



(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)



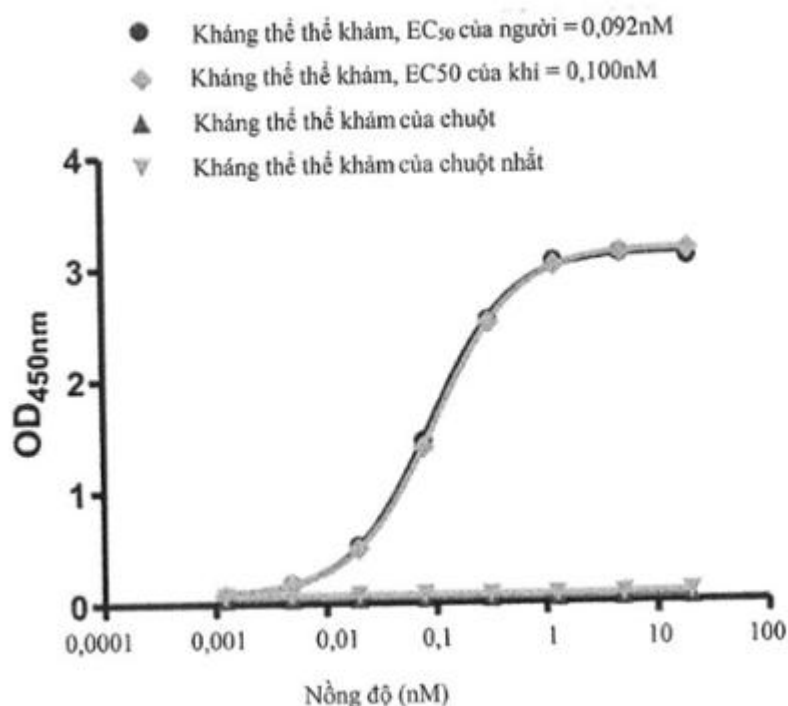
1-0036395

(51)^{2017.01} A61K 39/00; A61K 49/00; C07K 16/28; (13) B
A61K 49/22; A61K 51/10; A61P 35/00;
A61K 47/68; A61K 49/16

- (21) 1-2019-01774 (22) 08/09/2017
(86) PCT/CN2017/101082 08/09/2017 (87) WO 2018/050027 A1 22/03/2018
(30) 201610827099.1 14/09/2016 CN
(45) 25/07/2023 424 (43) 25/06/2019 375A
(73) BEIJING HANMI PHARM. CO., LTD. (CN)
No. 10 Tianzhu West Road, Tianzhu Airport Industrial Zone A, Shunyi District,
Beijing 101312, China
(72) YANG, Yaping (CN); LIU, Jiawang (CN); SONG, Nanmeng (CN); ZHANG,
Hongjuan (CN); JIN, Mengxie (KR).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PD-1 VÀ ĐOẠN CHỨC NĂNG CỦA NÓ, CHẾ PHẨM VÀ THUỐC CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với PD-1 và đoạn chức năng của nó. Kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể thể khảm PD-1 và đoạn chức năng của nó, và kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm và thuốc chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ y sinh học và nghiên cứu thiết kế kháng thể nhân hóa, và cụ thể là kháng thể liên kết đặc hiệu với PD-1 và các đoạn chức năng của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1) là phân tử kiểm soát miễn dịch được đưa ra gần đây tham gia vào việc điều hòa quá trình hoạt hóa tế bào T, nó có thể điều chỉnh cường độ và thời gian của các đáp ứng miễn dịch. Trong điều kiện bình thường, PD-1 có thể làm trung gian và duy trì phản ứng dung nạp tự miễn dịch của cơ thể và ngăn ngừa sự hoạt hóa quá mức hệ miễn dịch trong quá trình phản ứng viêm gây tổn thương mô, có tác dụng tích cực để không xảy ra các bệnh tự miễn. Trong điều kiện bệnh lý, PD-1 liên quan đến tính miễn dịch của khối u cũng như sự xuất hiện và phát triển các bệnh tự miễn khác nhau (Anticancer Agents Med Chem. 2015; 15(3):307-13. Hematol Oncol Stem Cell Ther. Tháng 3.2014; 7(1):1-17. Trends Mol Med. Tháng 1.2015; 21(1):24-33. Immunity. 25.7.2013; 39(1):61-73. J Clin Oncol. 10.6.2015; 33(17):1974-82).

PD-1 thuộc họ CD28. Nhưng khác với các thành viên khác của họ CD28 như CTLA4 có thể tạo thành dime cộng hóa trị được liên kết bằng liên kết disulfua, PD-1 tồn tại dưới dạng monome. Cấu trúc của PD-1 chủ yếu bao gồm vùng giống vùng biến đổi của globulin miễn dịch ngoại bào, vùng xuyên màng kỵ nước và vùng nội bào, và vùng nội bào này có hai vị trí phosphoryl hóa độc lập, hai vị trí này lần lượt là motif ức chế dựa trên tyrosin của thụ thể miễn dịch và motif chuyển đổi dựa trên tyrosin của thụ thể miễn dịch. Quá trình biểu hiện PD-1 là quá trình cảm ứng và chủ yếu xảy ra trên bề mặt tế bào T được hoạt hóa và cả trên tế bào B, tế bào NK, bạch cầu đơn nhân, và tế bào DC. Phôi tử của PD-1 bao gồm PD-L1 (phôi tử kiểm soát sự chết theo chương trình 1), PD-L2 (phôi tử kiểm soát sự chết theo chương trình 2), và các phôi tử của nó thuộc họ B7. PD-L1 có thể được cảm ứng và biểu hiện trên các bề mặt tế bào miễn dịch khác nhau bao gồm tế bào T, tế bào B, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, tế bào DC, và tế bào nội mô, tế bào biểu bì, v.v.. trong khi PD-L2 có thể được cảm ứng

và biểu hiện trên một số tế bào miễn dịch bao gồm đại thực bào, tế bào DC, tế bào B (Autoimmun Rev, 2013, 12(11): 1091-1100; Front Immunol, 2013, 4: 481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264; Trends Mol Med. tháng 1.2015; 21(1):24-33).

Trong các nghiên cứu về khối u đã phát hiện được rằng PD-L1 được biểu hiện ở mức cao trên bề mặt tế bào của các khối u khác nhau, bao gồm u melanin, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, và bệnh ung thư ruột, trong khi PD-L2 được biểu hiện ở mức cao trên bề mặt tế bào của u limphô tế bào B. Do PD-L1 hoặc PD-L2 được biểu hiện ở mức cao, tế bào u liên kết với PD-1 trên tế bào T, và truyền tín hiệu ức chế miễn dịch, dẫn tới tính dung nạp miễn dịch của cơ thể đối với tế bào u, điều này có lợi cho quá trình sinh trưởng và di căn của tế bào u. Sự biểu hiện ở mức cao của phối tử PD-1 có liên hệ chặt chẽ với tiên lượng xấu và tính kháng thuốc ở các bệnh nhân có khối u (Hematol Oncol Stem Cell Ther., tháng 3.2014; 7(1):1-17). Ngoài ra, các nghiên cứu cũng phát hiện được rằng sự biểu hiện được điều chỉnh tăng của PD-1 trên bề mặt tế bào T, đặc biệt là trên bề mặt tế bào T thâm nhiễm bên trong tế bào u, cũng có liên quan chặt chẽ đến tiên lượng xấu (Trends Mol Med., tháng 1.2015; 21(1):24-33).

Điểm nóng gần đây là phát triển các kháng thể phong bế con đường truyền tín hiệu PD-1/PD-L để chống lại khối u. Về mặt lâm sàng, các kháng thể phong bế PD-1/PD-L có hai dấu hiệu khác biệt: trước hết, hiệu quả không chỉ giới hạn ở loại khối u nhất định, hiệu quả kháng u mạnh và kéo dài đạt được trong phổ khối u rộng, khi việc đánh giá lâm sàng liên quan đến ngày càng nhiều loại khối u, dấu hiệu này sẽ được kiểm chứng thêm. Thứ hai là độ an toàn của các kháng thể này là khá tốt, và chỉ có một số tác dụng phụ liên quan đến miễn dịch, thay vì các tác dụng phụ phổ biến của một số thuốc hóa trị liệu và thuốc hướng đích, như mệt mỏi, giảm tế bào bạch cầu, hói đầu, tiêu chảy và phát ban. Kháng thể PD-1 Nivolumab đã được đưa ra thị trường để điều trị u melanin giai đoạn tiến triển, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và bệnh cacinom tế bào thận, và Pembrolizumab đã được đưa ra thị trường để điều trị u melanin giai đoạn tiến triển và bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Vấn đề cần lưu ý là hiệu quả kháng u tốt này của kháng thể phong bế PD-1/PD-L chỉ có thể có lợi cho một số lượng nhỏ bệnh nhân, đa số các bệnh nhân bị kháng thuốc bẩm sinh, hoặc sẽ bị tình trạng kháng thuốc thứ cấp (Oncology (Williston Park), tháng 11.2014;28 Suppl

3:15-28).

Do đó, sáng chế đã được đề xuất một cách cụ thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên kháng thể đơn dòng gốc của chuột nhắt kháng PD-1 của người có khả năng liên kết đặc hiệu với protein PD-1 của người thu được bằng cách tạo dòng, xác định và phân tích cấu trúc gen để xác định vùng CDR của nó, thiết kế kháng thể thể khảm và kháng thể nhân hóa tương ứng, thiết lập hệ biểu hiện tế bào có nhân điển hình tương ứng và tạo ra và tinh chế kháng thể thể khảm và kháng thể nhân hóa này.

Để đạt được mục đích nêu trên của sáng chế, các giải pháp kỹ thuật sau được thực hiện:

Kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 và đoạn chức năng của nó, trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng này chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng;

chuỗi nhẹ chứa vùng CDR chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3; chuỗi nặng chứa vùng CDR chuỗi nặng bao gồm vùng CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3;

trình tự axit amin của các vùng CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 1, 5 và 6, hoặc được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 2, 5 và 6, hoặc được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 3, 5 và 6, hoặc được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 4, 5 và 6; trình tự axit amin của các vùng CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 7, 8 và 9.

Tốt hơn nếu kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể thể khảm PD-1 và đoạn chức năng của nó, và kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó. Tức là cũng có thể hiểu rằng kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể thể khảm PD-1 và đoạn chức năng của nó, hoặc kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó.

Trong lĩnh vực này đã biết rõ là cả tính đặc hiệu và ái lực liên kết của kháng thể được quyết định chủ yếu bởi vùng CDR, và trình tự axit amin của vùng không phải vùng CDR có thể được thay đổi dễ dàng theo các kỹ thuật đã biết rõ để thu được biến thể có hoạt tính sinh học giống nhau. Theo sáng chế, các biến thể kháng thể đơn dòng có trình tự CDR giống với trình tự CDR của kháng thể nhân hóa nêu trên, do vậy, chúng có hoạt tính sinh học giống nhau.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó kháng thể này chứa trình tự vùng hằng định của globulin miễn dịch bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE và IgD của người.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó đoạn chức năng này bao gồm một hoặc nhiều đoạn được chọn từ nhóm bao gồm $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, scFv, kháng thể hai giá và đơn vị nhận biết tối thiểu của kháng thể.

“Đoạn chức năng” theo sáng chế để chỉ cụ thể là đoạn kháng thể có tính đặc hiệu với PD-1 giống với tính đặc hiệu của kháng thể gốc. Ngoài các đoạn chức năng nêu trên, đoạn bất kỳ mà thời gian bán hủy của nó tăng lên cũng có thể được bao hàm trong sáng chế.

scFv (sc = sợi đơn), kháng thể hai giá (kháng thể dime).

Các đoạn chức năng này thường có tính đặc hiệu liên kết giống như kháng thể mà từ đó chúng được tạo ra. Từ những điều được mô tả trong bản mô tả sáng chế, chuyên gia trong lĩnh vực này có thể hiểu được đoạn kháng thể theo sáng chế và điều chế đoạn chức năng nêu trên bằng phương pháp như cắt bằng enzyme (bao gồm pepsin hoặc papain) và/hoặc phương pháp phân cắt hóa học liên kết disulfua.

