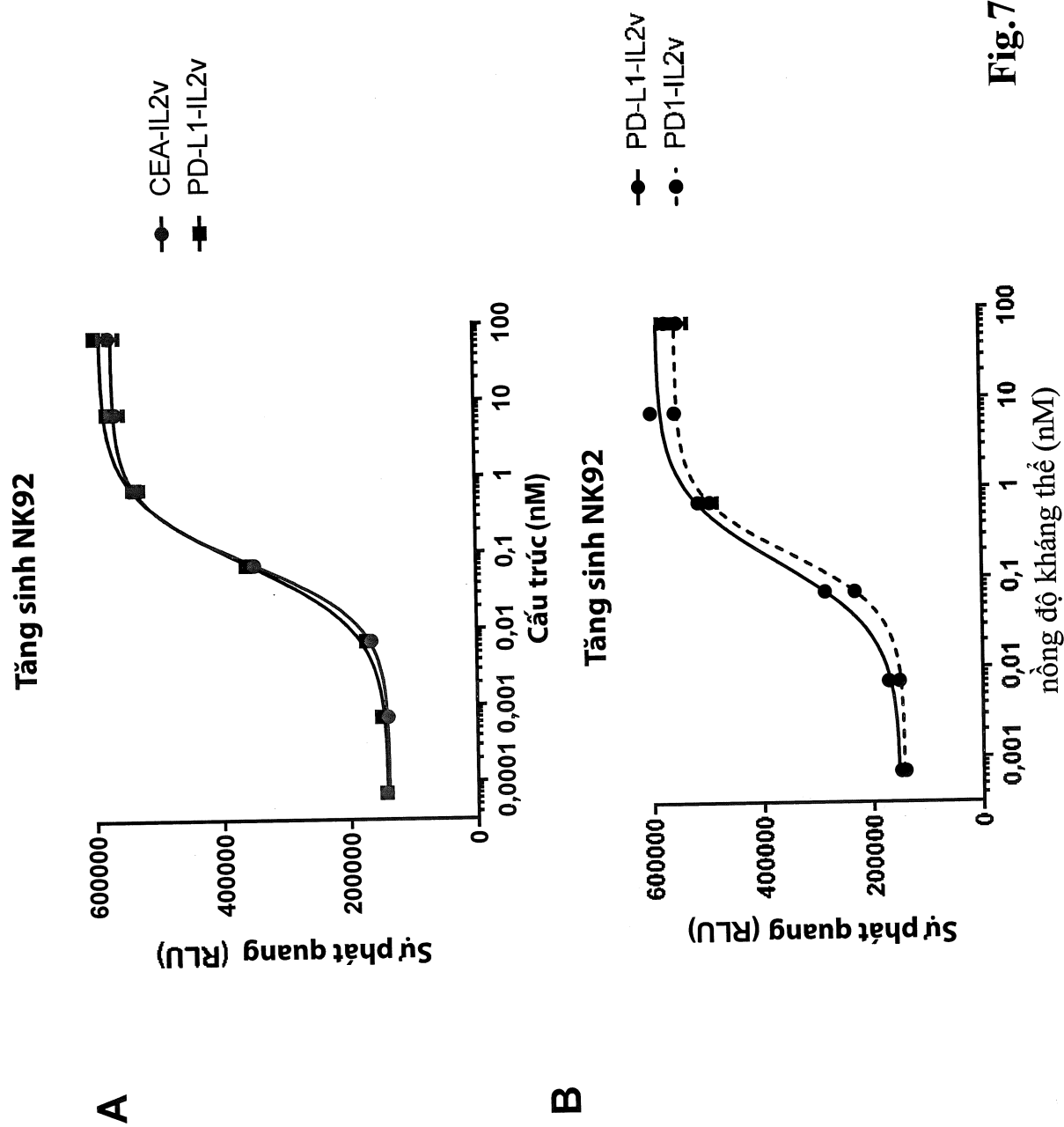


Fig.7

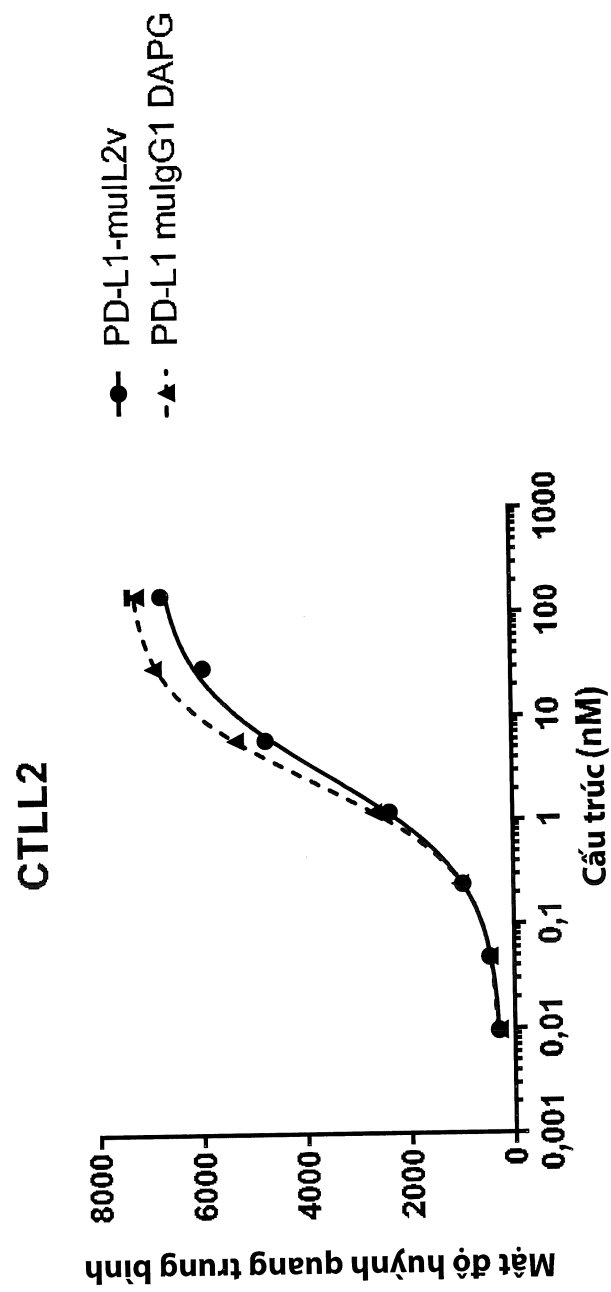


Fig.8

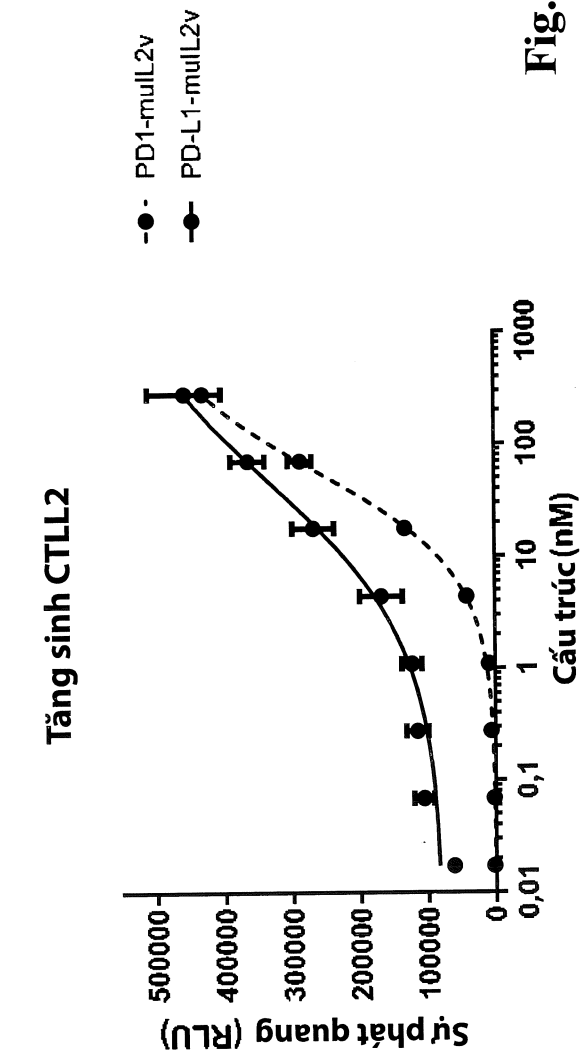
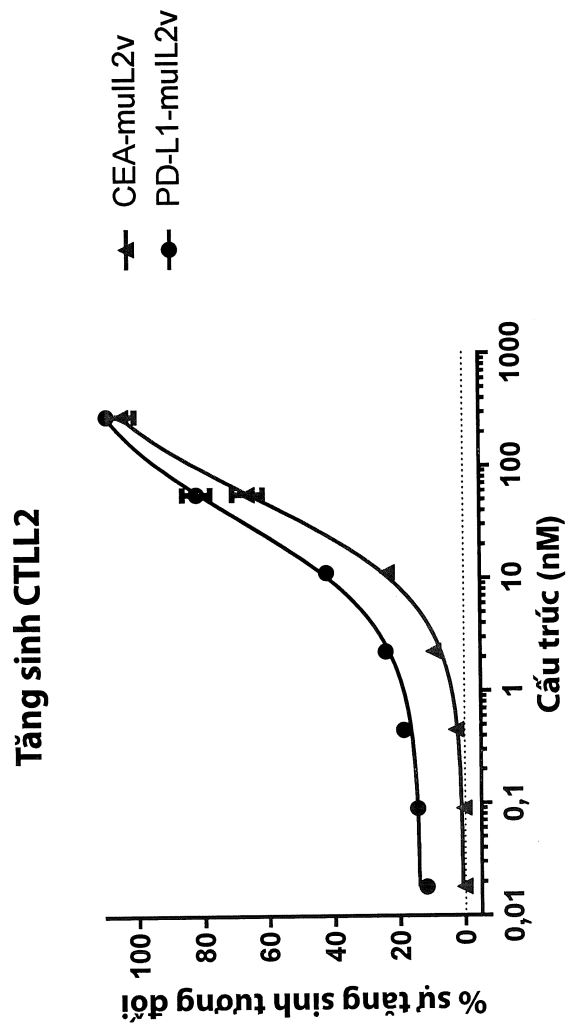