Đoạn kháng thể cũng có thể thu được bằng cách tổng hợp peptit bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, kỹ thuật này cũng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, hoặc bằng thiết bị tổng hợp peptit tự động như thiết bị tổng hợp peptit tự động là sản phẩm của Applied BioSystems chẳng hạn.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể thể khảm PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 14, hoặc được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 14, hoặc được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 14, hoặc được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14.

Tốt hơn nữa nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể thể khảm PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16.

Tốt hơn nếu kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên, trong đó

vùng khung chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó chứa vùng FR-L1, FR-L2, FR-L3 và FR-L4, và vùng khung chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó chứa vùng FR-H1, FR-H2, FR-H3 và FR-H4;

FR-L1 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

- axit amin thứ nhất D được thay bằng E;
- axit amin thứ hai V được thay bằng I;
- axit amin thứ mười ba L được thay bằng V;
- axit amin thứ mười chín A được thay bằng V;

FR-L2 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

- axit amin thứ sáu P được thay bằng S;
- axit amin thứ bảy G được thay bằng H;
- axit amin thứ chín A được thay bằng S;

FR-L3 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

- axit amin thứ hai mươi hai L được thay bằng V;
- axit amin thứ hai mươi tư P được thay bằng T;
- axit amin thứ hai mươi tám A được thay bằng G;
- axit amin thứ ba mươi một F được thay bằng Y;

FR-L4 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

- axit amin thứ bảy V được thay bằng L;

FR-H1 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21;

FR-H2 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

- axit amin thứ năm A được thay bằng T;
- axit amin thứ mười bốn A được thay bằng S;

FR-H3 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và trình tự axit amin này có sự thay thế sau đây hoặc tổ hợp của chúng:

- axit amin thứ mười hai N được thay bằng T;
- axit amin thứ mười bốn Y được thay bằng H;

axit amin thứ mười tám N được thay bằng S;

FR-H4 được chọn từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24.

Thông thường, khi ghép các vùng CDR của kháng thể của chuột vào vùng khung của người, việc chọn vùng khung của người có mức độ tương đồng trình tự cao sẽ có tỷ lệ thành công chắc chắn. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã chứng minh rằng nhiều biến thể ghép CDR cần có đột biến ngược để khôi phục hoạt tính nhất định của kháng thể. Làm thế nào để chọn vùng khung đúng của người là nút thắt chính.

CDR là vị trí thích hợp chính để liên kết kháng nguyên, nhưng trong phần lớn các trường hợp, FR (vùng khung) có ảnh hưởng quan trọng đến cấu dạng của vị trí liên kết. Theo sáng chế, để thu được kháng thể nhân hóa có ái lực cao, vùng FR thích hợp được chọn và gốc FR thích hợp được đột biến ngược thành axit amin ban đầu của chuột hoặc axit amin ở người và có cùng chức năng.

Tốt hơn nếu trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó là trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 25 đến 36;

tốt hơn nếu trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó là trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 37 đến 42;

tốt hơn nữa nếu trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 25; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 37;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 25; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 38;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 29; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 38;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 30; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 38;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 31; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 38;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1

và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 26; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 38;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 28; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 40;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 25; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 40;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 29; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 40;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 30; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 40;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 31; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 40;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 28; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 38;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 27; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 39;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 32; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 39;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 33; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 39;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 34; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 39;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 35; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 41;

theo cách khác, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 36; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương ứng được nêu trong SEQ ID NO: 42;

tốt hơn nữa nếu trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa PD-1 và đoạn chức năng của nó được nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 tương ứng.

Cần lưu ý rằng ngoài các trình tự axit amin nêu trên theo sáng chế, việc tạo ra các kháng thể thể khảm và kháng thể nhân hóa có thể đạt được bằng phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, như bằng cách thiết kế kháng thể nhân hóa tái tổ hợp dựa trên các vùng CDR được giải trình tự của kháng thể của chuột, kháng thể của chuột này được tiết ra bởi tế bào u tủy của chuột được gây miễn dịch hoặc bởi tế bào u tủy được dung hợp với tế bào lách của loài khác được dung hợp với tế bào u tủy. Chuột được gây miễn dịch có thể bao gồm chuột chuyển gen có locut globulin miễn dịch của người có thể trực tiếp tạo ra kháng thể của người. Một phương án có thể thực hiện khác có thể bao gồm sàng lọc thư viện bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện trên thể thực khuẩn.

Phân tử axit nucleic được phân lập, phân tử này được chọn từ:

A) ADN hoặc ARN mã hóa kháng thể và đoạn chức năng của nó như mô tả ở trên; và

B) axit nucleic bổ sung cho axit nucleic được xác định trong mục A).

Vectơ chứa phân tử axit nucleic như mô tả ở trên.

Sáng chế còn đề cập đến ít nhất một cấu trúc nhân mã hóa phân tử axit nucleic như mô tả ở trên, tốt hơn là vectơ, tốt hơn nữa là vectơ biểu hiện, như plasmit, được mô tả theo một phương án của sáng chế.

Tế bào chủ được biến nạp bằng vectơ như mô tả ở trên.

Tế bào chủ này là tế bào có nhân điển hình, như tế bào của động vật có vú.

Phương pháp tạo ra kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 và đoạn chức năng của nó bao gồm các bước sau đây:

nuôi cấy tế bào chủ như mô tả ở trên trong môi trường và trong điều kiện nuôi

cây thích hợp; và

thu hồi kháng thể tạo ra và đoạn chức năng của nó từ môi trường nuôi cấy hoặc từ tế bào chủ được nuôi cấy.

Chế phẩm chứa kháng thể nêu trên và/hoặc đoạn chức năng của nó, hoặc hỗn hợp của kháng thể này và các thành phần khác, hoặc hỗn hợp của đoạn chức năng của kháng thể này và các thành phần khác, làm thành phần hoạt tính.

Tốt hơn nếu chế phẩm như mô tả ở trên, kháng thể và đoạn chức năng của nó được liên kết với ít nhất một chất chẩn đoán và/hoặc chất điều trị để tạo ra thể liên hợp miễn dịch.

Tốt hơn nếu chất chẩn đoán là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất tương phản phóng xạ, ion thuận từ, kim loại, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang hóa học, chất tương phản siêu âm, và chất cảm quang.

Tốt hơn nếu chất đồng vị phóng xạ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}mTc , ^{94}Tc , ^{99}mTc , ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , ^{52}mMn , ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb và ^{83}Sr .

Tốt hơn nếu ion thuận từ là một hoặc nhiều ion được chọn từ nhóm bao gồm crom (III), mangan (II), sắt (III), sắt (II), coban (II), niken (II), đồng (II), neodymi (III), samari (III), yterbi (III), gadolini (III), vanadi (II), tebi (III), dysprosi (III), holmi (III) và erbi (III).

Tốt hơn nếu chất đánh dấu huỳnh quang là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm Alexa 350, Alexa 405, Alexa 430, Alexa 488, Alexa 555, Alexa 647, AMCA, aminoacridin, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 5-carboxy-4', 5'-diclo-2',7'-dimetoxyllorescein, 5-carboxy-2',4',5',7'-tetracloflorescein, 5-carboxyllorescein, 5-carboxyrodamin, 6-carboxyrodamin, 6-carboxytetrametylrodamin, thuốc nhuộm xanh Cascade, Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, 6-FAM, dansyl clorua, lorescein, HEX, 6-JOE, NBD (7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol), Oregon xanh lá cây 488, Oregon xanh lá cây 500, Oregon xanh lá cây 514, thuốc nhuộm xanh ngọc, axit phtalic, axit terephtalic, axit isophtalic, cresol tím bền, cresyl tím, cresyl xanh da trời tươi, axit 4-aminobenzoic, erythrosin, phtaloxyanin, azomethin, xyanin, xantin, succinyl lorescein, kim loại đất hiếm

cryptat, tri-bipyridyldiamin oxim, hợp chất europi cryptat hoặc chelat, diamin, dixyanin, thuốc nhuộm xanh da trời La Jolla, alophycoxyanin, alocoxyanin B, phycoxyanin C, phycoxyanin R, thiamin, R-phycoerythrin, C-phycoxyanin, phycoerythrin R, REG, rodamin xanh lá cây, rodamin isothioxyanat, rodamin đỏ, ROX, TAMRA, TET, TRIT (tetrametylrodamin isothiol), tetrametylrodamin và thuốc nhuộm đỏ Texas.

Tốt hơn nếu chất điều trị là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể trần, chất độc tế bào, dược chất, chất đồng vị phóng xạ, nguyên tử bo, chất điều biến miễn dịch, chất chống chết tế bào theo chương trình, chất điều trị cảm quang, thể liên hợp miễn dịch và oligonucleotit.

Tốt hơn nếu dược chất là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm methotrexate, flouraxil, mercaptopurin, hydroxyure, cytarabine, nitơ mù tạc, xyclophosphamit, thiotepa, cisplatin, mitomycin, bleomycin, camptothecin, podophyllotoxin, actinomycin D, doxorubicin, daunorubicin, vinblastine, paclitaxel, cephalotaxus alkaloit và L-asparaginase.

Tốt hơn nếu oligonucleotit là một hoặc nhiều oligonucleotit được chọn từ nhóm bao gồm shRNA, miRNA và siRNA.

Tốt hơn nếu chất điều biến miễn dịch là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm xytokin, chemokin, yếu tố sinh trưởng tế bào gốc, lymphotoxin, yếu tố tạo máu, yếu tố kích thích tạo cụm (colony stimulating factor: CSF), interferon, erythropoietin, thrombopoietin, yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor: TNF), interleukin (IL), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt (granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF), yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt-đại thực bào (granulocyte macrophage-colony stimulating factor: GM-CSF) và yếu tố sinh trưởng tế bào gốc.

Trong đó, tốt hơn nếu xytokin này là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, N-methionyl hormon sinh trưởng của người, hormon sinh trưởng của bò, hormon tuyến cận giáp, thyroxin, insulin, proinsulin, relaxin, prorelaxin, hormon kích thích bao trứng (follicle-stimulating hormone: FSH), hormon kích thích tuyến giáp (thyroid stimulating hormone: TSH), hormon tạo thể vàng (luteinizing hormone: LH), yếu tố sinh trưởng gan, prostaglandin, yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi, prolactin, lactogen nhau thai, protein OB, yếu tố hoại tử khối u

α , yếu tố hoại tử khối u β , chất ức chế Mullerian, peptit liên quan đến gonadotropin của chuột, inhibin, activin, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch, integrin, thrombopoietin (TPO), NGF- β , yếu tố sinh trưởng tiểu cầu, TGF- α , TGF- β , yếu tố sinh trưởng giống insulin I, yếu tố sinh trưởng giống insulin II, erythropoietin (EPO), yếu tố gây tạo xương, interferon- α , interferon- β , interferon- γ , đại thực bào-CSF (M-CSF), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, angiostatin, thrombospondin, endostatin, yếu tố hoại tử khối u và LT.

Tốt hơn nếu chemokin là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm RANTES, MCAF, MIP1- α , MIP1- β , và IP-10.

Tốt hơn nếu chất đồng vị phóng xạ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm ^{111}In , ^{111}At , ^{177}Lu , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{152}Dy , ^{166}Dy , ^{161}Ho , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{211}Pb , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{58}Co , ^{80}mBr , ^{99}mTc , ^{103}mRh , ^{109}Pt , ^{119}Sb , ^{189}mOs , ^{192}Ir , ^{219}Rn , ^{215}Po , ^{221}Fr , ^{255}Fm , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{224}Ac , ^{77}Br , ^{113}mIn , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{121}mTe , ^{122}mTe , ^{125}mTe , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{76}Br và ^{169}Yb .

Sử dụng chế phẩm như được mô tả ở trên để sản xuất thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh tự miễn, phản ứng miễn dịch chống lại mảnh ghép, bệnh dị ứng, bệnh nhiễm trùng, bệnh thoái hóa thần kinh, hoặc khối u.

Tốt hơn nếu bệnh tự miễn là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm khớp, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vảy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh Crohn, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm cầu thận, bệnh giống bệnh cơ tim giãn, hội chứng Sjogren, bệnh viêm da tiếp xúc dị ứng, bệnh viêm đa cơ, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm đa động mạch quanh động mạch, bệnh thấp khớp, bệnh bạch biến, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, hội chứng Behcet và bệnh viêm tuyến giáp mạn tính.

Tốt hơn nếu bệnh thoái hóa thần kinh là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh Machado-Joseph, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ và bệnh Creutzfeldt-Jakob.