Fig.9

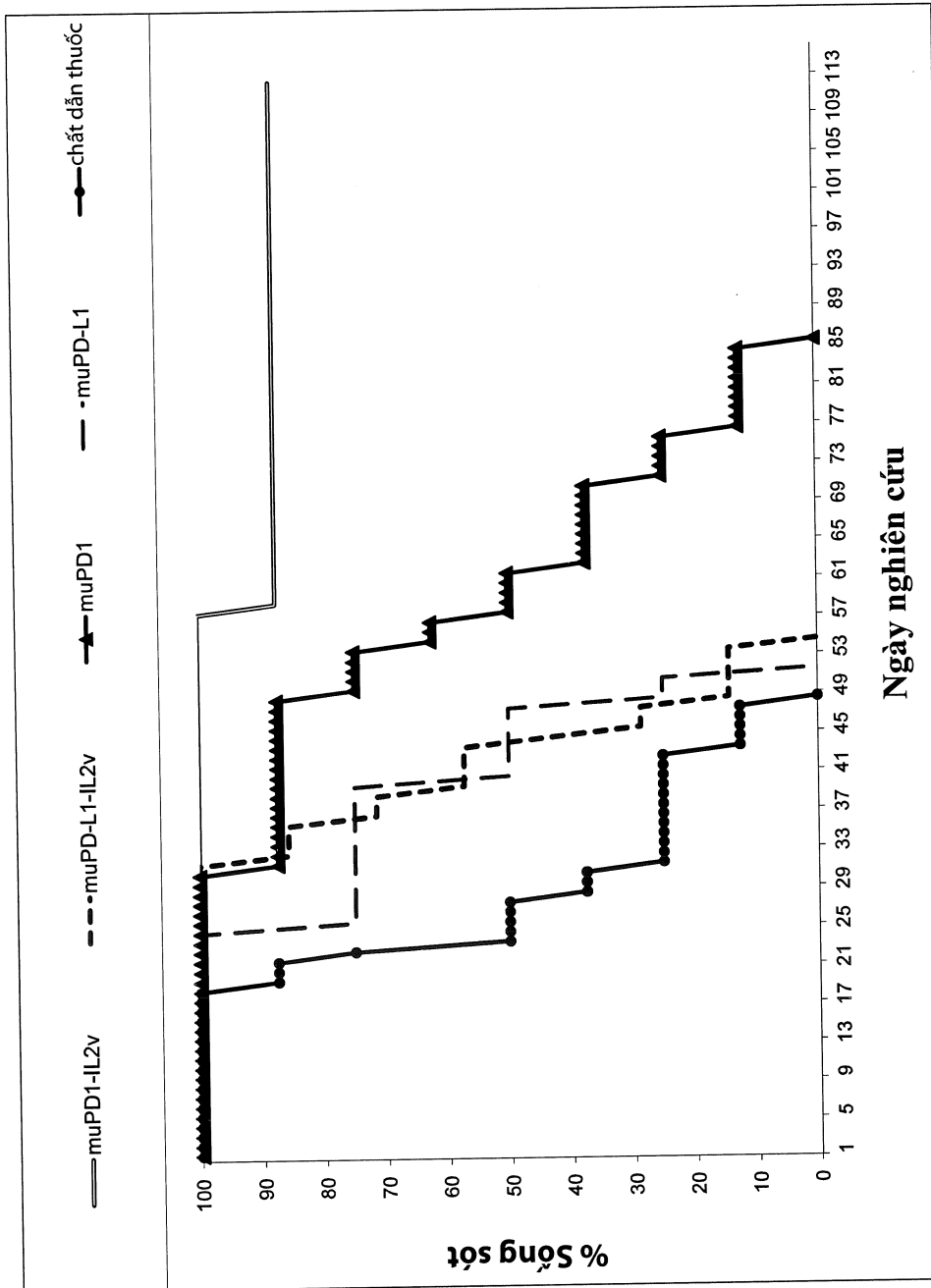


Fig.10

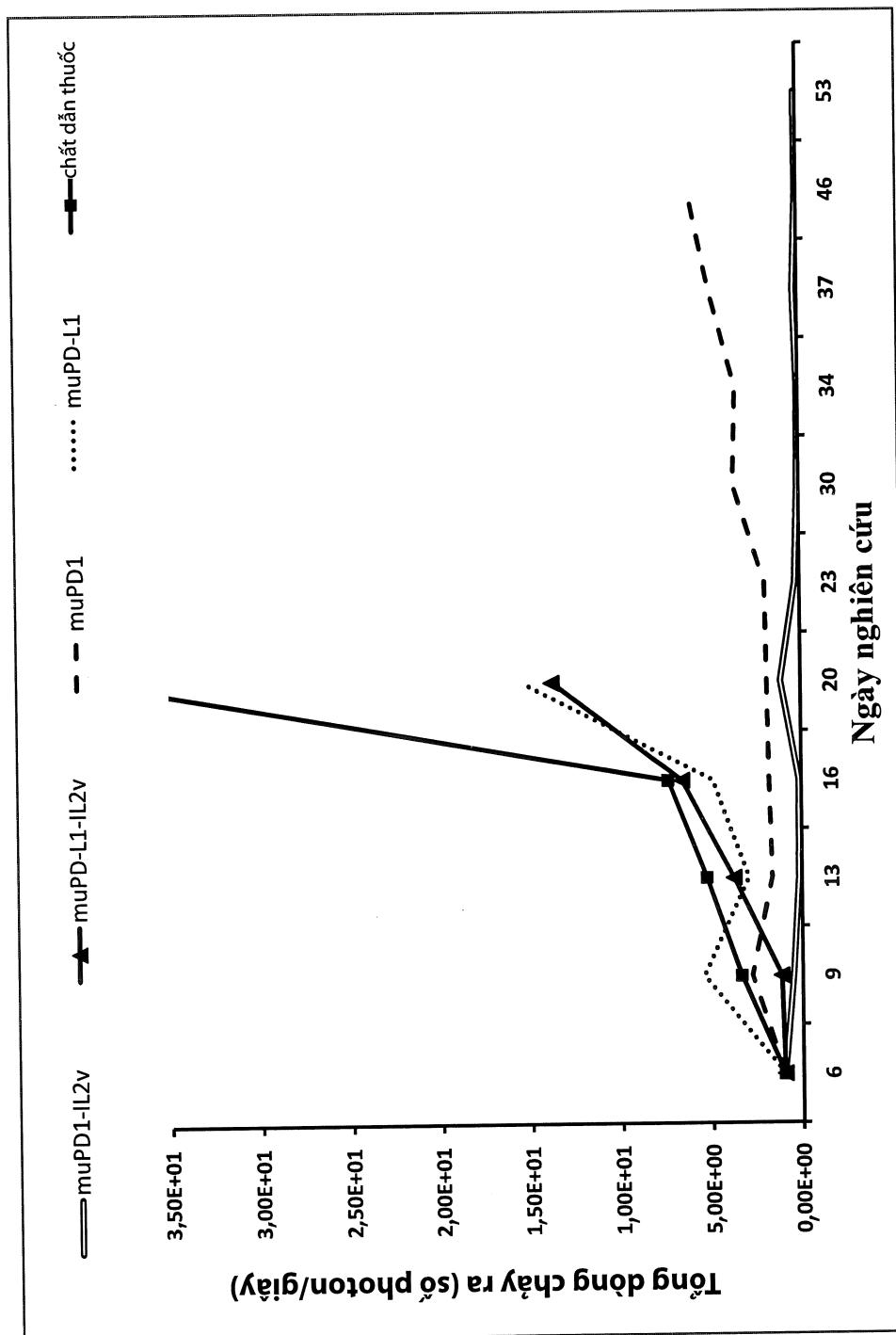


Fig.11

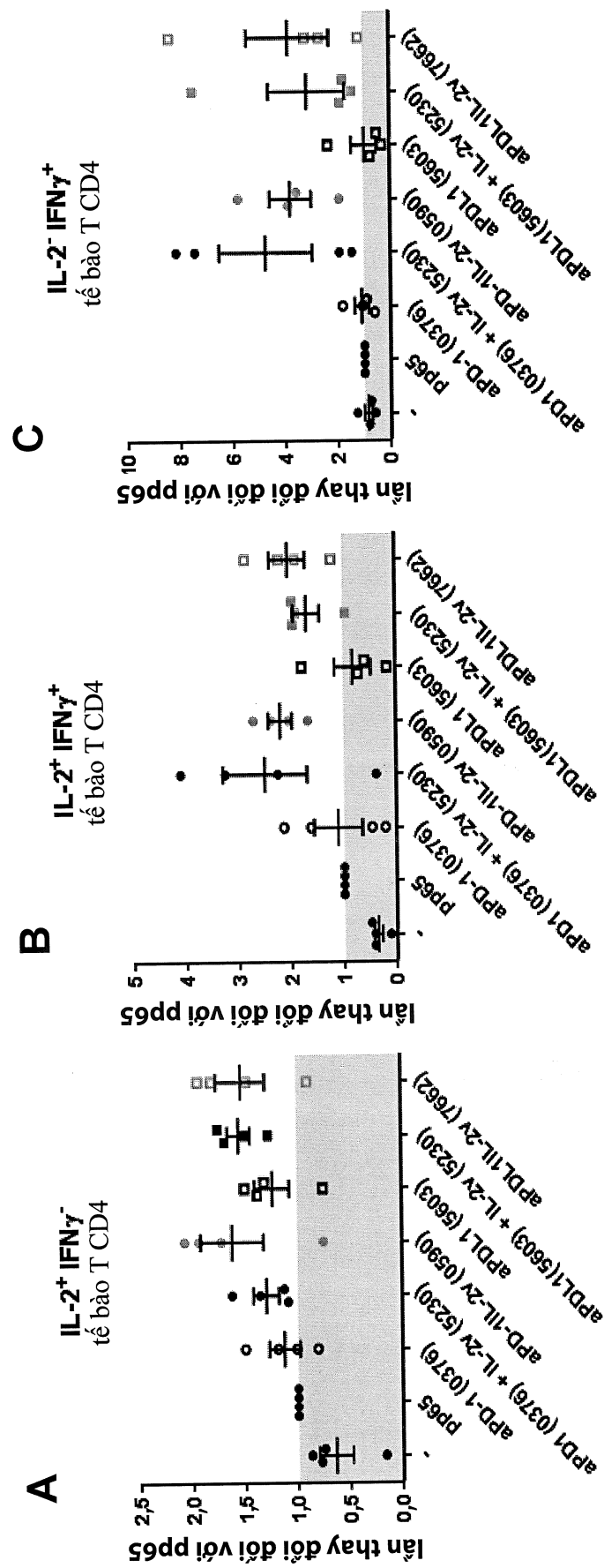


Fig.12

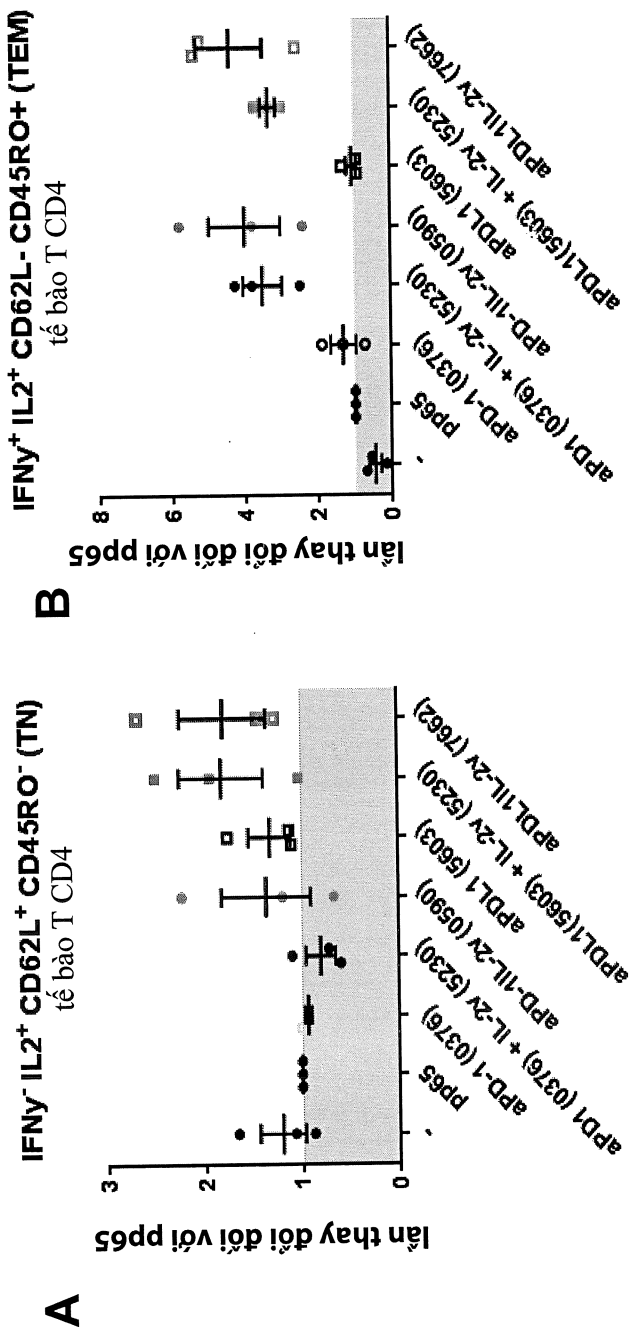


Fig.13

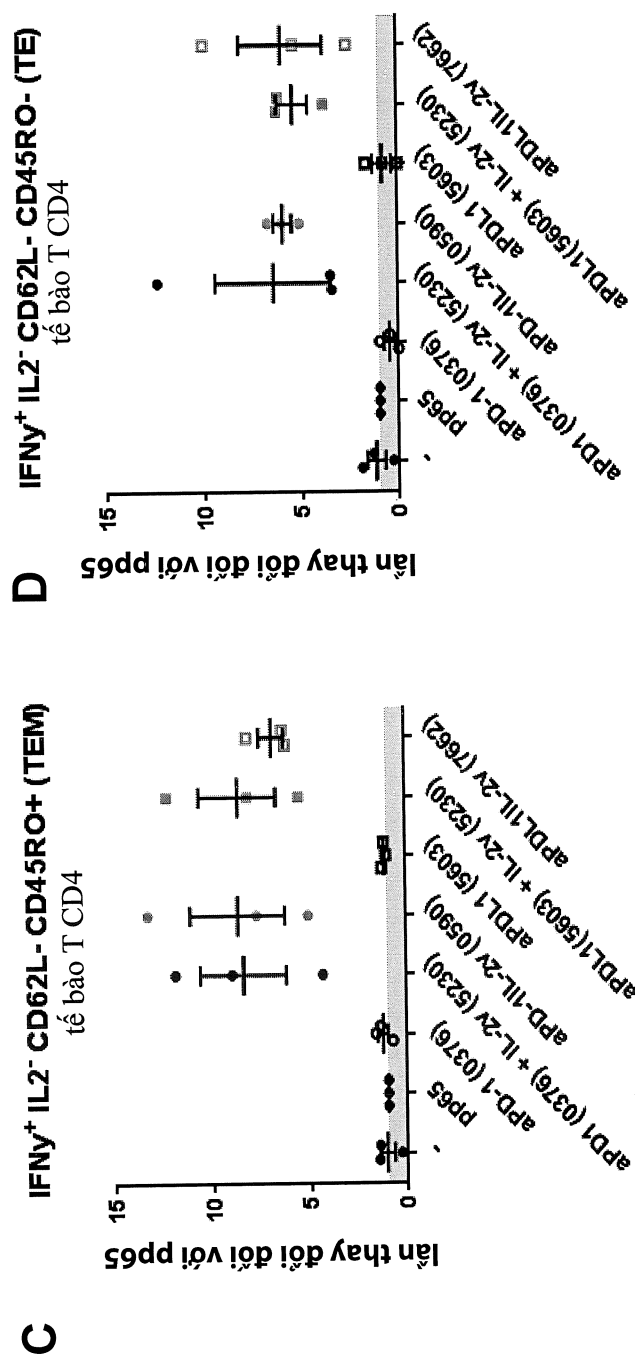


Fig.13

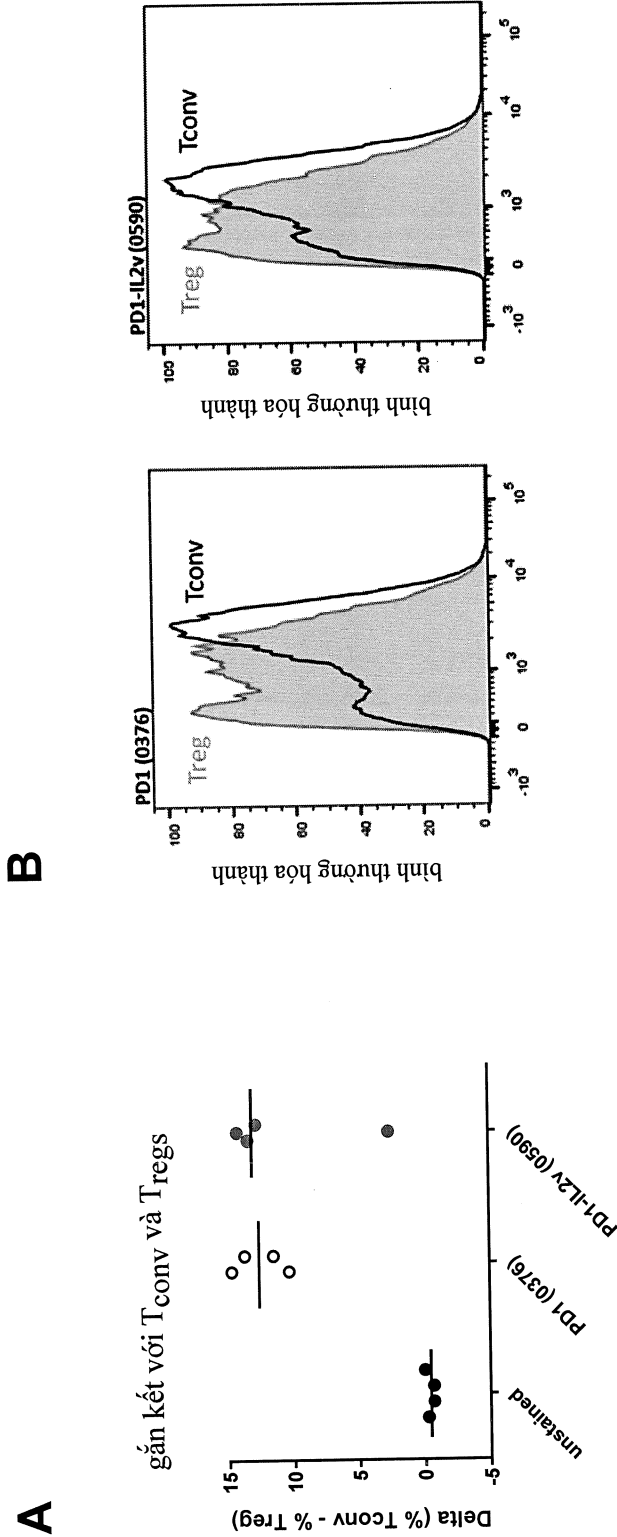


Fig.14

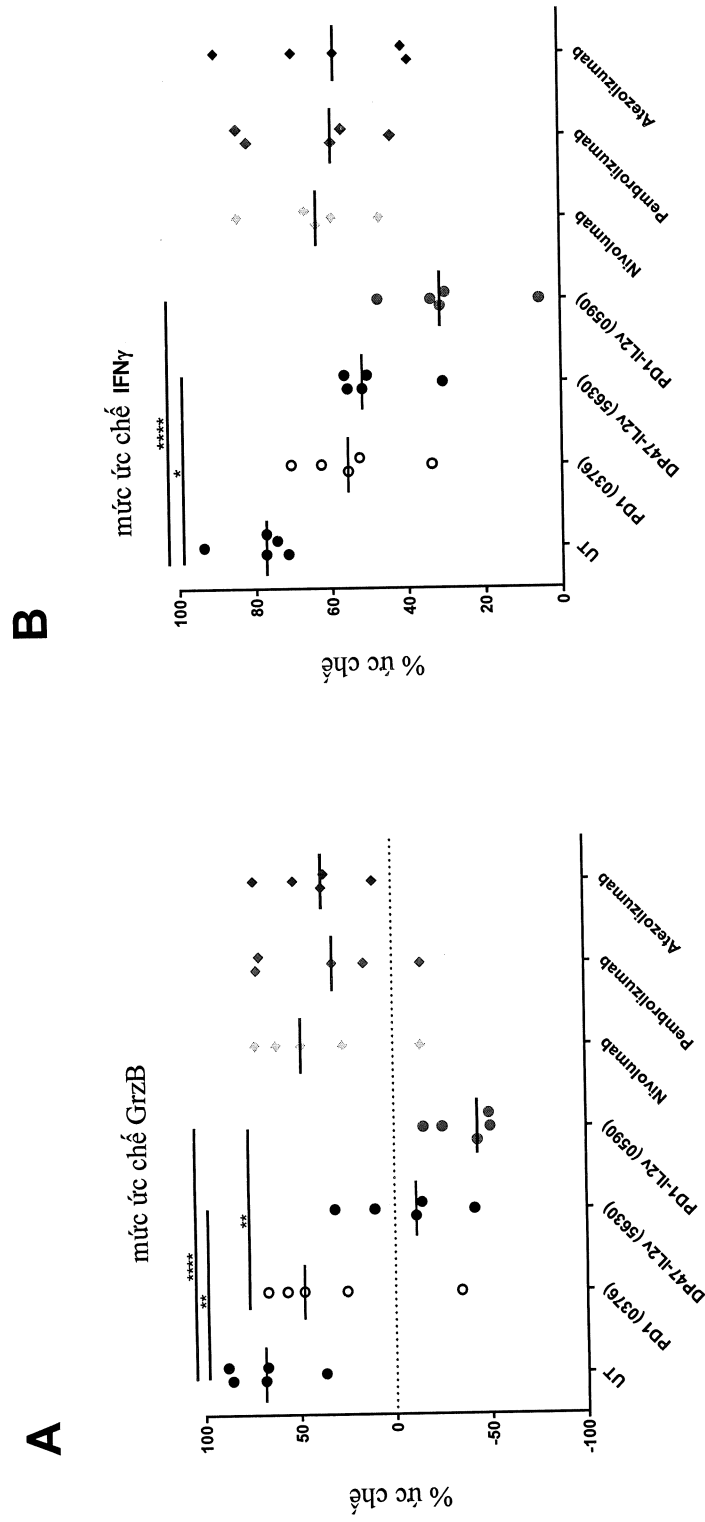


Fig.15