Tốt hơn nếu khối u là một hoặc nhiều khối u được chọn từ nhóm bao gồm bệnh

bạch cầu, u limphô, u tủy, u não, bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh caxinom mũi họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh sacôm tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh caxinom tế bào thận, và u melanin.

Sử dụng kháng thể và đoạn chức năng của nó như được mô tả ở trên để sản xuất thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh tự miễn, phản ứng miễn dịch chống lại mảnh ghép, bệnh dị ứng, bệnh nhiễm trùng, bệnh thoái hóa thần kinh, và khối u.

Thuốc để phòng và/hoặc điều trị bệnh tự miễn, phản ứng miễn dịch chống lại mảnh ghép, bệnh dị ứng, bệnh nhiễm trùng, bệnh thoái hóa thần kinh, hoặc khối u, thuốc này chứa kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 và đoạn chức năng có thể liên kết đặc hiệu với PD-1 của nó như mô tả ở trên, và chất mang được dụng.

Theo cách khác, thuốc này chứa chế phẩm như mô tả ở trên và chất mang được dụng.

Ở đây, thuật ngữ “được dụng” để chỉ hợp chất chấp nhận được về mặt sinh lý khi nó được sử dụng cho người, và không gây ra phản ứng dị ứng như rối loạn dạ dày ruột, chóng mặt hoặc phản ứng dị ứng khác, hoặc phản ứng dị ứng toàn thân tương tự với các phản ứng dị ứng này.

Theo sáng chế, “chất mang được dụng” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất kết dính (như xenluloza vi tinh thể, alginat, gelatin và polyvinylpyrrolidon), chất độn (như tinh bột, sucroza, glucoza và axit lactic khan), chất phân rã (như PVP liên kết ngang, tinh bột natri carboxymetyl liên kết ngang, natri croscarmeloza và hydroxypropyl xenluloza được thể ở mức thấp), chất làm trơn (magie stearat, nhôm stearat, bột talc, polyetylen glycol, natri benzoat), chất thấm ướt (như glyxerin), chất hoạt động bề mặt (như rượu xetylic), và chất làm tăng khả năng hấp thu, chất điều vị, chất làm ngọt, chất pha loãng, chất bao, v.v..

Sử dụng kháng thể và đoạn chức năng của nó như được mô tả ở trên để phòng và/hoặc điều trị bệnh tự miễn, phản ứng miễn dịch chống lại mảnh ghép, bệnh dị ứng, bệnh nhiễm trùng, bệnh thoái hóa thần kinh, hoặc khối u.

Tốt hơn nếu bệnh tự miễn là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm khớp, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh xơ cứng rải rác,

bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh Crohn, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm cầu thận, bệnh giống bệnh cơ tim giãn, hội chứng Sjogren, bệnh viêm da tiếp xúc dị ứng, bệnh viêm đa cơ, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm đa động mạch quanh động mạch, bệnh thấp khớp, bệnh bạch biến, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, hội chứng Behcet và bệnh viêm tuyến giáp mạn tính.

Tốt hơn nếu bệnh thoái hóa thần kinh là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh Machado-Joseph, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ và bệnh Creutzfeldt-Jakob.

Tốt hơn nếu khối u là một hoặc nhiều khối u được chọn từ nhóm bao gồm bệnh bạch cầu, u limphô, u tủy, u não, bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh caxinom mũi họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh sacôm tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh caxinom tế bào thận, và u melanin.

Phương pháp phòng và/hoặc điều trị bệnh tự miễn, phản ứng miễn dịch chống lại mảnh ghép, bệnh dị ứng, bệnh nhiễm trùng, bệnh thoái hóa thần kinh, hoặc khối u, bao gồm việc cho đối tượng cần phòng và/hoặc điều trị bệnh sử dụng thuốc theo sáng chế.

Tốt hơn nếu đối tượng nêu trên là người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Để minh họa rõ hơn các phương án cụ thể theo sáng chế hoặc các giải pháp kỹ thuật trong lĩnh vực thông thường, các hình vẽ được sử dụng trong các phương án cụ thể hoặc phần mô tả lĩnh vực thông thường này sẽ được mô tả vắn tắt dưới đây, và rõ ràng là các hình vẽ trong phần mô tả sau đây là một số phương án của sáng chế và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các hình vẽ khác dựa trên các hình vẽ này mà không cần sáng tạo bất kỳ.

Fig.1 thể hiện hoạt tính liên kết với PD-1 của người của kháng thể đơn dòng được tiết bởi dòng số 2 mô tả trong ví dụ 1.

Fig.2 thể hiện hoạt tính phong bế PD-1/PD-L1 của kháng thể đơn dòng được tiết bởi dòng số 2 theo ví dụ 1.

Fig.3 thể hiện hoạt tính liên kết với PD-1 của người của kháng thể đơn dòng

thể kháng kháng PD-1 của người theo ví dụ 3.

Fig.4 thể hiện tính đặc hiệu loài của kháng thể đơn dòng thể kháng kháng PD-1 của người theo ví dụ 4.

Fig.5 thể hiện tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể kháng kháng PD-1 của người theo ví dụ 4.

Fig.6 thể hiện hoạt tính phong bế PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2 của kháng thể đơn dòng thể kháng kháng PD-1 của người theo ví dụ 5.

Fig.7 thể hiện hoạt tính điều hòa chức năng tế bào T của kháng thể đơn dòng thể kháng kháng PD-1 của người theo ví dụ 6.

Fig.8 thể hiện đường cong nồng độ-thời gian của kháng thể đơn dòng thể kháng kháng PD-1 của người sau một lần tiêm tĩnh mạch cho chuột theo ví dụ 7.

Fig.9 thể hiện hiệu quả kháng u in vivo của kháng thể đơn dòng thể kháng kháng PD-1 của người theo ví dụ 8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dựa vào các hình vẽ. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng các phương án sau đây chỉ để minh họa sáng chế và không được dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Đối với các phương án trong đó điều kiện cụ thể không được chỉ rõ, các phương án này được thực hiện theo điều kiện thông thường hoặc điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Đối với các phương án sử dụng chất phản ứng hoặc thiết bị mà nhà sản xuất không được chỉ ra thì chúng đều là các sản phẩm có bán trên thị trường.

Ví dụ 1. Điều chế kháng thể đơn dòng của chuột kháng PD-1 của người

1.1. Gây miễn dịch động vật

Chuột cái BALB/c, 6 đến 8 tuần tuổi mua của Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd. được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột được làm quen với môi trường, bắt đầu gây miễn dịch. Để gây miễn dịch lần đầu, 100µg protein PD-1-Fc tái tổ hợp của người được trộn kỹ với tá chất Freund đầy đủ (Sigma-Aldrich, mã sản phẩm trong catalog F5881) để tạo thành nhũ tương, nhũ tương này được tiêm trong màng bụng cho chuột. Hai tuần sau, việc gây miễn dịch nhắc lại được thực hiện. Để gây miễn dịch nhắc lại, 50µg protein PD-1-Fc tái tổ hợp của người được trộn kỹ với tá chất Freund không đầy đủ (Sigma-Aldrich, mã sản

phẩm trong catalog F5806) để tạo thành nhũ tương, nhũ tương này được tiêm trong màng bụng cho chuột. Việc gây miễn dịch được nhắc lại theo cách giống như trên hai tuần một lần, tổng cộng ba lần. Vào ngày thứ bảy sau lần gây miễn dịch cuối cùng, máu được lấy từ đám rối tĩnh mạch sau ổ mắt của chuột và ly tâm để tách huyết thanh, và độ chuẩn kháng thể được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Chuột có độ chuẩn cao được chọn để lai để tạo ra tế bào lai. Ba ngày trước khi lai, 50 μ g protein PD-1-Fc tái tổ hợp của người được tiêm trong màng bụng cho chuột mà không có chất phụ trợ. Vào ngày thực hiện quá trình lai, lách được lấy ra trong điều kiện vô trùng để điều chế hỗn dịch tế bào lách để sử dụng.

1.2. Điều chế tế bào lai

Tế bào u tủy SP2/0 trong pha sinh trưởng logarit được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, dịch nổi bề mặt được tách ra, và tế bào được tạo hỗn dịch trong môi trường DMEM không đầy đủ (Gibco, mã sản phẩm trong catalog 11965) và đếm số tế bào. Tế bào cần thiết được thu hồi, rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy không đầy đủ. Đồng thời, hỗn dịch tế bào lách thu được từ chuột sau khi gây miễn dịch được rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy không đầy đủ. Tế bào u tủy và tế bào lách được trộn ở tỷ lệ 1: 10 hoặc 1: 5, và được rửa một lần bằng môi trường nuôi cấy không đầy đủ trong ống ly tâm bằng chất dẻo dung tích 50ml, và sau đó ly tâm ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 8 phút. Dịch nổi bề mặt được tách ra và pipet Pasteur được sử dụng để loại bỏ chất lỏng còn lại. Ống ly tâm được vỗ nhẹ trên lòng bàn tay để làm cho các tế bào kết tủa tơi và đều, và sau đó ống này được cho vào bể cách thủy ở 40°C để gia nhiệt sơ bộ. 1ml PEG-4000 45% (độ pH= 8,0, Sigma, mã sản phẩm trong catalog P7181) đã gia nhiệt trước tới 40°C được bổ sung bằng pipet loại 1ml ở thời điểm khoảng 1 phút (với thời gian tối ưu là 45 giây), khuấy nhẹ bằng pipet khi bổ sung (khuấy bằng pipet), các hạt nhìn thấy cần được quan sát bằng mắt thường. 20-30ml môi trường không đầy đủ đã được gia nhiệt trước tới 37°C được bổ sung vào ống bằng pipet loại 10ml trong 90 giây để dừng tác dụng của PEG, và để yên ở nhiệt độ 20 đến 37°C trong 10 phút. Ống này được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút, và dịch nổi bề mặt được tách ra. 5ml môi trường HAT (DMEM + HAT, Sigma, mã sản phẩm trong catalog H0262-10VL) được bổ sung vào, và tế bào kết tủa được trộn nhẹ (nhớ là không được thổi mạnh để làm tách các tế bào dung hợp) để tạo ra hỗn dịch trộn kỹ. Môi trường HAT được bổ sung thêm cho đến thể tích 80-100ml (nồng độ tế bào

lách được pha tới $1-2 \times 10^6/\text{ml}$). Hỗn dịch này được cho vào đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ, mỗi lỗ 0,1ml; và đĩa có 24 lỗ, mỗi lỗ 1,0-1,5ml. Các đĩa này được ủ trong tủ áp ở nhiệt độ 37°C , 6% CO_2 . Nói chung, sáu đĩa có 96 lỗ được sử dụng. Sau 5 ngày, 1/2 môi trường được thay bằng môi trường HAT mới. Sau 7 đến 10 ngày, môi trường HAT được thay bằng môi trường HT (DMEM + HT, Sigma, mã sản phẩm trong catalog H0137-10VL). Quá trình sinh trưởng của tế bào lai được quan sát đều đặn, và dịch nổi bề mặt được thu hồi để phát hiện kháng thể sau khi đạt mức độ nhập dòng tế bào đạt tới 1/10 hoặc cao hơn. Các cụm dương tính được phát triển và đông lạnh.

1.3. Sàng lọc và xác định dòng

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để sàng lọc kháng thể kháng PD-1 của người từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy tế bào lai. PD-1 tái tổ hợp của người (sản phẩm của Sino Biological Inc., mã sản phẩm trong catalog 10377-H08H) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là $1\mu\text{g}/\text{ml}$, lượng chất phủ là $100\mu\text{l}/\text{lỗ}$, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST, khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng $300\mu\text{l}/\text{lỗ}$, và sau đó ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Các mẫu $100\mu\text{l}$ dịch nổi bề mặt nuôi cấy và mẫu đối chứng huyết thanh dương tính được bổ sung vào mỗi lỗ tương ứng, và sau đó đĩa được ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, $100\mu\text{l}$ kháng thể kháng IgG của chuột được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Abeam, mã sản phẩm trong catalog Ab7068) được pha loãng theo tỷ lệ 1:10000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, và sau đó đĩa được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng $100\mu\text{l}/\text{lỗ}$ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng $100\mu\text{l}/\text{lỗ}$. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa. Các dòng dương tính có thể tạo ra kháng thể kháng PD-1 của người được chọn dựa trên giá trị đọc ở OD 450nm.