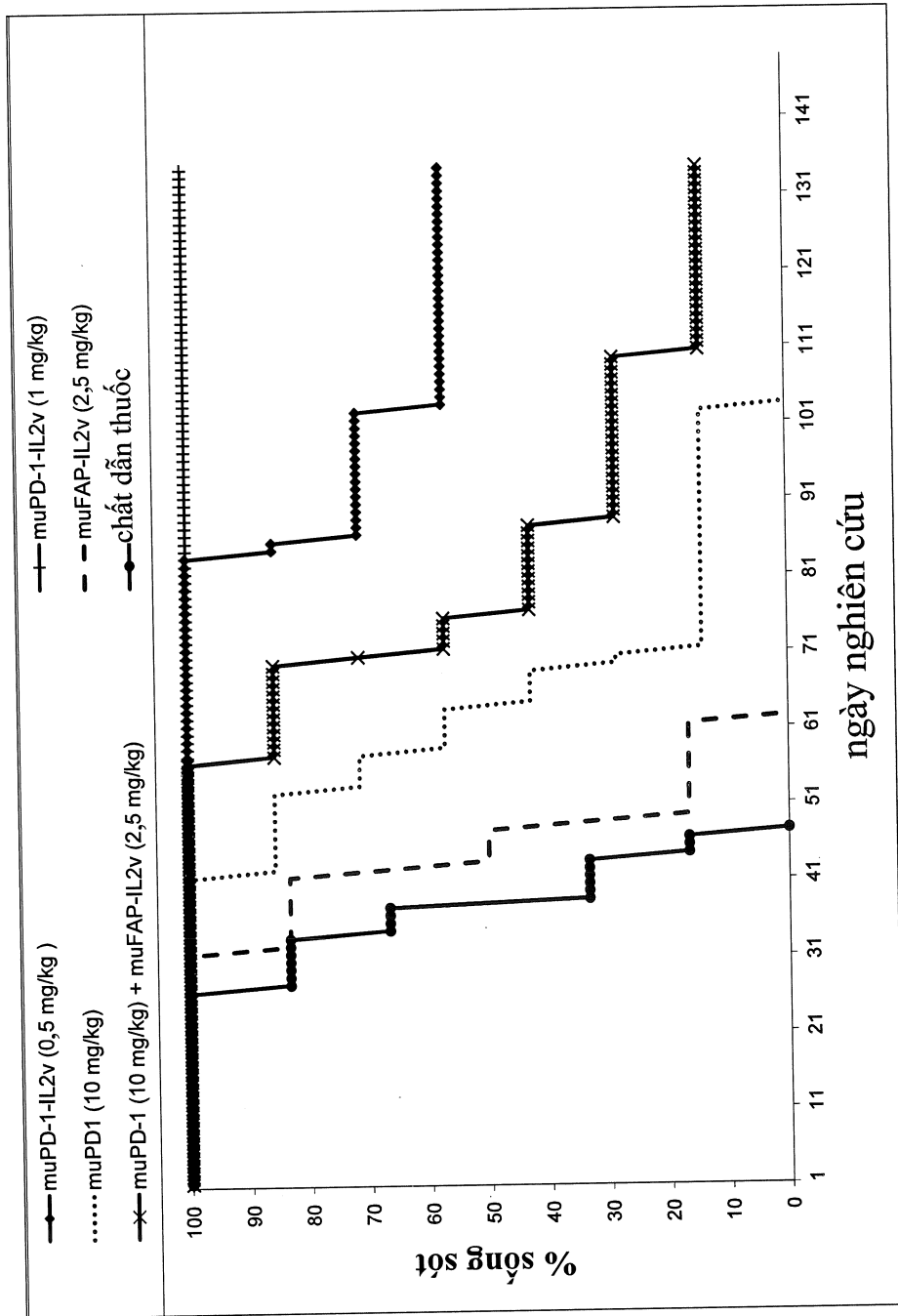


Fig.16

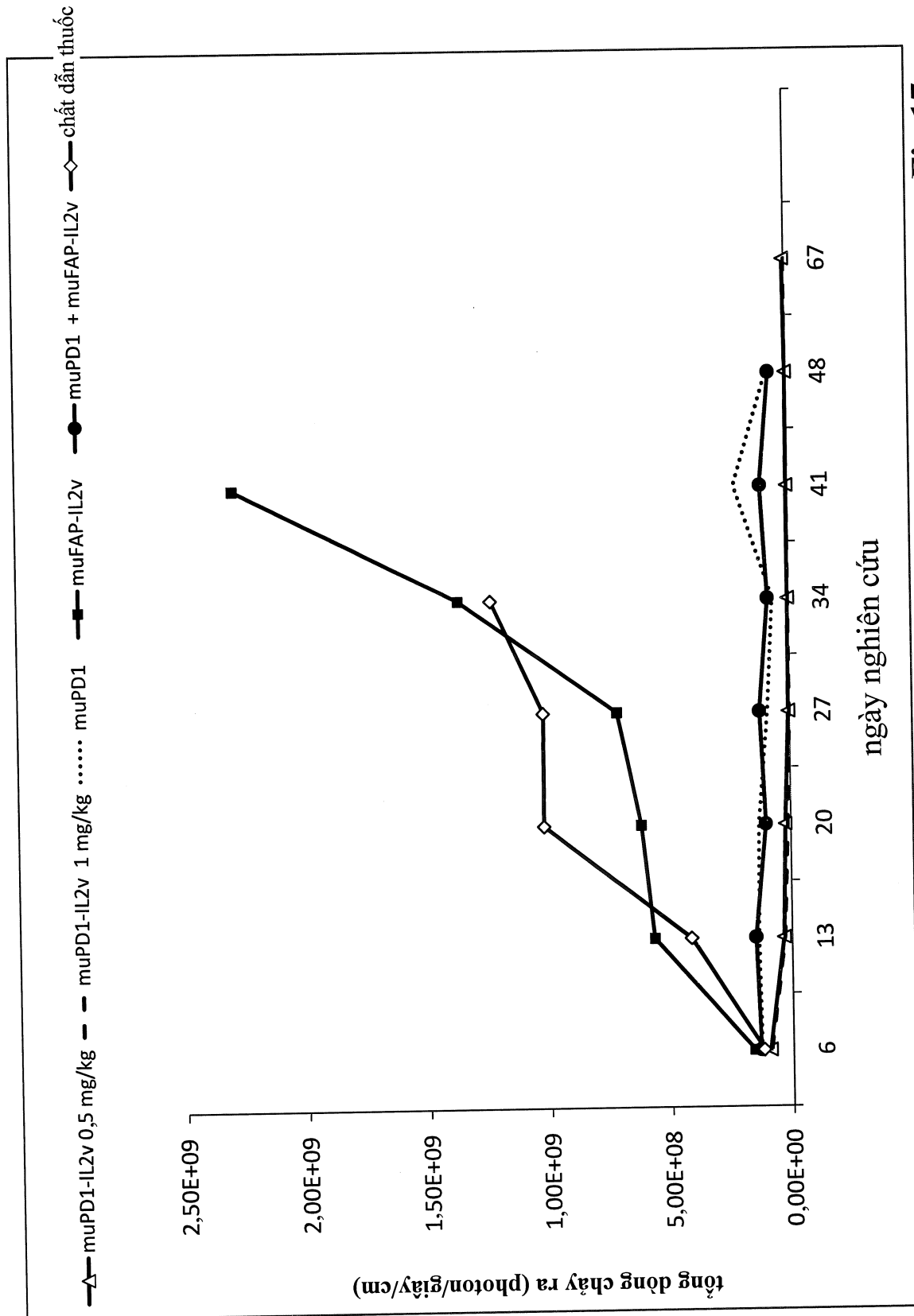


Fig.17

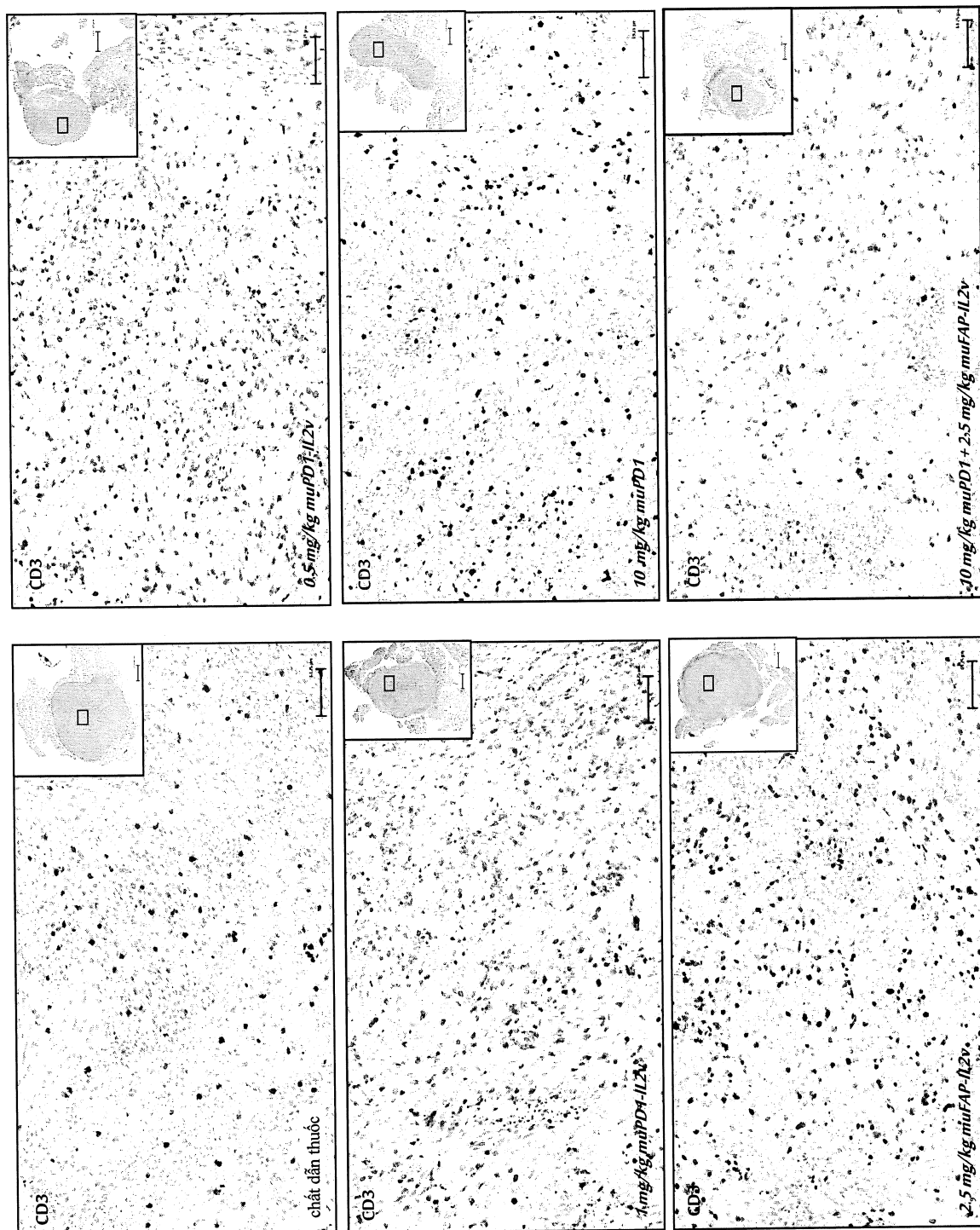
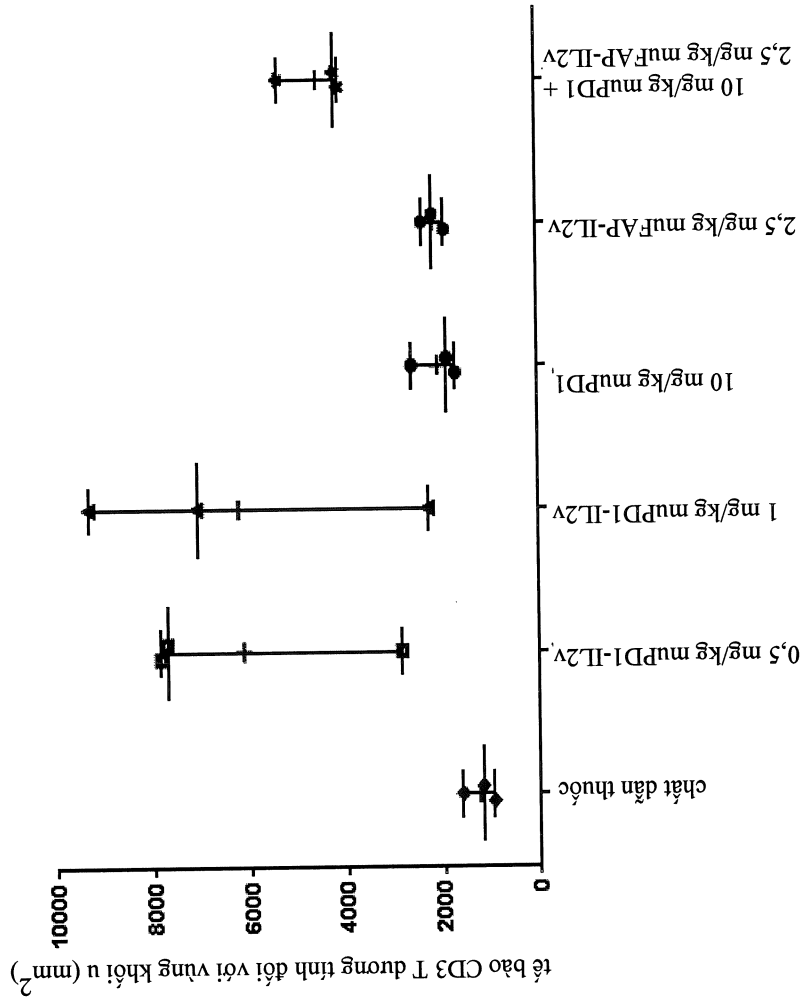