Việc các kháng thể kháng PD-1 của người tạo ra bởi các dòng dương tính có thể ngăn chặn sự liên kết của PD-1/PD-L1 hay không được xác định bằng thử nghiệm ELISA. PD-1-Fc tái tổ hợp của người được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là $1\mu\text{g}/\text{ml}$,

lượng chất phủ là 100 $\mu\text{l/lỗ}$, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST, khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 $\mu\text{l/lỗ}$, và sau đó ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. 50 μl mẫu kháng thể kháng PD-1 của người và mẫu đối chứng dương được bổ sung vào mỗi lỗ tương ứng, và sau đó PD-L1 được đánh dấu bằng biotin được bổ sung ở nồng độ 20nM (nồng độ cuối 10nM), với lượng 50 $\mu\text{l/lỗ}$, và sau đó ủ ở 25°C trong 90 phút. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Tiếp đó, Streptavidin-HRP (BD Pharmingen, mã sản phẩm trong catalog 554066) pha loãng ở tỷ lệ 1:1000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung với lượng 100 $\mu\text{l/lỗ}$, và sau đó ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 $\mu\text{l/lỗ}$ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 $\mu\text{l/lỗ}$. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa. Kháng thể kháng PD-1 của người có thể ức chế sự liên kết PD-1-Fc/ PD-L1 được đánh dấu bằng biotin được xác định là có hoạt tính trung hòa. Các dòng dương tính có thể tạo ra kháng thể trung hòa kháng PD-1 của người được chọn dựa trên khả năng ức chế.

Như được thể hiện trên Fig.1, dòng số 2 có hoạt tính liên kết mạnh với PD-1 của người; như được thể hiện trên Fig.2, dòng số 2 cũng có hoạt tính ức chế khá mạnh đối với sự liên kết PD-1/PD-L1 của người.

1.4. Giải trình tự kháng thể đơn dòng

Các dòng có cả hoạt tính liên kết kháng nguyên và hoạt tính trung hòa kháng nguyên thu được bằng cách sàng lọc được giải trình tự ADN của kháng thể. mRNA trong tế bào trước hết được tách chiết bằng cách sử dụng kit tinh chế RNAprep (Tiangen, DP430). Các bước tiến hành là như sau: 1×10^7 tế bào được ly tâm ở tốc độ $300 \times g$ trong 5 phút và được thu hồi trong ống ly tâm, và toàn bộ dịch nổi bề mặt được hút thận trọng. Bước phân giải được thực hiện ngay. Đáy của ống ly tâm được gõ nhẹ để làm rơi viên vón tế bào, 600 μl dung dịch đệm phân giải RL được bổ sung vào và xoay tròn ống. Toàn bộ dung dịch được chuyển sang cột lọc CS (cột lọc CS được đặt trong ống thu gom), ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400 \times g$) trong 2 phút, và nước lọc được thu hồi. Một lần thể tích ethanol 70% (thường là 350 μl hoặc 600 μl) được bổ sung vào nước lọc, trộn kỹ, dung dịch thu được và chất kết tủa được chuyển vào cột hấp thụ CR3 (cột hấp thụ CR3 được cho vào ống thu gom), ly tâm ở tốc độ 12000

vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30 đến 60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 được đưa trở lại vào ống thu gom. 350 μ l dung dịch đã loại protein RW1 được bổ sung vào cột hấp thụ CR3, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30-60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 được đưa trở lại vào ống thu gom. 80 μ l dung dịch làm việc DNaza I được bổ sung vào phần giữa của cột hấp thụ CR3 và cột CR3 này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. 350 μ l dung dịch đã loại protein RW1 được bổ sung vào cột hấp thụ CR3, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30-60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 được đưa trở lại vào ống thu gom. 350 μ l dung dịch rửa RW được bổ sung vào cột hấp thụ CR3 (kiểm tra xem etanol đã được bổ sung trước khi sử dụng chưa), cột CR3 này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 30 đến 60 giây, chất thải lỏng trong ống thu gom được loại bỏ, cột hấp thụ CR3 được đưa trở lại vào ống thu gom. Cột CR3 này được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 2 phút, và chất thải được loại bỏ. Cột hấp thụ CR3 được để ở nhiệt độ trong phòng trong vài phút để dung dịch rửa còn lại trong chất hấp thụ khô hoàn toàn. Cột hấp thụ CR3 được chuyển vào ống ly tâm mới không chứa RNaza, 30 đến 100 μ l ddH₂O không chứa RNaza được bổ sung vào, ống này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 2 phút, và sau đó ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ($\sim 13400\times g$) trong 2 phút để thu được dung dịch ARN.

Sợi thứ nhất của cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng kit QuantScript RT (Tiangen, KR103). Các bước thực hiện là như sau: ARN khuôn được làm tan bằng trên nước đá, đoạn môi, hỗn hợp 10 x RT (chứa RNasin và DTT), hỗn hợp dNTP siêu tinh khiết, ddH₂O không chứa RNaza được làm tan bằng ở nhiệt độ trong phòng (15 đến 25°C), và cho lên nước đá ngay sau khi làm tan bằng. Mỗi dung dịch được trộn kỹ bằng thiết bị trộn xoáy trước khi sử dụng, ống được ly tâm trong thời gian ngắn để thu hồi chất lỏng còn lại trên thành ống. Hỗn hợp hệ phiên mã ngược (kit tổng hợp sợi thứ nhất của cADN Tiangen Bio Quant, mã số trong Catalog KR103-04; 2 μ l dung dịch đệm phiên mã ngược 10 $\times$, 2 μ l dNTP siêu tinh khiết, 2 μ l đoạn môi ngẫu nhiên, 1 μ l enzym phiên mã ngược) được điều chế theo bảng 1. Hỗn hợp này được trộn kỹ, thời gian trộn xoáy là không lớn hơn 5 phút; và sau đó ly tâm trong thời gian ngắn và cho lên nước đá. Cuối cùng, ARN khuôn (50ng đến 2 μ g) được bổ sung vào hỗn hợp, trộn

kỹ, thời gian trộn xoáy là không lớn hơn 5 giây, ly tâm trong thời gian ngắn để thu hồi chất lỏng còn lại trên các thành của ống, ủ ở 37°C trong 60 phút. Sợi thứ nhất của cADN được tạo ra bằng cách phiên mã ngược được sử dụng cho phản ứng PCR sau đó.

Các đoạn mồi sử dụng trong phản ứng PCR là như được thể hiện trong bảng 1.

Đoạn mồi VH
F1:GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTG
R1:AGGT(C/G)(A/C)AACTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG
R2:AGGT(C/G)(A/C)AGCTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG
R3:AGGT(C/G)CAGCTGCAG(C/G)AGTC(A/T)GG
R4:CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT
F2:ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
F3:CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
F4:AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG
F5:AGGGACCAAGGGATAGACAGATGG
R5:(G/C)A(A/G)GT(A/T/C/G)(A/C)AGCTG(G/C)AG(G/C)AGTC
R6:(G/C)A(A/G)GT(A/T/C/G)(A/C)AGCTG(G/C)AG(G/C)AGTC(A/T)GG
Đoạn mồi VL
R1:GGTGATATCGTGAT(A/G)AC(C/A)CA(G/A)GATGAACTCTC
R2:GGTGATATC(A/T)TG(A/C)TGACCCAA(A/T)CTCCACTCTC
R3:GGTGATATCGT(G/T)CTCAC(C/T)CA(A/G)TCTCCAGCAAT
F1:GGGAAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAGC
F2:GGATACAGTTGGTGCAGCATC
R4:GA(C/T)ATTGTG(A/C)T(G/C)AC(A/C)CA(A/G)(A/T)CT(A/C)CA

Khi các đoạn mồi được sử dụng, đoạn mồi ngược bất kỳ trong số các đoạn mồi VH có thể được sử dụng cùng với đoạn mồi xuôi bất kỳ; theo cách tương tự, đoạn mồi ngược bất kỳ trong số các đoạn mồi VL cũng có thể được sử dụng cùng với đoạn mồi xuôi bất kỳ. Bảng đích thu được bằng cách khuếch đại PCR được tạo dòng vào vector pGEM-T. Dòng đơn được chọn để giải trình tự ADN.

Ví dụ 2. Điều chế kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể thu được bằng cách khuếch đại PCR được nêu trong SEQ ID NO: 10, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 14. Trình tự của vùng quyết định tính hỗ trợ có thể thu được bằng cách loại bỏ trình tự vùng khung ra khỏi trình tự vùng biến đổi của chuỗi; trong đó các trình tự axit amin của ba vùng quyết định tính hỗ trợ CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 1, 5 và 6 tương ứng; trình tự axit amin của ba vùng quyết định tính hỗ trợ CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7, 8 và 9 tương ứng. Các trình tự vùng biến đổi nêu trên được tạo dòng vào vector biểu hiện của tế bào có nhân điển hình X0GC, trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 15, và trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 16. Vector biểu hiện chuỗi nhẹ của kháng thể (chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ này là vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể liên kết với SEQ ID NO: 15) và chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng này là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể liên kết với SEQ ID NO: 16) được chuyển nhiễm vào dòng tế bào 293F (tế bào FreeStyle™ 293-F, mã sản phẩm trong catalog R79007, Invitrogen). Tế bào được cấy chuyển một ngày trước khi chuyển nhiễm. Vào ngày chuyển nhiễm, tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm và sau đó tái tạo hỗn dịch trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 mới (môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293, mã sản phẩm trong catalog 12338001, Gibco) ở mật độ 200×10^5 tế bào/ml. Plasmid được bổ sung dựa trên thể tích chuyển nhiễm tới nồng độ cuối 36,67 $\mu\text{g}/\text{ml}$, trộn nhẹ; sau đó PEI mạch thẳng (polyetylenimin mạch thẳng, trọng lượng phân tử 25000, mã sản phẩm trong catalog 43896, Alfa Aesar) được bổ sung tới nồng độ cuối 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$, trộn nhẹ. Sau đó, tế bào được cho vào máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, thể tích chuyển nhiễm gấp 19 lần của môi trường mới được bổ sung vào và tế bào được nuôi cấy liên tục ở 37°C trong máy lắc ở tốc độ 120 vòng/phút. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy sau khi chuyển nhiễm 5 đến 6 ngày được thu hồi bằng cách ly tâm.

Ví dụ 3. Hoạt tính liên kết và động học của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người

Hoạt tính liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người với

kháng nguyên của nó là PD-1 của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. PD-1 tái tổ hợp của người (sản phẩm của Sino Biological Inc.,) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1µg/ml, lượng chất phủ là 100 µl/lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 µl/lỗ, và sau đó ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đơn dòng đối chứng Pembrolizumab và các mẫu kháng thể đơn dòng thể khả kháng PD-1 của người được pha loãng theo loạt trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng 100µl cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, 100µl kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 µl/lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H₂SO₄ 1M với lượng 100 µl/lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.3, kháng thể đơn dòng thể khả kháng PD-1 của người có ái lực liên kết tốt với PD-1 của người, ái lực này tương tự với hoạt tính liên kết của Pembrolizumab.

Động học của quá trình liên kết của kháng thể đơn dòng thể khả kháng PD-1 của người với kháng nguyên của nó là PD-1 của người được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Biacore X100. Thiết bị này sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt quang học để phát hiện sự liên kết và phân ly giữa phân tử liên kết trên chip cảm ứng và mẫu phân tích. Các chip CM5 (GE Healthcare, BR-1000-12) được sử dụng. Quy trình thử nghiệm vẫn tất là như sau: kháng thể thể khả kháng PD-1 được pha loãng tới 2 µg/ml bằng dung dịch đệm làm việc (1×HBS-EP + 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, độ pH =7,4), sau đó phun ở tốc độ 10 µl/phút lên chip CM5 đã liên kết với IgG kháng người, để trong 60 giây. Trong pha liên kết, kháng nguyên PD-1 được pha loãng thành nhiều nồng độ bằng dung dịch đệm làm việc, và được phun ở tốc độ 30µl/phút trong 180 giây. Trong pha phân ly, thời gian phân ly là 1200 giây. Dung dịch glyxin (GE Healthcare, BR-1003-54) được sử

dụng để tái sinh trong 30 giây ở tốc độ 10 $\mu\text{l/phút}$. Phương pháp thử nghiệm đối với kháng thể đối chứng là tương tự, chỉ khác là thời gian phân ly được điều chỉnh thành 600 giây. Hằng số tốc độ liên kết và hằng số tốc độ phân ly được phân tích và tính toán bằng chương trình phần mềm đánh giá Biacore X100. Xem bảng 2 về hằng số tốc độ liên kết, hằng số tốc độ phân ly và hằng số cân bằng phân ly của các kháng thể thể khảm kháng PD-1 của người. Các dữ liệu này chứng tỏ rằng so với Pembrolizumab, sau khi liên kết với kháng nguyên PD-1, kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người có thể duy trì trạng thái liên kết trong thời gian dài hơn và không dễ dàng bị phân ly, điều này góp phần rất lớn vào chức năng sinh học của nó.

Bảng 2. Động học quá trình liên kết của kháng thể thể khảm kháng PD-1 của người với PD-1 của người

Mẫu	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (nM)
Pembrolizumab	$3,731E + 5$	$2,708E - 3$	7,257
Kháng thể thể khảm kháng PD-1 của người	$2,150E + 5$	$2,950E - 4$	1,372

Ví dụ 4. Tính đặc hiệu loài và tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người

Tính đặc hiệu loài của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. PD-1 tái tổ hợp của người, PD-1 của khỉ, PD-1 của chuột và PD-1 của chuột nhắt (tất cả đều là sản phẩm của Sino Biological Inc.) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là $1\mu\text{g/ml}$, lượng chất phủ là $100\mu\text{l/lỗ}$, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng $300\mu\text{l/lỗ}$, và sau đó ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đối chứng và mẫu kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người được pha loãng theo loạt trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng $100\mu\text{l}$ cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, $100\mu\text{l}$ kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, và sau đó đĩa được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng $100\mu\text{l/lỗ}$ và ủ

ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μl /lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người được xác định bằng thử nghiệm ELISA. PD-1 tái tổ hợp của người, CD28, CTLA4, ICOS, BTLA, PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H2 (tất cả đều là sản phẩm của Sino Biological Inc.) được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1 $\mu\text{g/ml}$, lượng chất phủ là 100 μl /lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 μl /lỗ và được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Kháng thể đối chứng và mẫu kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người đã được pha loãng trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào với lượng 100 μl cho mỗi lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Sau đó, 100 μl kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) đã được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung vào mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 μl /lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μl /lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.4, kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người có thể liên kết với PD-1 của người và PD-1 của khỉ với ái lực giống nhau, nhưng không liên kết với PD-1 của chuột và chuột nhắt cho thấy rằng nó có tính đặc hiệu loài. Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.5, kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người còn có tính đặc hiệu liên kết rất tốt, nó chỉ liên kết với PD-1 mà không liên kết với các thành viên khác của họ CD28 hoặc họ B7.

Ví dụ 5. Hoạt tính phong bế PD-1 và phối tử của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người

PD-1-Fc tái tổ hợp của người được phủ trên đĩa ELISA 96 lỗ có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6, nồng độ chất phủ là 1 $\mu\text{g/ml}$, lượng chất phủ là 100 μL /lỗ, và quá trình phủ được thực hiện ở nhiệt độ 4°C qua đêm.

Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST và khóa bằng PBST chứa 1% BSA với lượng 300 μl /lỗ và được ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Mẫu đối chứng dương và mẫu kháng thể kháng PD-1 của người được bổ sung với lượng 50 μl cho mỗi lỗ. Và sau đó PD-L1 đánh dấu bằng biotin được bổ sung ở nồng độ 20nM (nồng độ cuối 10nM), hoặc PD-L2 đánh dấu bằng biotin ở nồng độ 320nM (nồng độ cuối 160nM) với lượng 50 μl cho mỗi lỗ, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 90 phút. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Tiếp đó, Streptavidin-HRP (BD Pharmingen, mã sản phẩm trong catalog 554066) pha loãng ở tỷ lệ 1:1000 trong PBST chứa 1% BSA được bổ sung với lượng 100 μl /lỗ, ủ ở 25°C trong 1 giờ. Đĩa này được rửa năm lần bằng PBST. Chất nền so màu TMB được bổ sung với lượng 100 μl /lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μl /lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.6, kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người có hoạt tính phong bế PD-1/PD-L1 và PD-1/PD-L2 giống với hoạt tính của Pembrolizumab.

Ví dụ 6. Hoạt tính điều hòa chức năng tế bào T của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người

PBMC sử dụng trong thử nghiệm này là sản phẩm của Lonza, mã sản phẩm trong catalog CC-2702.

Cảm ứng tế bào DC bằng PBMC: PBMC được tái tạo hỗn dịch bằng môi trường đầy đủ (RPMI 1640 + 10% FBS), sau đó rửa một lần bằng môi trường không chứa huyết thanh; tế bào được tái tạo hỗn dịch trong môi trường không chứa huyết thanh, và cấy vào bình nuôi cấy tế bào, và sau đó ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ áp chứa 5% CO_2 . Sau 90 phút, tế bào không dính bám và môi trường được loại bỏ; bạch cầu đơn nhân dính bám được nuôi cấy trong môi trường đầy đủ chứa 100 ng/ml GM-CSF và 100 ng/ml IL-4, và môi trường được thay sau 3 ngày. Sau khi tế bào được nuôi cấy trong 3 ngày nữa, môi trường được thay bằng môi trường đầy đủ chứa 100 ng/ml GM-CSF, 100 ng/ml IL-4 và 20 ng/ml TNF-alpha và nuôi cấy trong một ngày nữa để hoàn thành quá trình cảm ứng tế bào DC. Tế bào T được phân lập từ PBMC có nguồn gốc cá thể khác: tế bào T được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T là sản phẩm của Miltenyi Biotech (mã sản phẩm trong catalog 5150414820) theo hướng dẫn

đối với quy trình thử nghiệm cụ thể. Tế bào DC trưởng thành đã được cảm ứng được cấy vào đĩa có 96 lỗ ở mật độ 10000 tế bào cho mỗi lỗ, và tế bào T phân lập được bổ sung ở mật độ 100000 tế bào cho mỗi lỗ; và sau đó mẫu cần thử nghiệm được bổ sung vào và ủ trong 120 giờ với nhau. Khi kết thúc quá trình ủ, dịch nổi bề mặt được thu hồi, và lượng IL-2 và IFN-gama (IFN- γ) được phát hiện bằng cách sử dụng kit ELISA là sản phẩm của RayBiotech.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.7, trong hệ MLR, kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người làm tăng mức độ tiết IL-2 và IFN-gama (IFN- γ) và có tác dụng điều hòa hoạt tính chức năng của tế bào T tương tự khi so sánh với Pembrolizumab.

Ví dụ 7. Nghiên cứu được động học của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người ở chuột

Chuột cái SD, 6 đến 8 tuần tuổi mua của Beijing Huafukang Biotechnology Co., Ltd. được sử dụng làm động vật thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột này được thích nghi với môi trường, chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm, mỗi nhóm ba con. Kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người và kháng thể đơn dòng đối chứng Pembrolizumab được sử dụng tương ứng ở liều 20 nmol/kg bằng cách tiêm một liều qua đường tĩnh mạch. Ở thời điểm 0, 5 phút, 30 phút, 1 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 120 giờ, 168 giờ, 216 giờ, 264 giờ, 312 giờ sau khi sử dụng, mẫu máu sau ổ mắt được lấy mà không chống đông, và mẫu máu này được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút đến 1 giờ; sau khi đông, mẫu máu được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút, mẫu huyết thanh thu được được đông lạnh ở nhiệt độ -80°C và bảo quản để thử nghiệm.

Nồng độ kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người và kháng thể đơn dòng đối chứng Pembrolizumab trong huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Nói một cách ngắn gọn, protein PD-1 tái tổ hợp của người được phủ lên đĩa ELISA có khả năng hấp phụ cao cùng với dung dịch đệm carbonat có độ pH=9,6 ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Đĩa này được rửa bằng PBST. Để ngăn sự liên kết không đặc hiệu, đĩa được khóa bằng PBST chứa 5% bột sữa không béo, và sau đó rửa bằng PBST. Sau đó, mẫu huyết thanh cần thử nghiệm được pha loãng bằng PBST chứa 10% huyết thanh chuột hỗn hợp và 1% BSA được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ, và đĩa được rửa bằng PBST. Kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu bằng

peroxidaza cây củ cải cay (Chemicon, mã sản phẩm trong catalog AP309P) pha loãng trong PBST chứa 5% bột sữa gầy được bổ sung vào, ủ ở nhiệt độ 25°C trong 1 giờ, sau đó đĩa được rửa bằng PBST. Cuối cùng, quá trình hiện màu được thực hiện bằng cách sử dụng chất nền so màu TMB ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Quá trình hiện màu được kết thúc bằng cách bổ sung dung dịch H_2SO_4 1M với lượng 100 μ l/lỗ. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đọc trên máy đọc vi đĩa.

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.8, một liều tiêm 20 nmol/kg qua đường tĩnh mạch của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người hoặc kháng thể đơn dòng đối chứng Pembrolizumab có đường cong nồng độ-thời gian và dữ liệu dược động học giống nhau ở chuột. Các thông số dược lý của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người là như sau: thời gian bán hủy $t_{1/2}$ là 212 giờ; diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian AUC_{0-312} giờ là 33967 nM.giờ; nồng độ ban đầu ước tính C_0 là 464nM; thể tích phân bố biểu kiến V_d là 118 ml/kg; mức độ thanh thải CL là 0,39 ml/giờ/kg; thời gian lưu trung bình $MRT_{cuối}$ cùng là 119 giờ.

Ví dụ 8. Hiệu quả kháng u của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người in vivo

Tác dụng ức chế quá trình sinh trưởng của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người đối với khối u ghép khác loài HCC827 được cấy vào chuột nhân hóa bằng PBMC được phát hiện trong ví dụ này.

Chuột cái suy giảm miễn dịch NCG, 6-8 tuần tuổi, mua của Nanjing Galaxy BioPharma Co., Ltd., được sử dụng làm chuột thử nghiệm. Một tuần sau khi chuột được thích nghi với môi trường, mỗi con chuột được cấy 1×10^7 tế bào ung phổi tế bào không nhỏ ở người HCC827 (sản phẩm của basic Medical Cell Center of the Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences). Khi kích thước khối u đạt tới khoảng 100mm³, chuột được chia thành các nhóm theo kích thước khối u, 6 con một nhóm, bao gồm nhóm đối chứng sử dụng dung môi, nhóm sử dụng kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người và nhóm sử dụng Pembrolizumab. Mỗi con chuột được tiêm tĩnh mạch 5×10^6 tế bào PBMC của người để nhân hóa hệ miễn dịch, và sau đó dung môi hoặc kháng thể được sử dụng theo kiểu nhóm, liều sử dụng là 70 nmol/kg qua đường trong màng bụng. Chuột được sử dụng hai lần một tuần trong ba tuần. Từ ngày sử dụng, kích thước khối u được đo ba lần một tuần, đường kính dài nhất “a” và chiều rộng “b” được đo, kích thước khối u được tính như sau:

$$(\text{mm}^3) = (a \times b^2)/2.$$

Kết quả là như được thể hiện trên Fig.9, kháng thể đơn dòng thể kháng PD-1 của người có hoạt tính kháng u và ức chế quá trình sinh trưởng của tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ HCC827 được ghép ở chuột được nhân hóa bằng PBMC, cho thấy rằng nó có hiệu quả kháng u tương đương hoặc mạnh hơn một chút so với hiệu quả kháng u của Pembrolizumab.

Ví dụ 9. Điều chế kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người

Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người được điều chế theo phương pháp của Leung và các đồng tác giả (Molecule Immunol, 1995, 32: 1413-27).