Fig.18A

Fig.18B



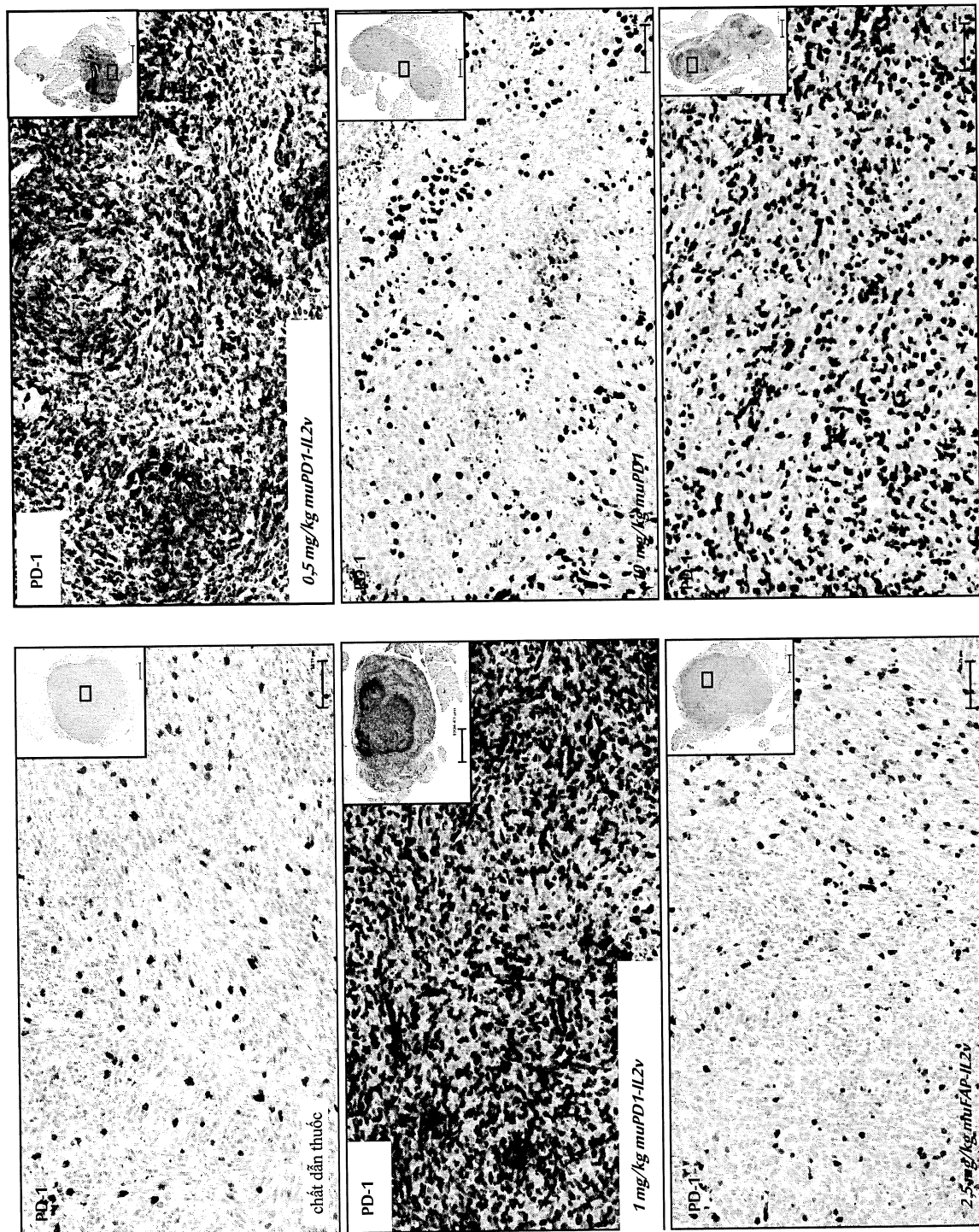


Fig.19

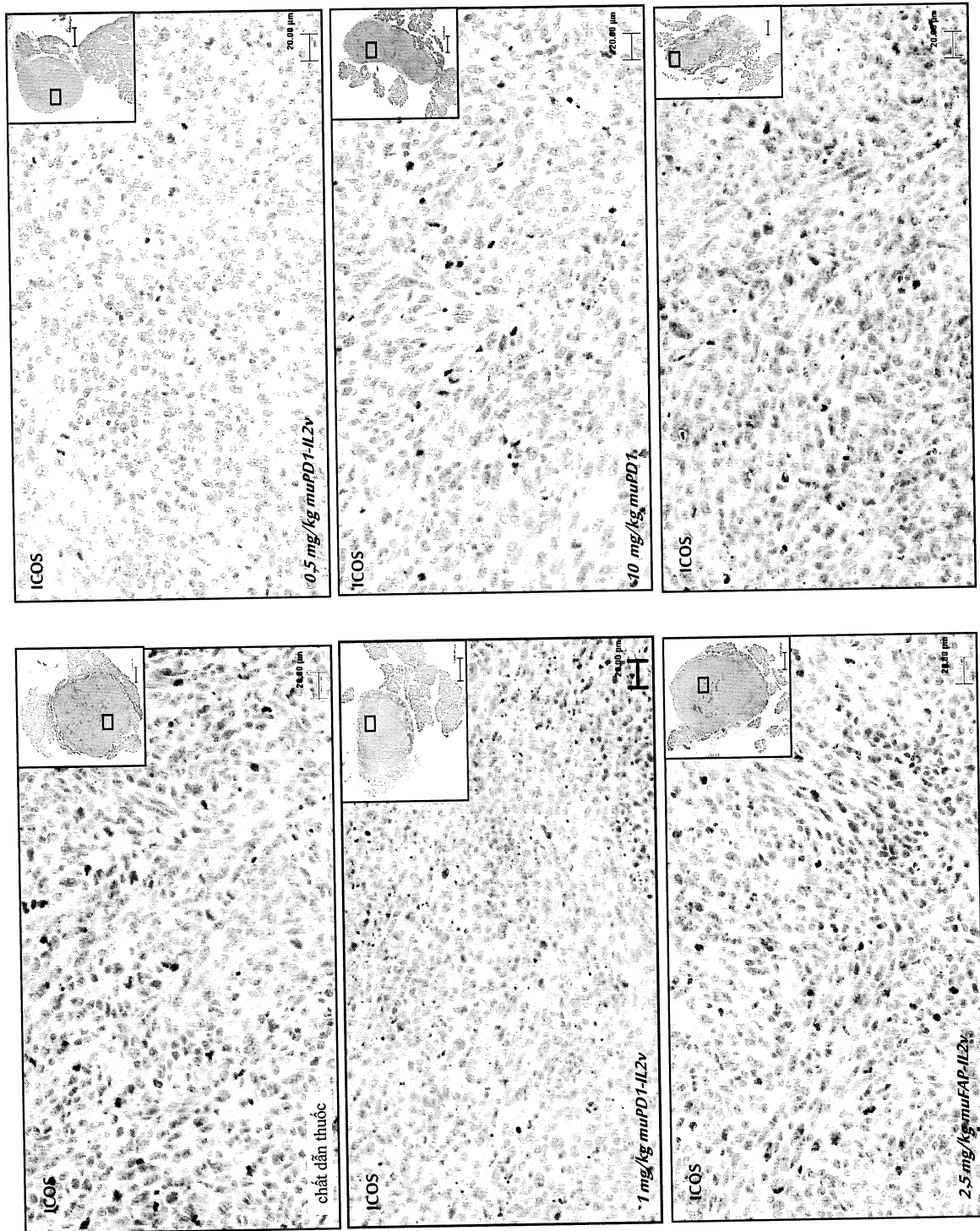


Fig.20

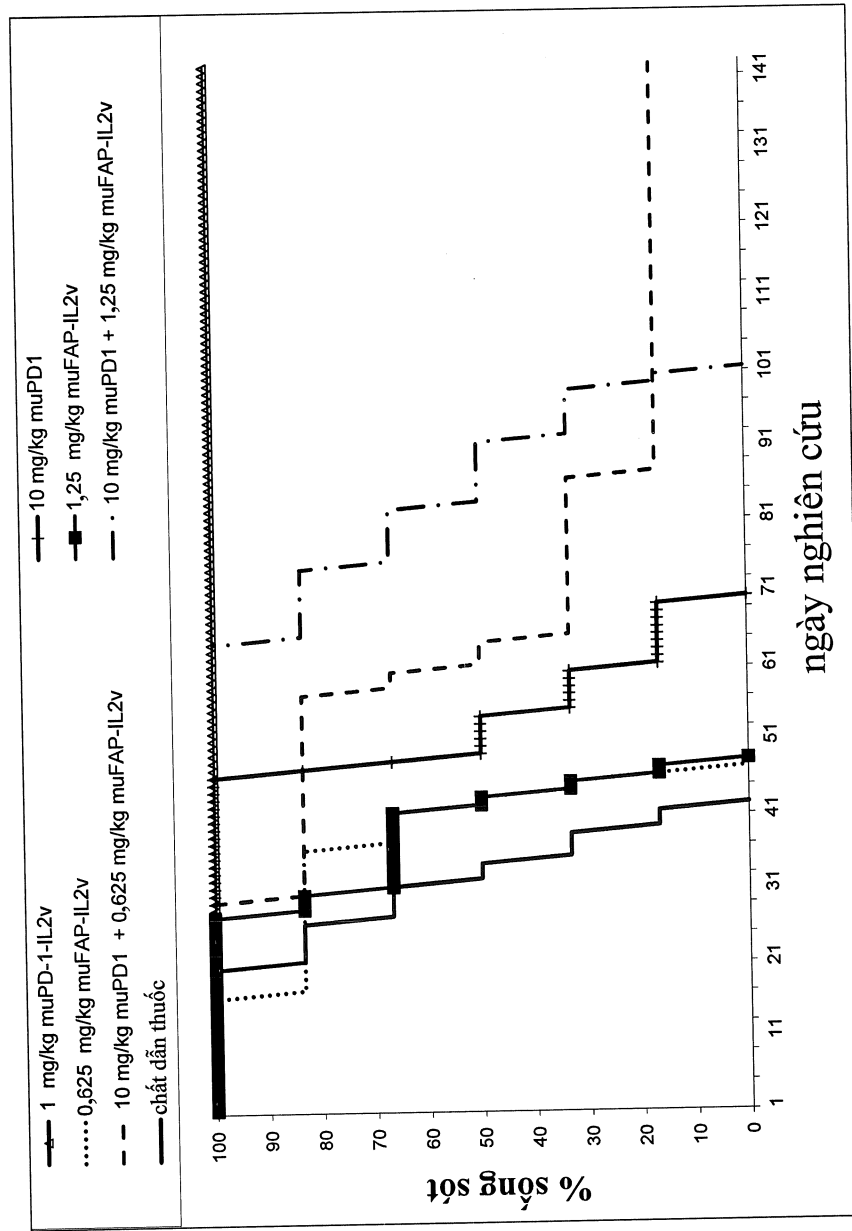


Fig.21

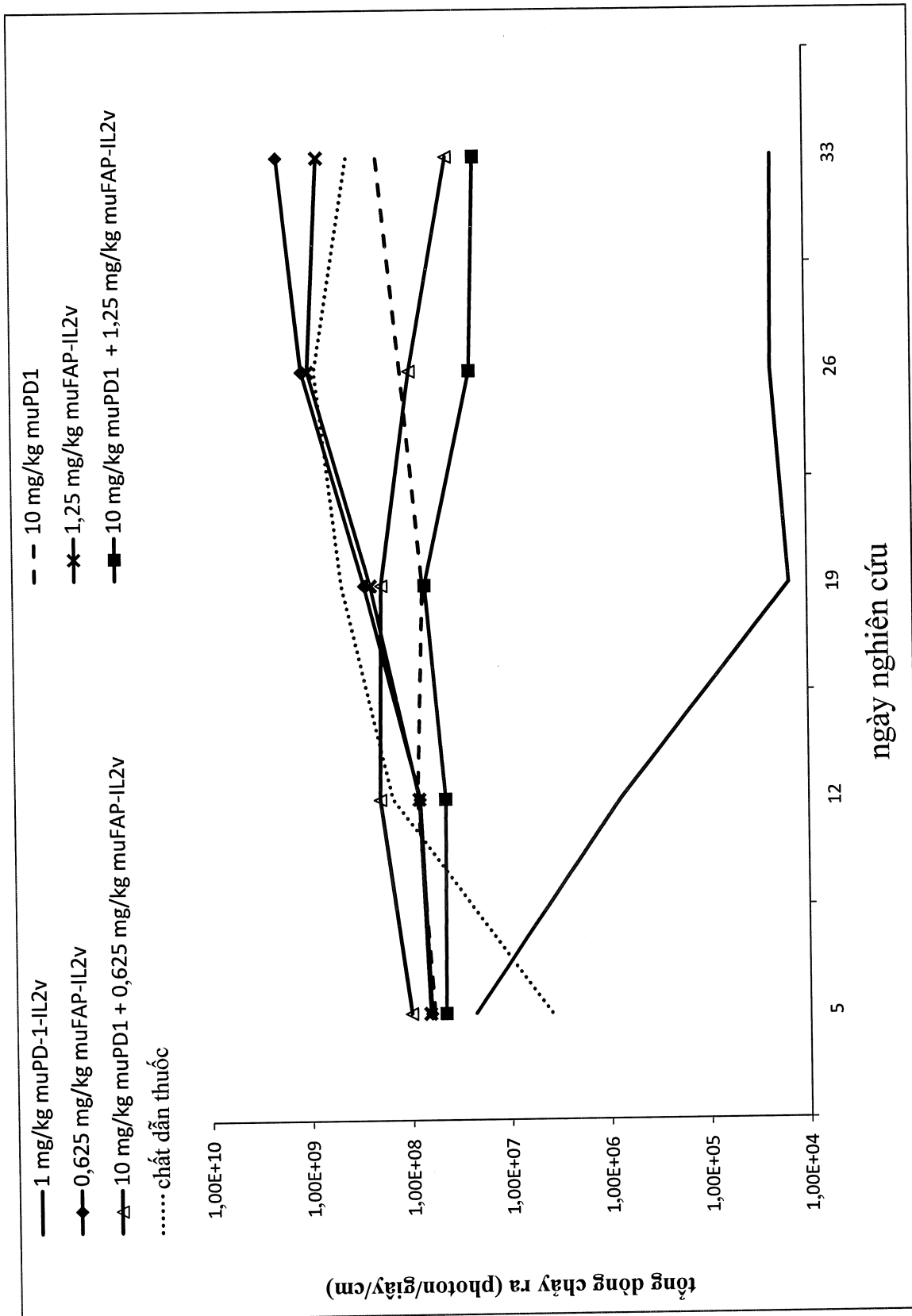


Fig.22

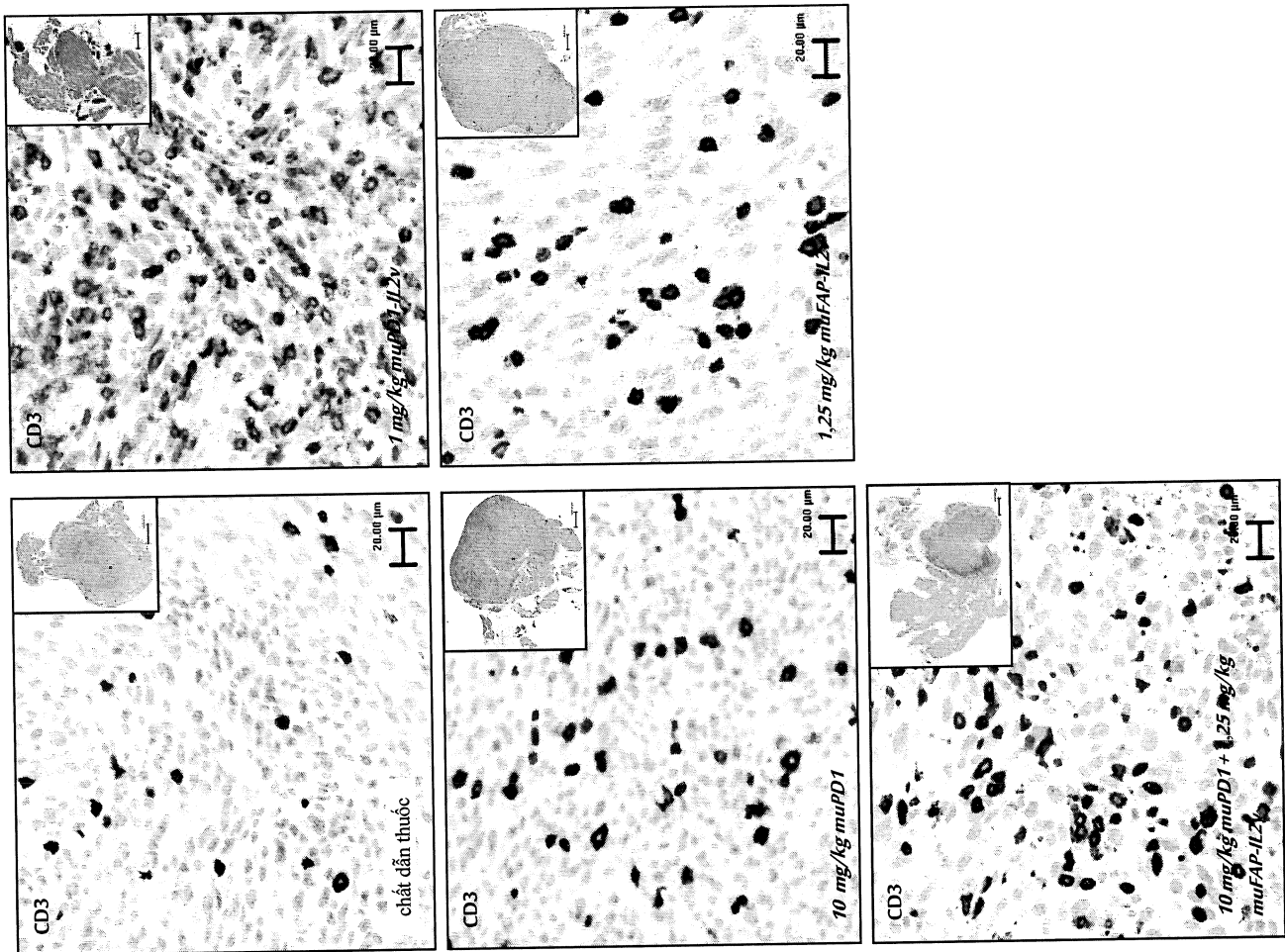


Fig.23

Fig.24A

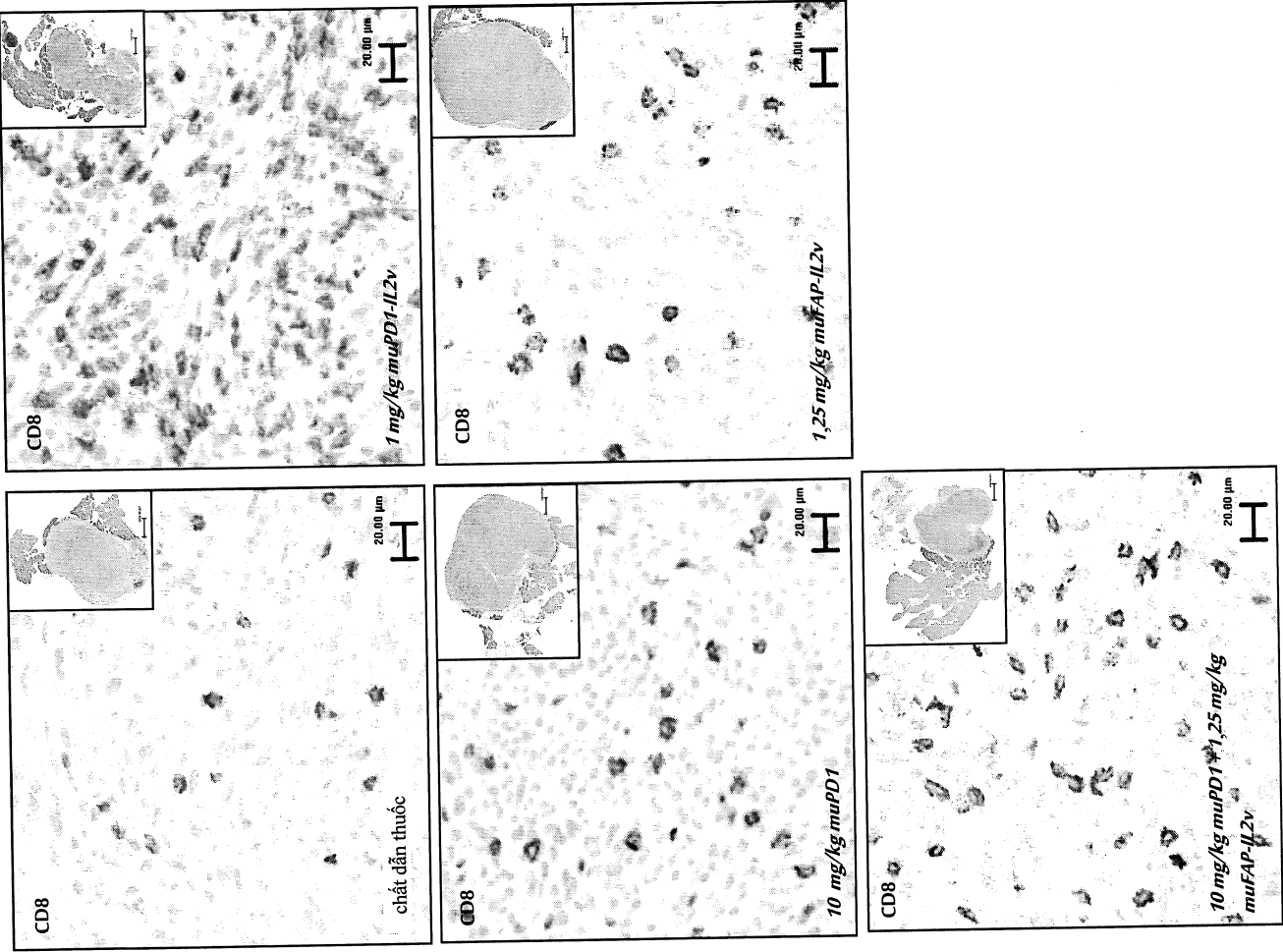
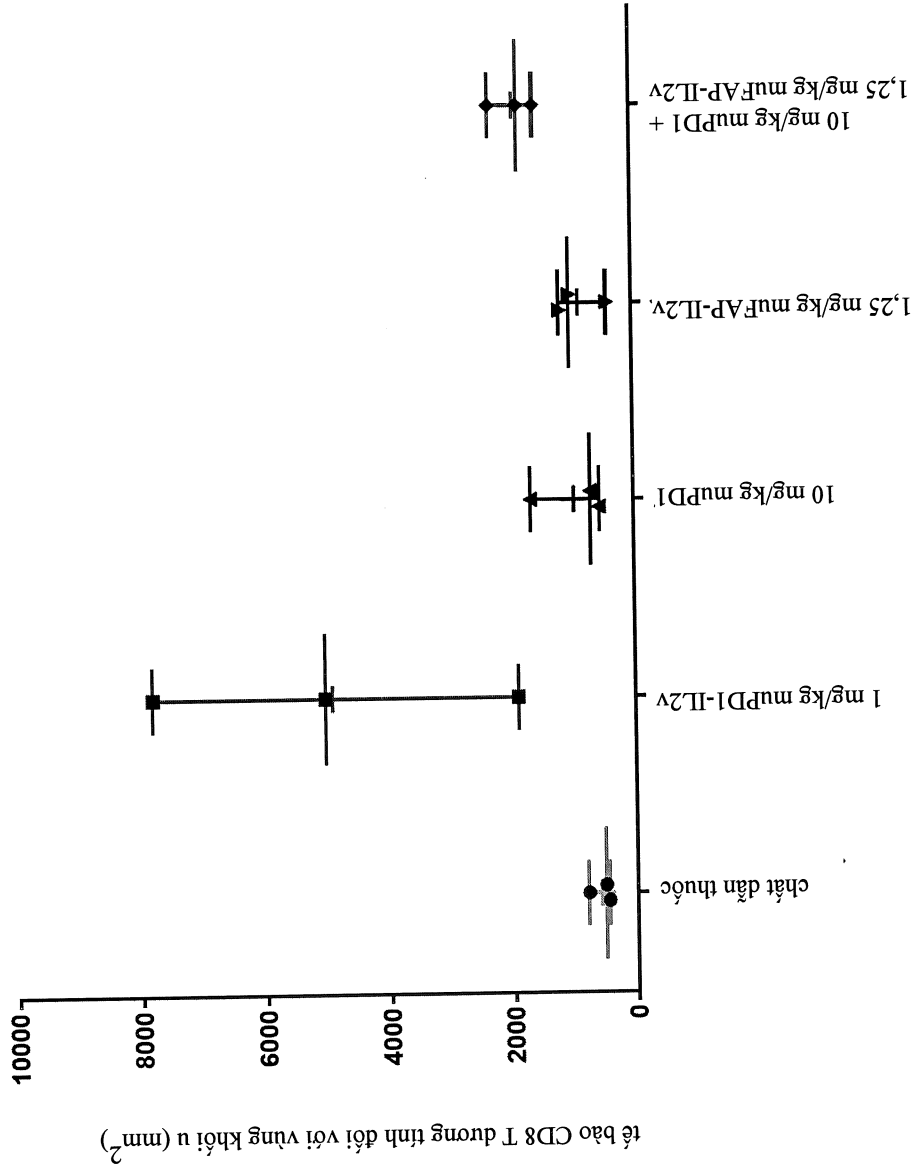