Khuôn nhân hóa phù hợp nhất với trình tự vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhất được chọn từ cơ sở dữ liệu Germline. Khuôn của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là IGKV3-11*01, trình tự của nó được nêu trong SEQ ID NO: 43; khuôn của vùng biến đổi chuỗi nặng là IGHV3-23*04, trình tự của nó được nêu trong SEQ ID NO: 44. Các vùng CDR của khuôn đã chọn của người được thay bằng các vùng CDR của kháng thể của chuột nhất. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể nhân hóa ghép thu được có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45, và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể nhân hóa ghép thu được có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46. Các vị trí trên SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 46 được chọn để gây đột biến ngược và vị trí NQS trên vùng CDR1 của SEQ ID NO: 45 được chọn để gây đột biến để loại bỏ vị trí glycosyl hóa có thể xảy ra. Trình tự vùng CDR-L1 thu được được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4; trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ thu được được nêu trong SEQ ID NO: 25 đến 36; trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng thu được được nêu trong SEQ ID NO: 37 đến 42. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 15) để thu được trình tự có chiều dài đầy đủ tương ứng của chuỗi nhẹ; vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO: 16) để thu được trình tự có chiều dài đầy đủ tương ứng của chuỗi nặng. Trình tự nhân hóa có thể sử dụng thu được bằng cách sàng lọc ái lực và độ ổn định. Sau khi sàng lọc ái lực và độ ổn định, thông tin về trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được của các trình tự nhân hóa được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3

VL	SEQ ID NO:
Kháng thể đơn dòng thể khảm	10
AH00290 / AH00291/ AH00296	25
AH00293	26
AH00294	27
AH00295 AH00298	28
AH00291-N26Q/ AH00296-N26Q	29
AH00291-N26S/ AH00296-N26S	30
AH00291-S28A/ AH00296-S28A	31
AH00294-N26Q	32
AH00294-N26S	33
AH00294-S28A	34
BMIII	35
BMIV	36

VH	SEQ ID NO:
Kháng thể đơn dòng thể khảm	14
AH00290	37
AH00291 / AH00293/ AH00298/ AH00291-N26Q/ AH00291-N26S/ AH00291-S28A	38
AH00294 /	39

AH00294-N26Q/ AH00294-N26S/ AH00294-S28A	
AH00295 / AH00296/ AH00296-N26Q/ AH00296-N26S/ AH00296-S28A	40
BMIII	41
BMIV	42

Ví dụ 10. Hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người in vitro

Hoạt tính sinh học in vitro của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người được xác định, bao gồm hoạt tính liên kết với PD-1 của người và hoạt tính ức chế đối với sự liên kết PD-1/PD-L1. Các trình tự nhân hóa được thử nghiệm bao gồm: AH00290, AH00291, AH00293, AH00294, AH00295, AH00296, AH00298, BMIII, BMIV, AH00290-N26Q, AH00291-N26S, AH00291-S28A, AH00294-N26Q, AH00294-N26S, AH00294-S28A, AH00296-N26Q, AH00296-N26S, AH00296-S28A; phương pháp xác định là phương pháp ELISA, và quy trình thử nghiệm cụ thể là giống như phương pháp xác định kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 4. So với kháng thể đơn dòng thể khảm kháng PD-1 của người nêu trên, tất cả các trình tự nhân hóa được thử nghiệm đều duy trì được hoạt tính khá tốt, cho thấy hoạt tính liên kết PD-1 mạnh và hoạt tính ức chế đối với sự liên kết PD-1/PD-L1.

Bảng 4. Hoạt tính liên kết với PD-1 và hoạt tính ức chế đối với sự liên kết PD-1/PD-L1 của kháng thể nhân hóa kháng PD-1 của người

Mẫu	Hoạt tính liên kết với PD-1 (EC ₅₀ , nM)	Hoạt tính ức chế PD-1/ PD-L1 (IC ₅₀ , nM)
Kháng thể đơn dòng thể khảm	0,031	1,453
AH00290	0,024	1,086
AH00291	0,025	1,105
AH00293	0,026	1,201
AH00294	0,032	1,350
AH00295	0,025	1,188
AH00296	0,027	1,207
AH00298	0,028	1,215
BMIII	0,034	1,197
BMIV	0,028	1,298
AH00291-N26Q	0,046	1,569
AH00291-N26S	0,039	1,431
AH00291-S28A	0,042	1,361
AH00294-N26Q	0,041	1,491
AH00294-N26S	0,043	1,479
AH00294-S28A	0,047	1,464
AH00296-N26Q	0,044	1,274
AH00296-N26S	0,037	1,066
AH00296-S28A	0,048	1,755

Ví dụ 11. Phát hiện độ tinh khiết và độ ổn định nhiệt của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người bằng phương pháp sắc ký chất lỏng tính năng cao loại trừ kích thước (Size-exclusion High-performance Liquid Chromatography: SE-HPLC)

Cột sắc ký TSKgel SuperSW3000 (mã sản phẩm trong Catalog: 0018675) được sử dụng. Pha động là 0,1mol/l dung dịch đệm phosphat (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄), 0,1 mol/l dung dịch đệm natri sulfat, độ pH =6,7; tốc độ dòng là 0,35 ml/phút; nhiệt độ cột

là 25°C; nhiệt độ khối mẫu là 4°C; bước sóng phát hiện là 280nm. Mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm mẫu tới 1 mg/ml, và thể tích bơm mẫu là 5µl. Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng thiết bị sắc ký chất lỏng tính năng cao Agilent 1260, và độ tinh khiết được tính bằng tỷ lệ phần trăm của đỉnh chính bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn hóa diện tích. Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người thu được ở trên được phân tích độ tinh khiết bằng phương pháp SE-HPLC. Để xác định độ ổn định nhiệt của các kháng thể đơn dòng này, các mẫu được để trong điều kiện nhiệt độ cao 40°C, và mẫu được phân tích bằng phương pháp SE-HPLC ở tuần thứ hai và tuần thứ 4 tương ứng để quan sát độ ổn định nhiệt, và kết quả là như được thể hiện trong bảng 5 dưới đây. Tất cả các kháng thể nhân hóa kháng PD-1 của người đều có độ ổn định tốt và đáng kể trừ AH00296-S28A.

Bảng 5. Độ ổn định nhiệt của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người ở 40°C xác định bằng phương pháp SE-HPLC

Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người	Độ tinh khiết theo phương pháp SE-HPLC (%)		
	T=0	Tuần 2	Tuần 4
BMIII	99,23	98,16	95,78
BMIV	98,19	98,42	94,80
AH00290	98,97	98,04	94,73
AH00291	99,30	98,22	95,87
AH00293	97,79	96,55	94,32
AH00294	98,77	97,68	96,52
AH00295	99,24	98,16	96,17
AH00296	99,63	98,55	96,73
AH00298	99,34	98,13	95,87
AH00291-N26Q	98,55	98,56	97,90
AH00291-N26S	99,05	99,08	98,50
AH00291-S28A	98,95	98,89	98,40
AH00294-N26Q	99,14	99,08	98,64
AH00294-N26S	99,23	99,19	98,64
AH00294-S28A	99,30	99,33	98,69
AH00296-N26Q	99,10	99,10	98,27

AH00296-N26S	99,60	99,59	98,96
AH00296-S28A	99,70	84,38	62,42

Ví dụ 12. Xác định chỉ số Tm của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người

Nhiệt độ nóng chảy (Tm) của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người được xác định bằng phương pháp đo huỳnh quang bằng cách quét vi phân (Differential Scanning Fluorimetry: DSF). DSF là phương pháp phát hiện quá trình biến chất do nhiệt của protein trong mẫu bằng cách lợi dụng sự thay đổi cường độ huỳnh quang của chất chỉ thị huỳnh quang để xác định nhiệt độ biến chất protein. Chất phản ứng sử dụng là thuốc nhuộm huỳnh quang protein màu da cam SYPRO (Sigma-Aldrich, Mỹ, mã sản phẩm trong catalog S5692; nồng độ 5000× trong DMSO). Máy PCR thời gian thực AB 7500 là sản phẩm của Applied Biosystems, Inc., Mỹ. Thuốc nhuộm huỳnh quang protein được pha loãng theo tỷ lệ 1:50 bằng dung dịch đệm mẫu và 1μl thuốc nhuộm đã pha loãng được trộn với 19μl dung dịch protein, nên tỷ lệ pha loãng cuối của thuốc nhuộm huỳnh quang là 1:1000. Thuốc nhuộm huỳnh quang đã pha loãng được bổ sung vào đĩa có 96 lỗ, và ba lỗ song song được ấn định cho mỗi mẫu. Đĩa được bịt kín bằng màng bịt kín quang học, ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 2 phút để loại bỏ bọt khí. Chương trình RT-PCR được đặt như sau: đường cong nóng chảy được đặt theo kiểu liên tục, khoảng nhiệt độ quét là 25 đến 99°C, tốc độ gia nhiệt là 1% (khoảng 1°C/phút), và sau đó là 25°C trong 2 phút. Dữ liệu được ghi trong quá trình gia nhiệt, nhóm sử dụng thuốc nhuộm chỉ báo được đặt là “ROX”, nhóm dập tắt được đặt là “không” và thể tích phản ứng là 20μl. Nồng độ mẫu là 1 mg/ml, và dung dịch so sánh là dung dịch đệm mẫu. Đường cong huỳnh quang và đạo hàm bậc nhất được vẽ đồ thị bằng cách sử dụng chương trình phần mềm Protein Thermal Shift™ phiên bản 1.3. Trong thử nghiệm DSF, nhiệt độ điểm giữa của đỉnh chuyển hóa thứ nhất của protein thường được cho là nhiệt độ biến tính của độ ổn định nhiệt của protein. Chỉ số Tm của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người được xác định và kết quả là như được thể hiện trong bảng 6 dưới đây. Tất cả các kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người đều có chỉ số Tm khá tốt.

Bảng 6. Chỉ số Tm của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người

Kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người	Chỉ số Tm
BMIII	70,7°C
BMIV	65,2°C
AH00290	66,5°C
AH00291	67,7°C
AH00293	69,1°C
AH00294	67,9°C
AH00295	70,5°C
AH00296	70,0°C
AH00298	67,9°C
AH00291-N26Q	68,5°C
AH00291-N26S	67,8°C
AH00291-S28A	68,8°C
AH00294-N26Q	66,6°C
AH00294-N26S	65,9°C
AH00294-S28A	68,4°C
AH00296-N26Q	67,6°C
AH00296-N26S	70,1°C
AH00296-S28A	69,1°C

Ví dụ 13. Phát hiện chất đồng phân mang điện tích của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation (Cation Exchange Chromatography: CEX)

Cột sắc ký trao đổi cation MabPac SCX-10 được sử dụng, 4mm × 250mm (mã sản phẩm trong Catalog: 78655). 20 mmol/l axit 2-(N-morpholin) etansulfonic (MES) (pH= 5,6) và 60 mmol/l natri clorua được sử dụng làm pha động A; 20 mmol/l MES (pH= 5,6) và 300 mmol/l natri clorua được sử dụng làm pha động B. Tốc độ dòng là 0,5 ml/phút; nhiệt độ cột là 25°C; nhiệt độ khối mẫu là 4°C; bước sóng phát hiện là 280nm; thể tích nạp mẫu là 50µl (1 mg/ml); quá trình rửa giải được thực hiện theo gradien tuyến tính từ 5 đến 50% trong 60 phút. Kết quả thử nghiệm được xử lý bằng hệ thống máy tính sắc ký chất lỏng tính năng cao Agilent 1260, và tỷ lệ phần trăm của

diện tích đỉnh được tính bằng phương pháp chuẩn hóa diện tích. Các kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người được phát hiện bằng phương pháp CEX. Để xác định độ ổn định hóa học của các kháng thể đơn dòng này, các mẫu nêu trên được để trong điều kiện nhiệt độ cao 40°C, và các mẫu được lấy ở tuần thứ hai và tuần thứ 4 tương ứng để phát hiện bằng phương pháp CEX, và sự thay đổi tỷ lệ của các biến thể mang điện tích được quan sát. Kết quả là như được thể hiện trong bảng 7. Tất cả các kháng thể nhân hóa kháng PD-1 của người có tỷ lệ tương đối thấp của các biến thể mang điện tích trừ AH00296-S28A.

Bảng 7. Sự thay đổi tỷ lệ các biến thể mang điện tích của kháng thể đơn dòng nhân hóa kháng PD-1 của người ở 40°C được xác định bằng phương pháp CEX

Mẫu	Sự thay đổi tỷ lệ của các biến thể mang điện tích					
	T=0			Tuần 2		
	Đỉnh chính (%)	Đỉnh axit (%)	Đỉnh bazơ (%)	Đỉnh chính (%)	Đỉnh axit (%)	Đỉnh bazơ (%)
BMI	68,2	18,2	13,6	64,0	22,8	13,2
BMIV	64,9	21,1	14,0	58,0	27,1	14,9
AH00290	65,6	20,1	14,3	61,5	25,8	12,7
AH00291	66,6	20,0	13,4	61,5	24,8	13,7
AH00293	69,2	20,7	10,1	62,6	26,7	10,7
AH00294	68,4	17,8	13,8	63,5	22,3	14,2
AH00295	65,8	17,3	16,9	59,1	24,8	16,1
AH00296	66,9	19,3	13,8	59,7	25,2	15,1
AH00298	66,1	19,4	14,5	62,7	22,2	15,1
AH00291-N26Q	77,2	8,8	14,0	73,8	10,8	15,4
AH00291-N26S	77,6	8,2	14,2	71,6	11,4	17,0
AH00291-S28A	74,6	8,5	16,9	71,9	10,4	17,9
AH00294-N26Q	74,9	7,7	17,4	71,1	10,8	18,1
AH00294-N26S	78,0	7,7	14,3	73,2	11,2	15,6
AH00294-S28A	77,9	7,2	14,9	73,8	7,2	14,9
AH00296-N26Q	78,8	7,4	13,8	72,6	12,4	14,9
AH00296-N26S	76,9	7,3	15,8	70,6	12,6	16,8
AH00296-S28A	78,1	7,4	14,5	54,2	22,9	23,0

Cuối cùng, cần hiểu rằng các phương án nêu trên chỉ được sử dụng để minh họa giải pháp kỹ thuật của sáng chế thay vì làm giới hạn nó; mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết dựa vào các phương án nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng các giải pháp kỹ thuật mô tả trong các phương án nêu trên có thể được cải biến hoặc một số hoặc tất cả các dấu hiệu kỹ thuật có thể được thay thế theo cách tương đương; và tuy nhiên các cải biến hoặc thay thế này sẽ không làm cho bản chất của các giải pháp kỹ thuật tương ứng đi chệch khỏi phạm vi của các giải pháp kỹ thuật của các phương án của sáng chế.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp: kháng thể và đoạn chức năng của nó theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với PD-1, và có thể được sử dụng để phòng và/hoặc điều trị bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh viêm khớp, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh Crohn, bệnh luput ban đỏ toàn thân, bệnh viêm cầu thận, bệnh giống bệnh cơ tim giãn, hội chứng Sjogren, bệnh viêm da tiếp xúc dị ứng, bệnh viêm đa cơ, bệnh xơ cứng bì, bệnh viêm đa động mạch quanh động mạch, bệnh thấp khớp, bệnh bạch biến, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, hội chứng Behcet và bệnh viêm tuyến giáp mạn tính), phản ứng miễn dịch chống lại mảnh ghép, bệnh dị ứng, bệnh nhiễm trùng, bệnh thoái hóa thần kinh (ví dụ, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh Machado-Joseph, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh Creutzfeldt-Jakob) và khối u (ví dụ, bệnh bạch cầu, u limphô, u tủy, u não, bệnh caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh caxinom mũi họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh sacôm tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh caxinom tế bào thận, và u melanin) v.v..

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 hoặc đoạn chức năng của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi nhẹ CDR gồm có CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3;

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm chuỗi nặng CDR gồm có CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3;

các trình tự axit amin của CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 1, 5 và 6, hoặc lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 2, 5 và 6, hoặc lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 3, 5 và 6, hoặc lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 4, 5 và 6; và

các trình tự axit amin của CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 7, 8 và 9.

2. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự vùng hằng định bất kỳ được chọn từ nhóm gồm có IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE và IgD của người.

3. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó đoạn chức năng được chọn từ nhóm gồm có F(ab')₂, Fab', Fab, và đoạn Fv, hoặc trong đó kháng thể này là kháng thể scFv.

4. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 14, hoặc lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 14, hoặc lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 14, hoặc lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14.

5. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó vùng khung chuỗi nhẹ của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm FR-L1, FR-L2, FR-L3 và FR-L4, và vùng khung chuỗi nặng của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm FR-H1, FR-H2, FR-H3 và FR-H4;

FR-L1 được chọn từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17 nhưng có một hoặc nhiều sự thể đoạn sau đây:

- axit amin thứ 1 D được thay thế bằng E;
- axit amin thứ 2 V được thay thế bằng I;
- axit amin thứ 13 L được thay thế bằng Y; và
- axit amin thứ 19 A được thay thế bằng V;

FR-L2 được chọn từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18 nhưng có một hoặc nhiều sự thể đoạn sau đây:

- axit amin thứ 6 P được thay thế bằng S;
- axit amin thứ 7 G được thay thế bằng H; và
- axit amin thứ 9 A được thay thế bằng S;

FR-L3 được chọn từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19 nhưng có một hoặc nhiều sự thể đoạn sau đây:

- axit amin thứ 22 L được thay thế bằng V;
- axit amin thứ 24 P được thay thế bằng T;
- axit amin thứ 28 A được thay thế bằng G; và
- axit amin thứ 31 F được thay thế bằng Y;

FR-L4 được chọn từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20 nhưng có axit amin thứ 7 Y được thay thế bằng L;

FR-H1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21;

FR-H2 được chọn từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 22 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 22 nhưng có một hoặc nhiều sự thể đoạn sau đây:

- axit amin thứ 5 A được thay thế bằng T; và
- axit amin thứ 14 A được thay thế bằng S;

FR-H3 được chọn từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23 và trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23 nhưng có một hoặc nhiều sự thể đoạn sau đây:

axit amin thứ 12 N được thay thế bằng T;

axit amin thứ 14 Y được thay thế bằng H; và

axit amin thứ 18 N được thay thế bằng S; và

FR H4 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24.

6. Phân tử axit nucleic đã phân tách được chọn từ:

A) ADN hoặc ARN, mã hóa kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1; và

B) axit nucleic bổ trợ cho axit nucleic như được xác định ở A).

7. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1.

8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó được liên kết với ít nhất một tác nhân chẩn đoán và/hoặc tác nhân điều trị để tạo thành thể liên hợp miễn dịch.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó ít nhất một tác nhân chẩn đoán được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, chất tương phản phóng xạ, ion thuận từ, kim loại, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang hóa học, tác nhân tương phản siêu âm, và chất cảm quang.

10. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó ít nhất một tác nhân điều trị được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể trần, chất gây độc tế bào, dược chất, chất đồng vị phóng xạ, nguyên tử bo, chất điều biến miễn dịch, chất chống sự chết tế bào theo chương trình, thuốc điều trị cảm quang, thể liên hợp miễn dịch và oligonucleotit.

11. Thuốc điều trị một hoặc nhiều khối u, chứa kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, và chất mang được dụng;

trong đó một hoặc nhiều khối u được chọn từ nhóm gồm có bệnh bạch cầu, u lympho, u tủy, u não, caxinom tế bào vảy vùng đầu và cổ, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, caxinom mũi họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh sarcom tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, caxinom tế bào thận, và u melanin.

12. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể nhân hóa.
13. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể thể khảm.
14. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép.
15. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 1, trong đó các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16.
16. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 25 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 37.
17. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 25 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 38.
18. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 29 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 38.
19. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 30 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 38.
20. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 31 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 38.
21. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 26 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 38.
22. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 28 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 40.

23. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 25 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 40.
24. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 29 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 40.
25. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 30 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 40.
26. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 31 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 40.
27. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 28 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 38.
28. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 27 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 39.
29. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 32 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 39.
30. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 33 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 39.
31. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 34 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 39.
32. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 35 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 41.

33. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 36 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 42.

34. Kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 5, trong đó kháng thể này hoặc đoạn chức năng của nó bao gồm vùng hằng định chuỗi nhẹ gồm SEQ ID NO: 15 và vùng hằng định chuỗi nặng gồm SEQ ID NO: 16.