Fig.24B



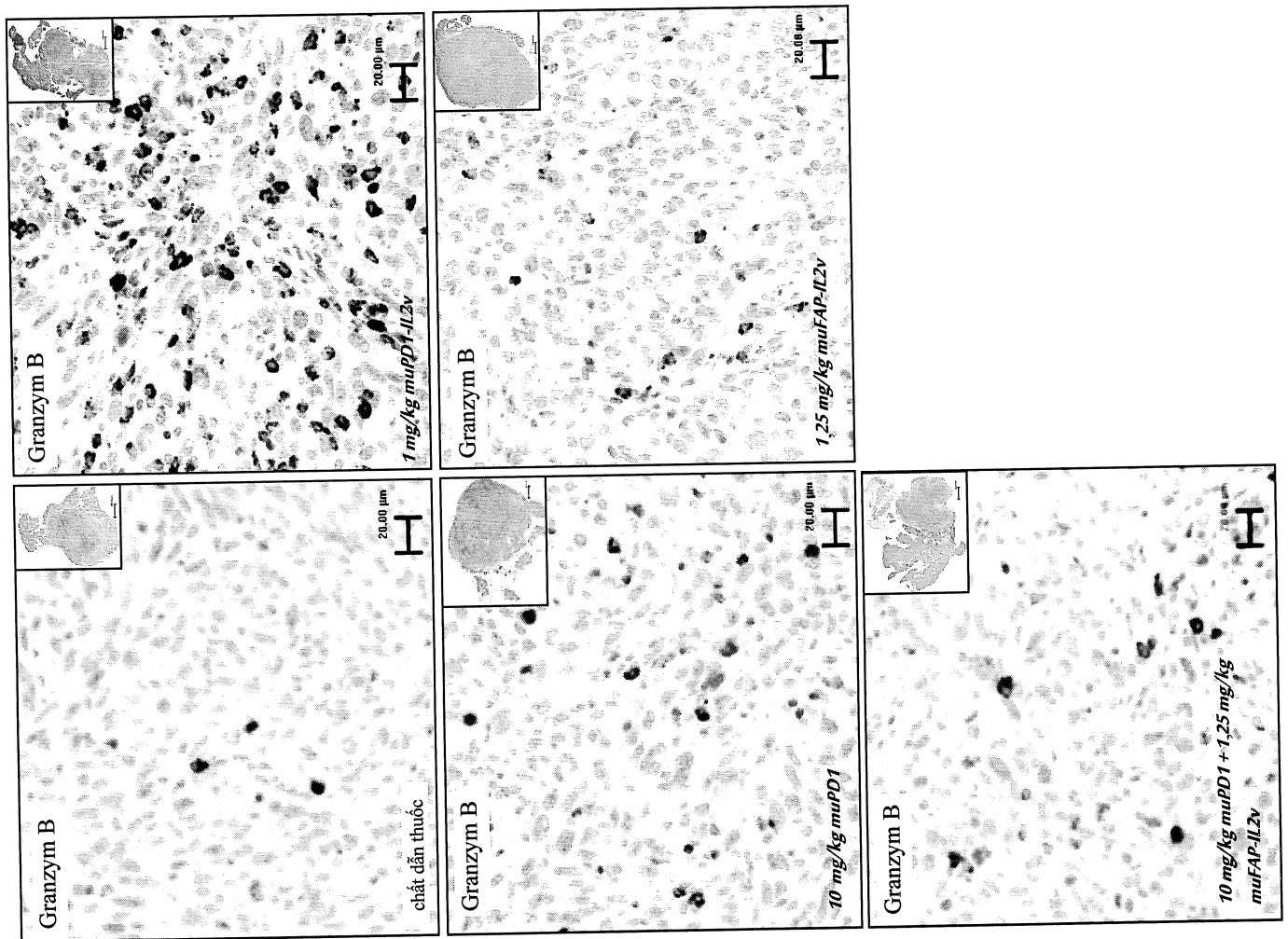


Fig.25A

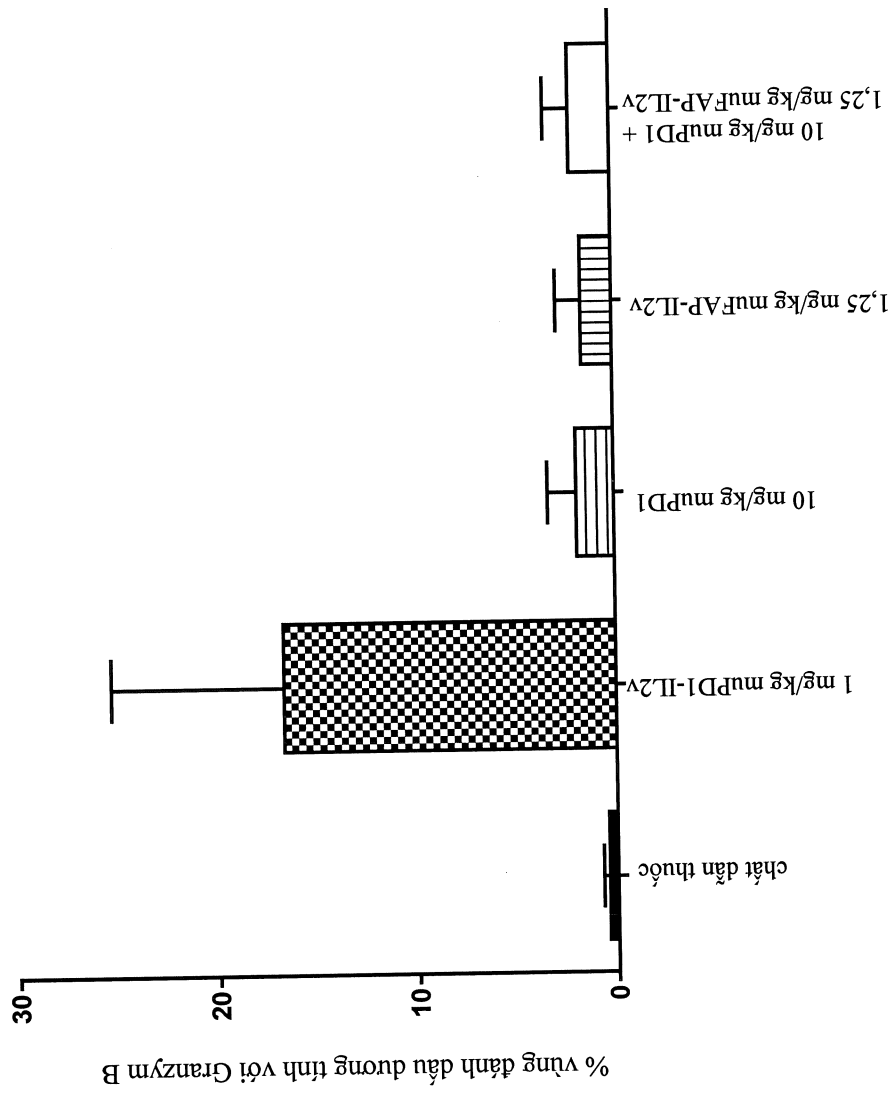


Fig.25B

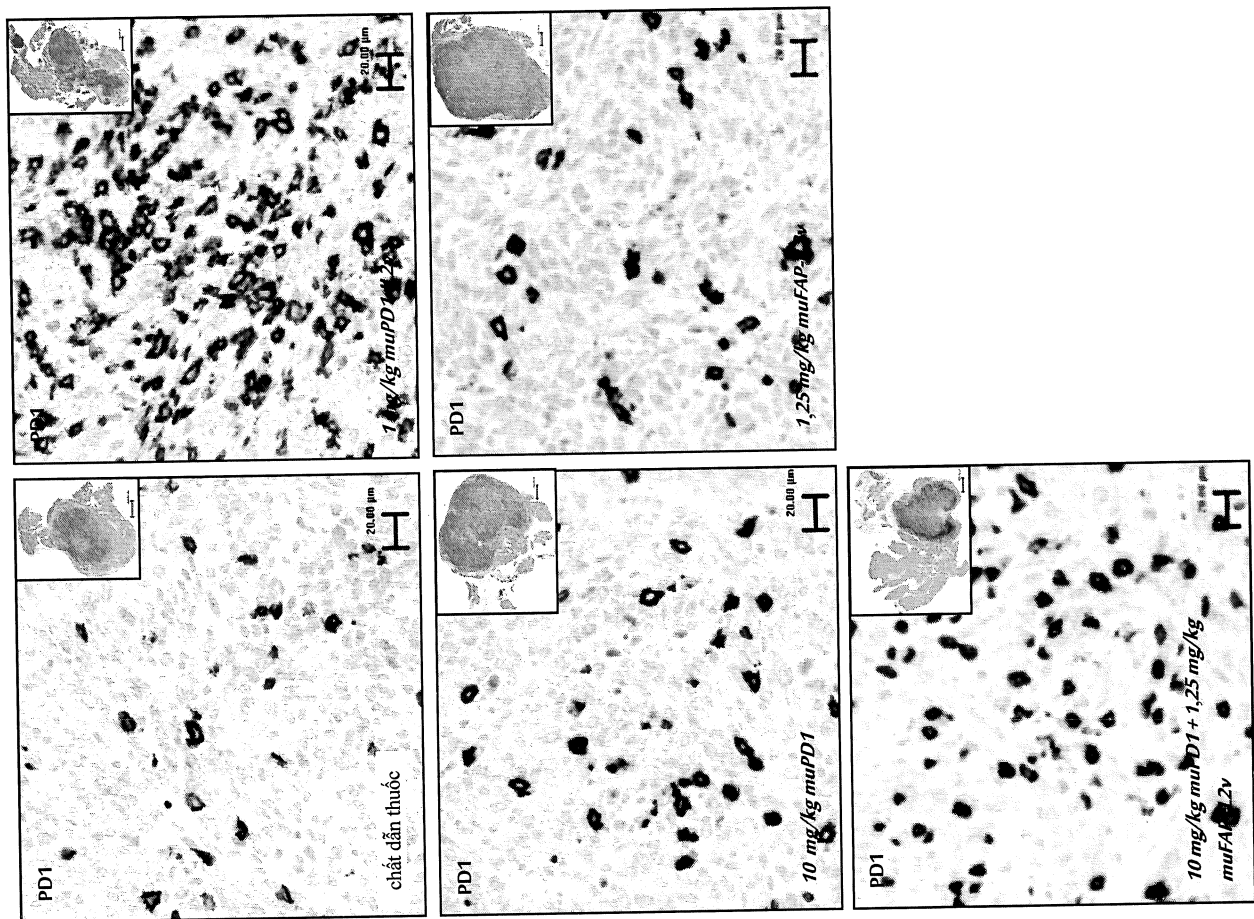
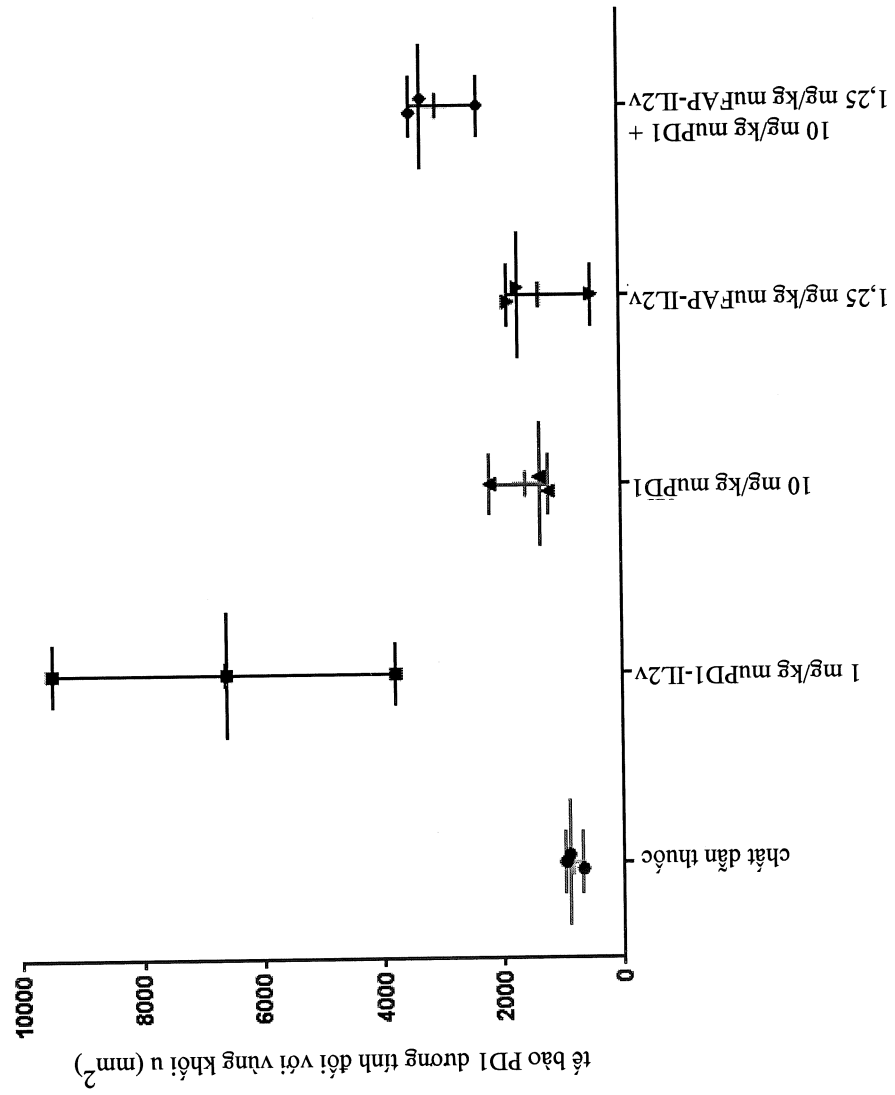