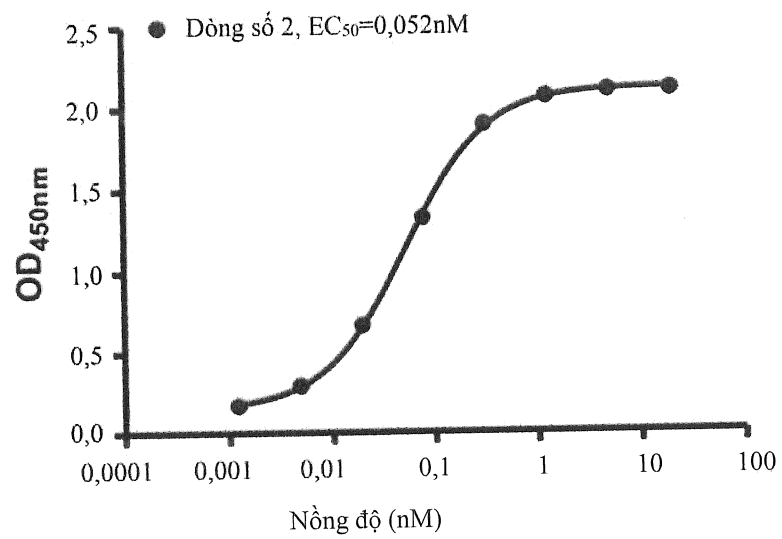


Fig.1

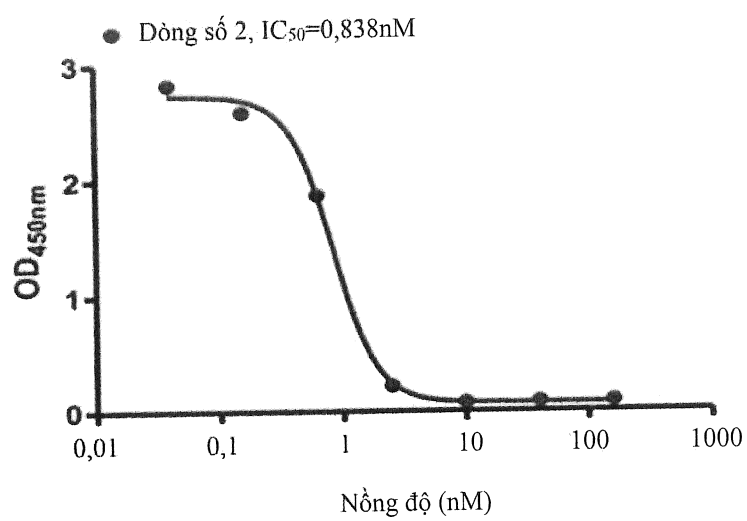


Fig.2

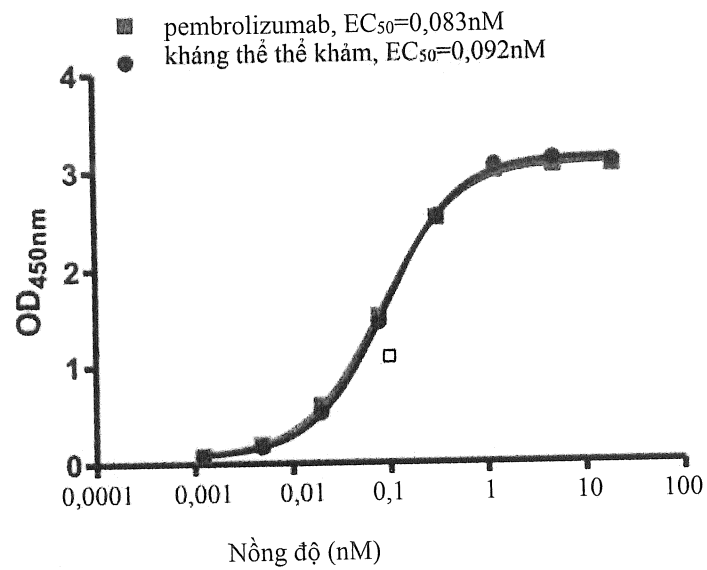


Fig.3

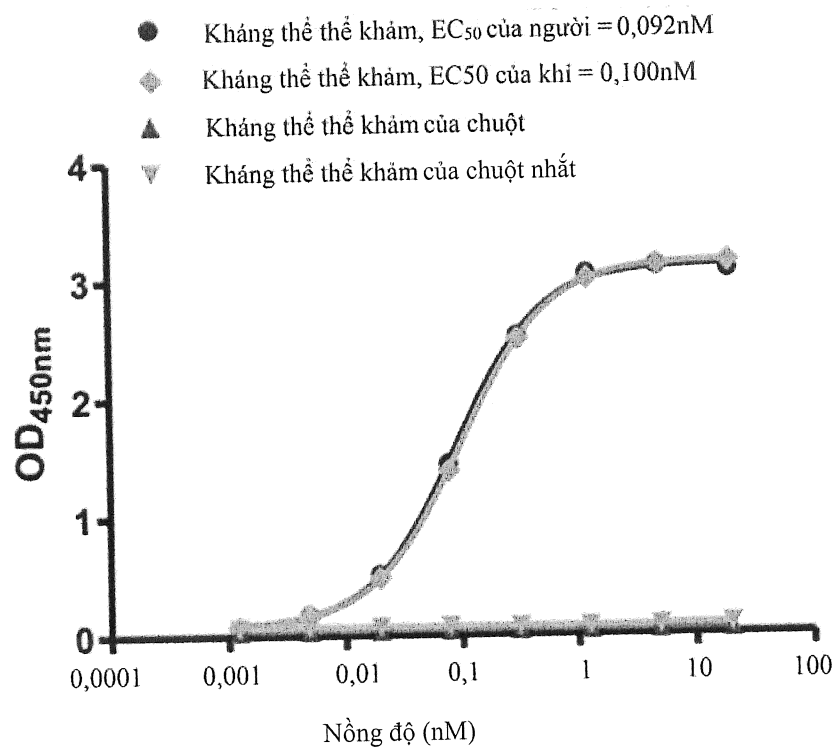
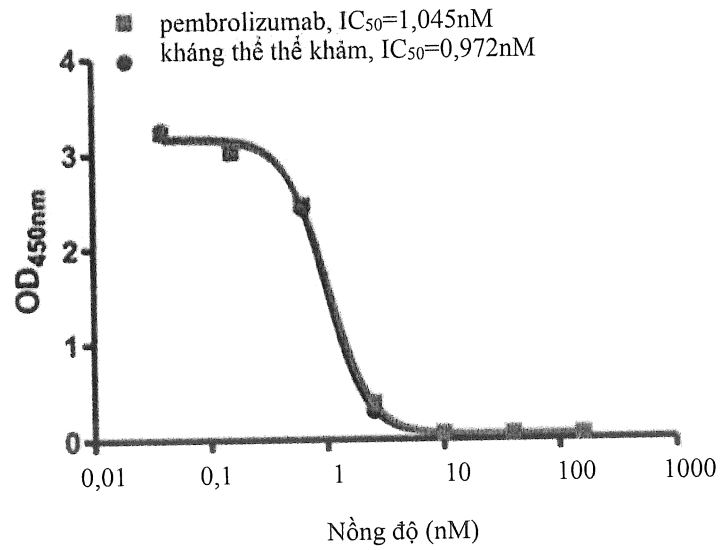


Fig.4

Hoạt tính ức chế PD-1/PD-L1



Hoạt tính ức chế PD-1/PD-L2

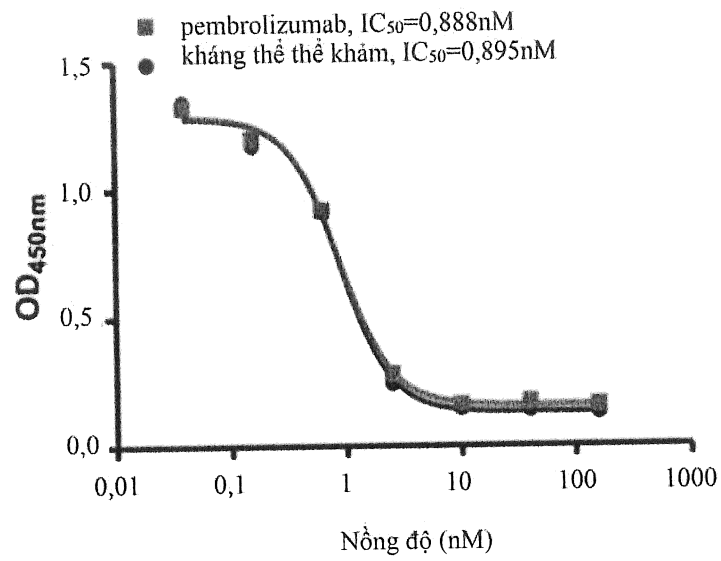


Fig.6

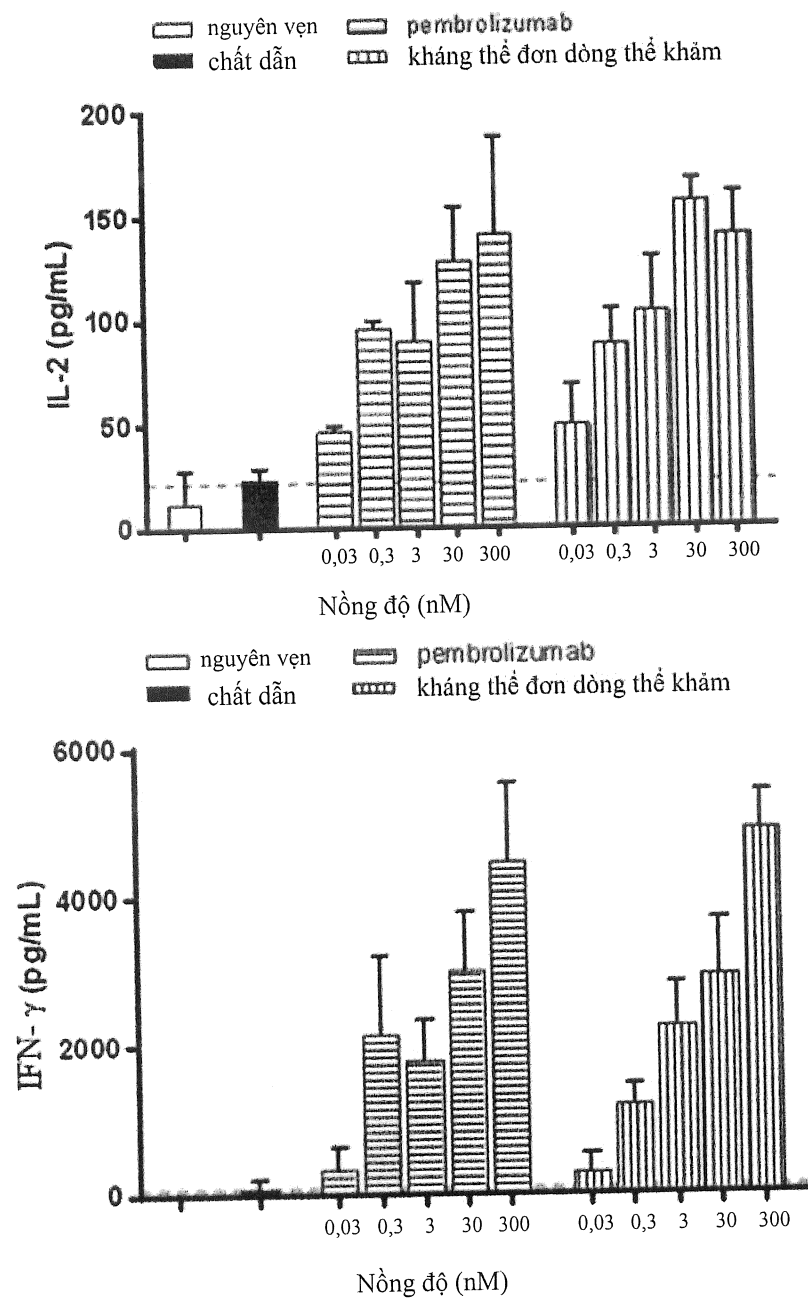


Fig.7

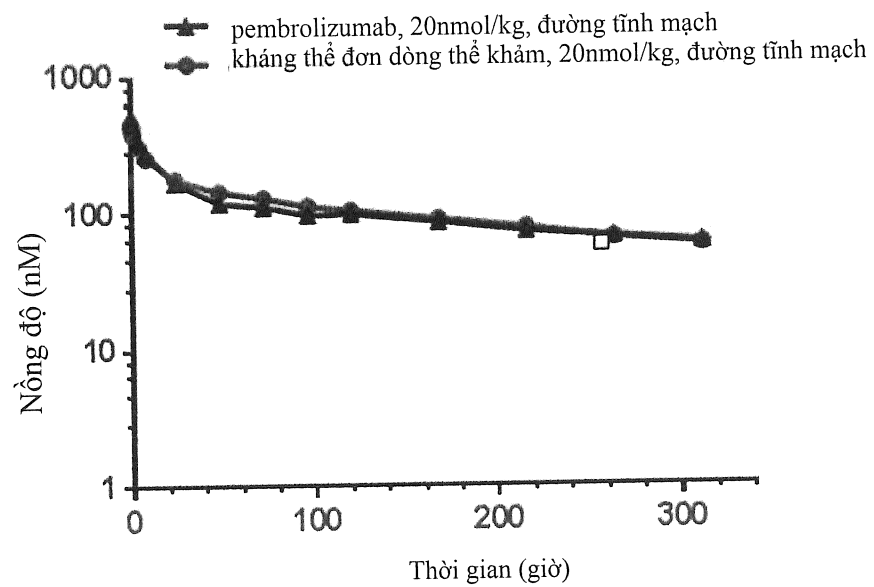


Fig.8

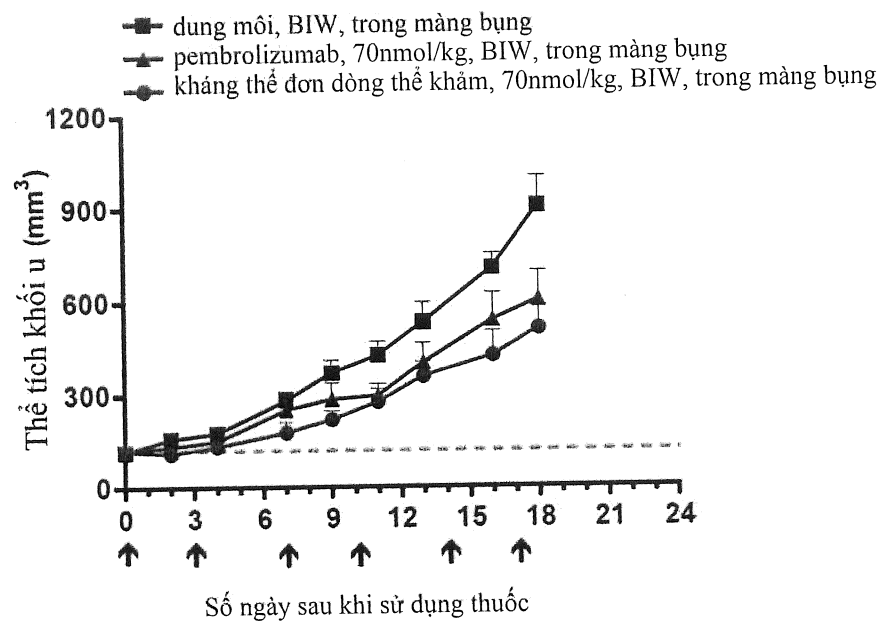


Fig.9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> BEIJING HANMI PHARM. CO., LTD.
 <120> Kháng thể liên kết đặc hiệu với PD-1 và đoạn chức năng của nó, chế phẩm và thuốc chứa kháng thể này
 <150> CN 201610827099.1
 <151> 2016-09-14
 <150> PCT/CN2017/101082
 <151> 2017-09-08
 <160> 46
 <170> Phiên bản PatentIn 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <400> 1
 Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <400> 2
 Arg Ala Gln Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <400> 3
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <400> 4
 Arg Ala Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <400> 5
 Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 6

Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 8

Ser Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 9

Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 10

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 11

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Gln Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 12

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 13

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

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 15

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> 16
<211> 327
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 16

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

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

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

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <400> 17

Asp Val 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
20

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Arg
1 5 10 15

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 19

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 20

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 21

Glu Val Asn 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
20 25

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 22

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Asn Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 24

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 28

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gln Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 32

Asp Val 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 Gln Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 33

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 34

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 35

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

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

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

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 36

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Arg Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 37
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 37

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
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 Tyr Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 38

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Asn 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 Tyr Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 39

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Asn 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 Tyr Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 40

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 41

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Asn 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 Tyr Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 96

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 43

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

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

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

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

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

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

<210> 44

<211> 99

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<221> đặc điểm khác
 <222> (99)..(99)
 <223> xaa có thể là axit amin tự nhiên bất kỳ

<400> 44

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Xaa

<210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

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

Tyr Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

<210> 46
 <211> 117
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<400> 46

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
 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 Glu Tyr Phe Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115