Fig.26A

Fig.26B



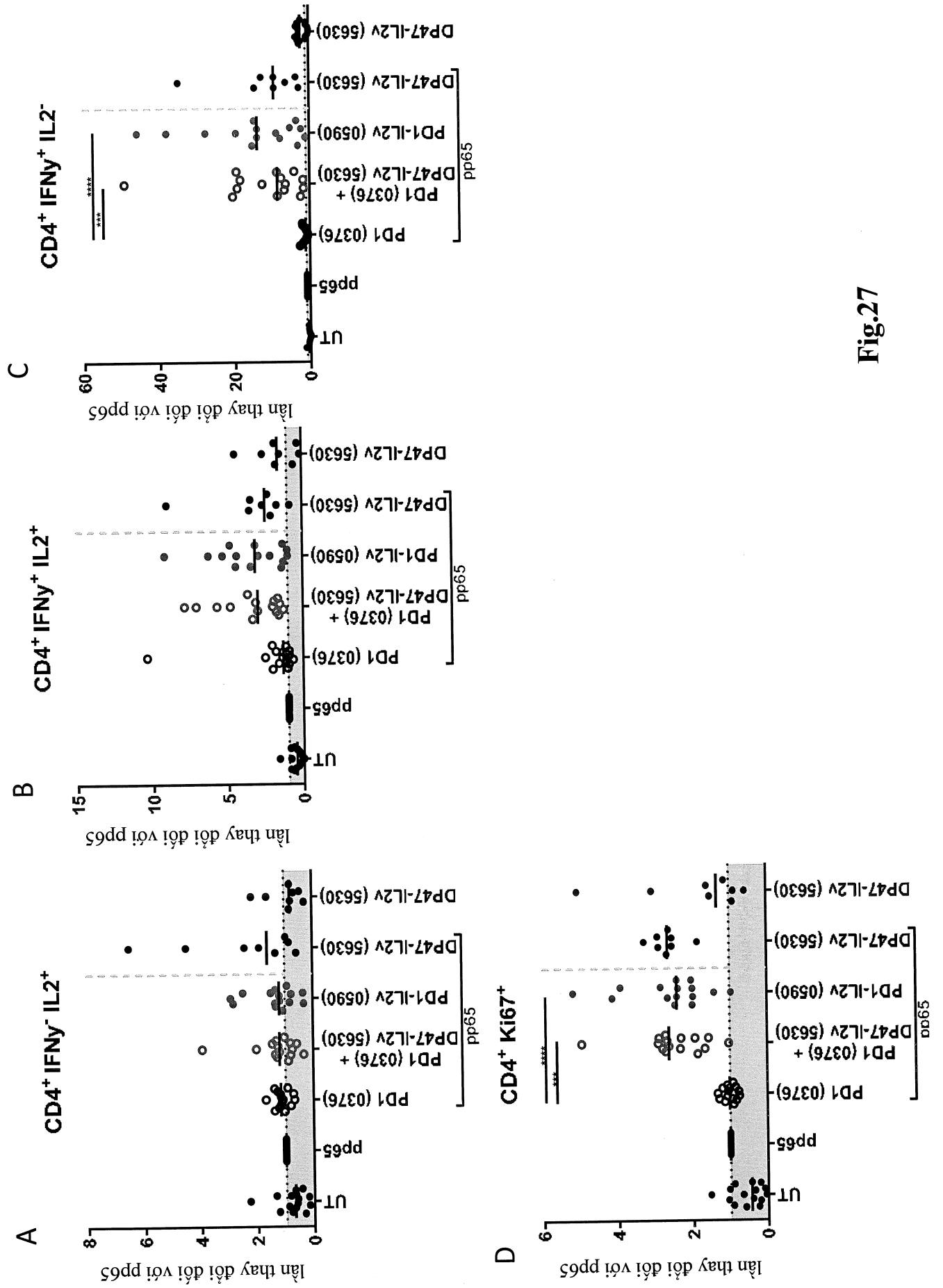


Fig.27

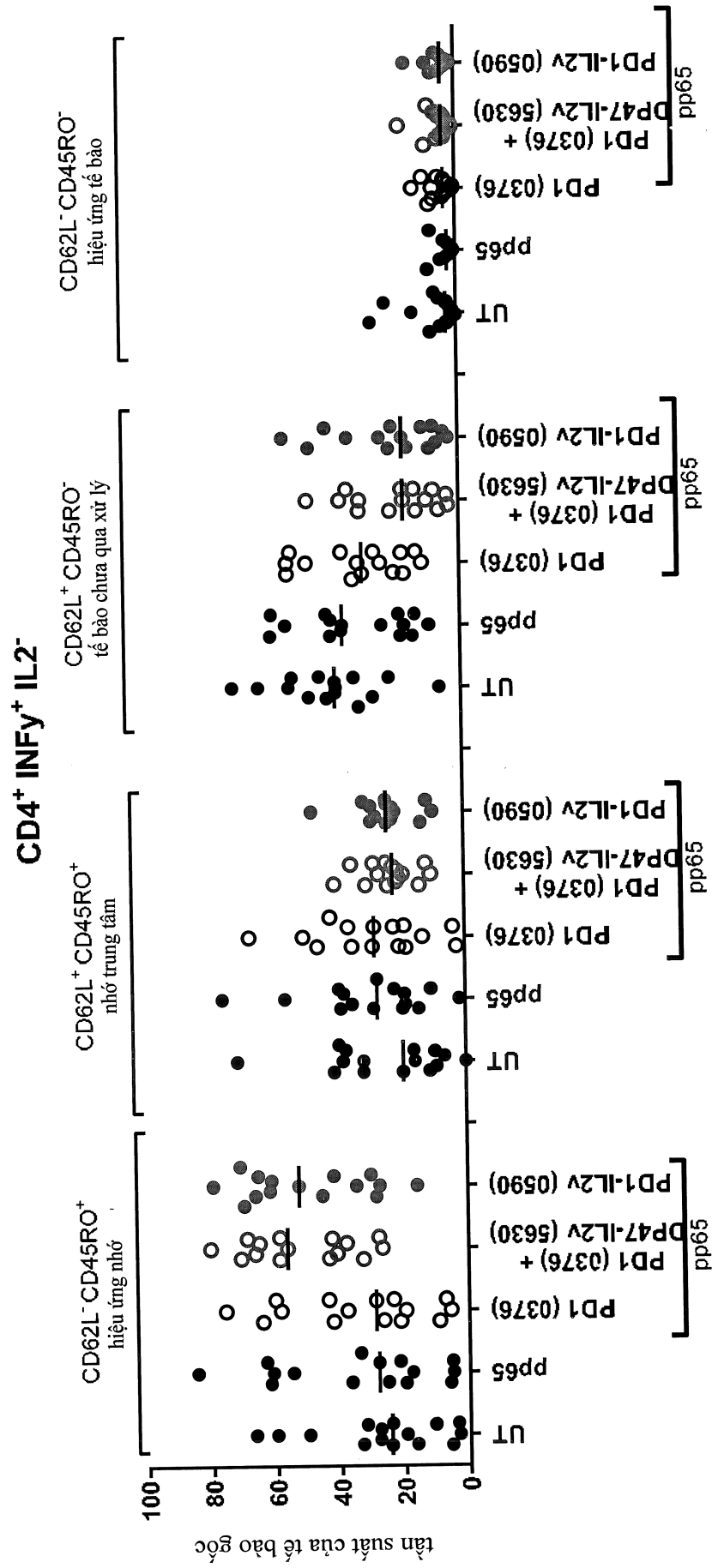


Fig.28

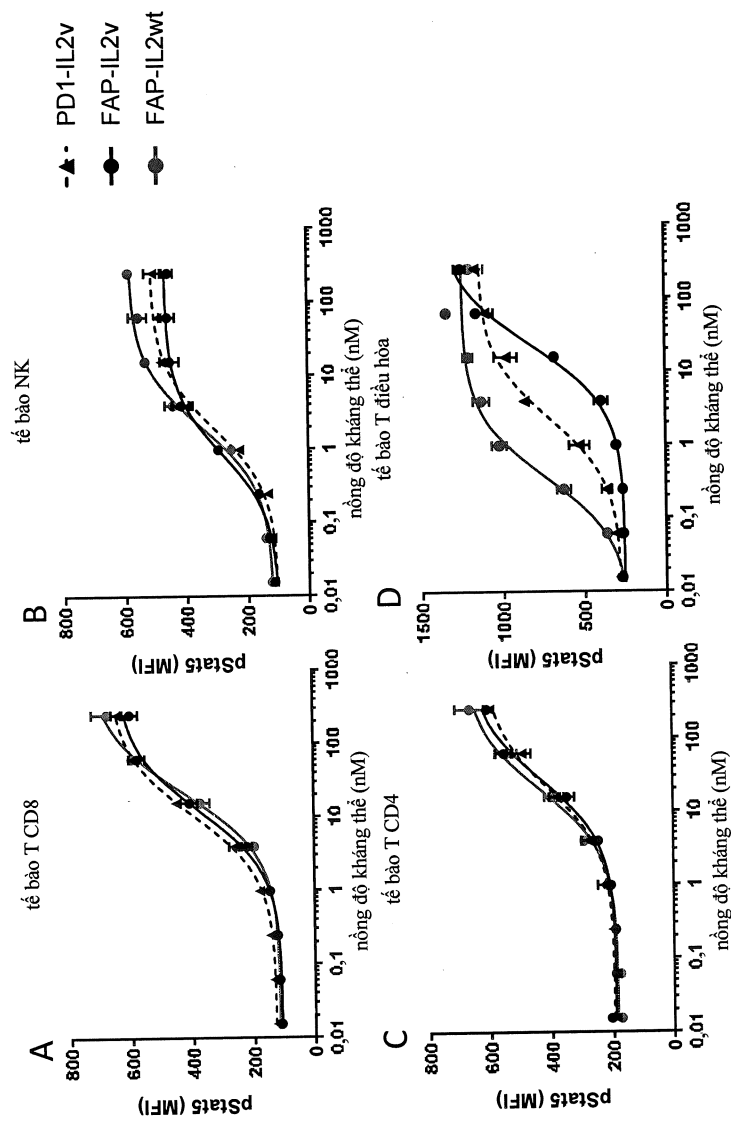


Fig.29

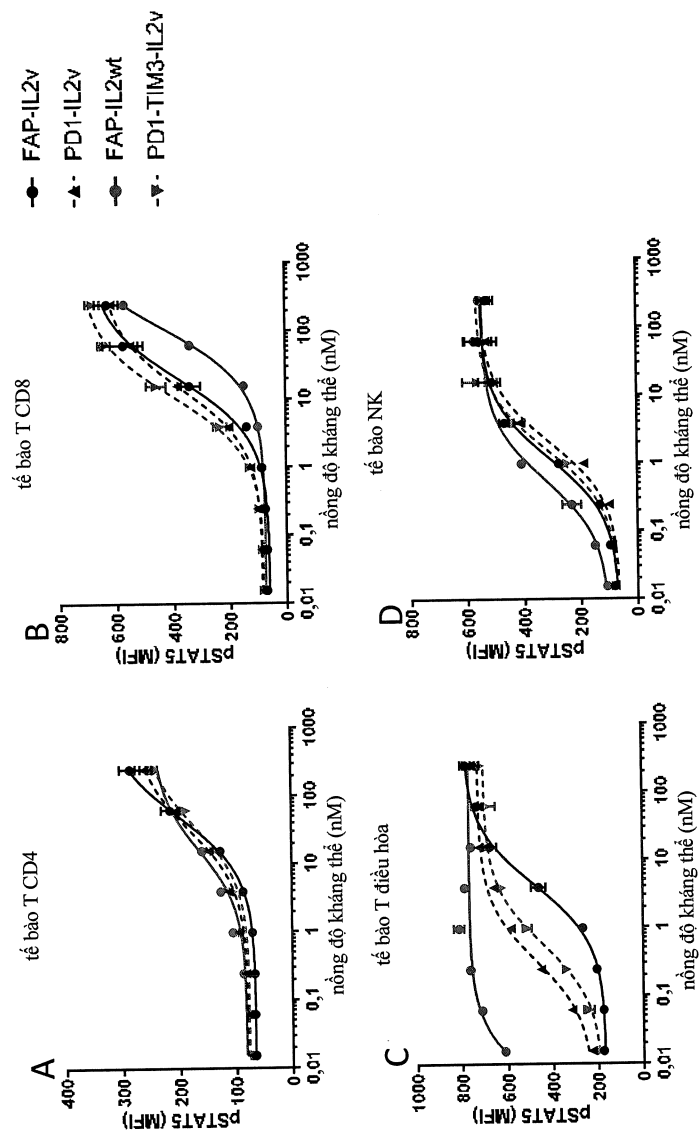


Fig.30

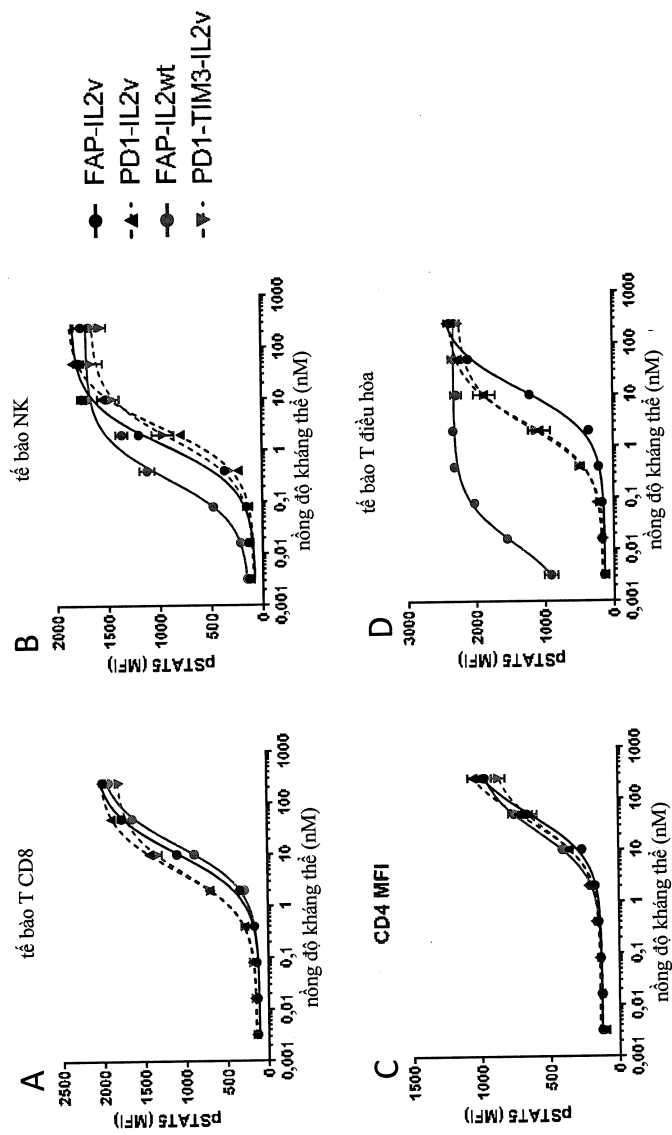


Fig.31

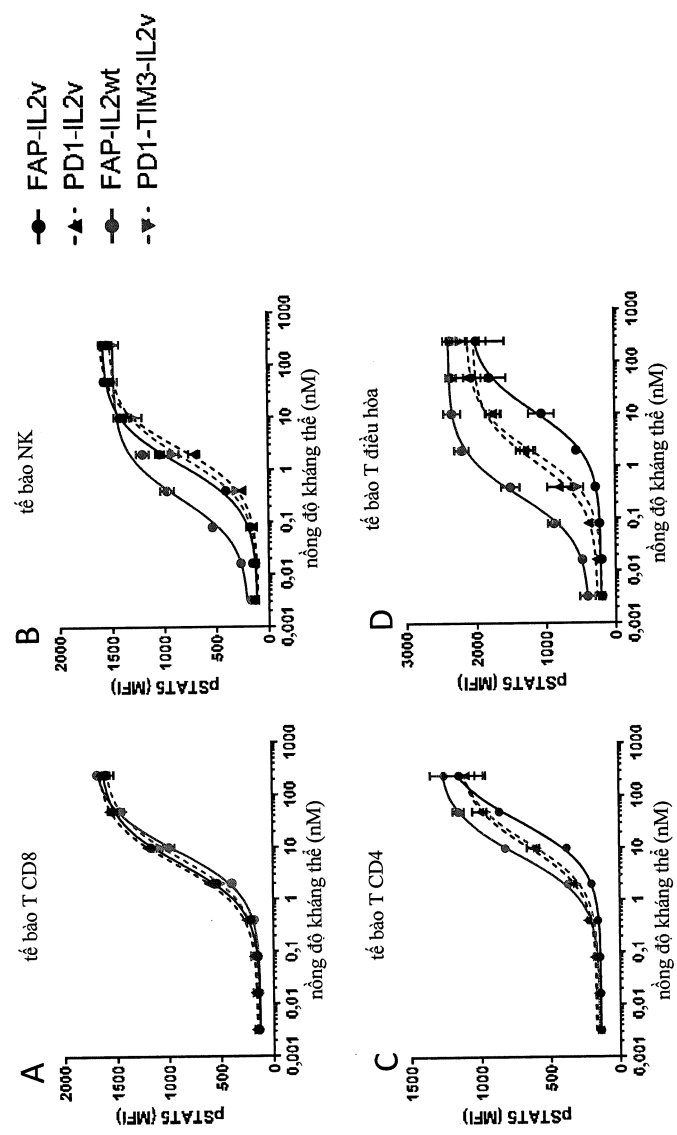


Fig.32