



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

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



1-0036585

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2018-01015

(22) 11/08/2016

(86) PCT/CN2016/094624 11/08/2016

(87) WO2017/025051 A1 16/02/2017

(30) PCT/CN2015/086594 11/08/2015 CN; PCT/CN2016/071314 19/01/2016 CN

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/09/2018 366A

(73) 1. WUXI BIOLOGICS (CAYMAN) INC. (KY)

PO Box 309, Ugland House, Grand Cayman, KY1-1104, Cayman Islands

2. OPEN MONOCLONAL TECHNOLOGY, INC. (US)

3911 Sorrento Valley Road, Suite 110, San Diego, California 92121, United States of America

(72) ZHENG Yong (CN); LI Jing (US); CHEN Zhisheng (CN).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1, PHƯƠNG PHÁP BIỂU HIỆN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng protein làm chết tế bào được lập trình 1 (PD-1), mà có thể ngăn chặn việc liên kết phối tử PD-1 với PD-1, và do đó ngăn chặn chức năng ức chế của phối tử PD-1 trên tế bào T biểu hiện PD-1. Kháng thể của sáng chế cung cấp tác nhân rất mạnh để điều trị nhiều bệnh ung thư thông qua việc điều biến chức năng miễn dịch của người.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế này liên quan đến kháng thể kháng PD-1 mới.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Càng ngày càng có nhiều bằng chứng từ kết quả cận lâm sàng và lâm sàng cho thấy rằng việc đặt đích nhằm vào các điểm kiểm soát đáp ứng miễn dịch đang trở thành một hướng tiếp cận hứa hẹn nhất để chữa trị bệnh nhân ung thư. Sự chết tế bào được lập trình 1, một trong các điểm kiểm soát đáp ứng miễn dịch protein, đóng một vai trò chính trong việc hạn chế hoạt động của tế bào T mà cung cấp cơ chế đề kháng quan trọng nhờ đó mà tế bào khối u thoát khỏi giám sát miễn dịch. Sự tương tác của PD-1 biểu hiện trên các tế bào T hoạt hóa, và PD-L1 biểu hiện trên các tế bào ung thư điều hòa tiêu cực đáp ứng miễn dịch và kìm hãm miễn dịch kháng ung thư. Biểu hiện của PD-L1 trên khối u tương quan với tỷ lệ sống sót trong thực quản, tụy và các dạng ung thư khác, làm nổi bật hoạt động này là một mục tiêu hứa hẹn cho liệu pháp miễn dịch khối u. Nhiều tác nhân đặt đích nhằm vào quá trình PD-1 đã được phát triển bởi các công ty dược phẩm, chẳng hạn như Bristol-Myers Squibb (BMS), Merck, Roche và GlaxoSmithKline (GSK). Dữ liệu từ các thử nghiệm lâm sàng thể hiện các bằng chứng sớm của hoạt động lâm sàng lâu bền và đặc trưng an toàn đáng khích lệ ở những bệnh nhân với các loại khối u khác nhau. Nivolumab, một loại thuốc PD-1 do BMS phát triển hiện đang là tâm điểm của thế hệ tiếp theo. Hiện tại, trong 6 nghiên cứu giai đoạn cuối, phương pháp điều trị thúc đẩy sự thu nhỏ lại của khối u ở ba trong số năm nhóm ung thư được nghiên cứu, trong đó có 18% trong số 72 bệnh nhân ung thư phổi, gần một phần ba trong số 98 bệnh nhân u hắc tố và 27% trong số 33 bệnh nhân bị ung thư thận. Được phát triển bởi Merck, pembrolizumab là một kháng thể IgG4 đơn dòng hoàn toàn của người tác động kháng PD-1, giành được FDA chỉ định là sản phẩm đột phá mới sau khi thông qua dữ liệu giai đoạn IB ấn tượng dành cho ung thư da.

Các kết quả từ một nghiên cứu giai đoạn IB đã cho thấy một phản ứng khối u đạt mục tiêu ở 51% trong số 85 bệnh nhân ung thư và đáp ứng hoàn toàn ở 9% bệnh nhân. Máy thí nghiệm MPDL3280A của Roche đã cho thấy được khả năng làm nhỏ lại khối u ở 29 trong số 140 (21%) bệnh nhân có ung thư giai đoạn sau với các khối u kích thước khác nhau.

Tuy nhiên, những liệu pháp hiện tại có thể không thỏa mãn hoàn toàn và vì thế vẫn cần các kháng thể kháng PD-1 mới.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bộ lộ này cung cấp kháng thể kháng PD-1 mới (đặc biệt là các kháng thể hoàn chỉnh của người), các polynucleotit mã hóa và phương pháp sử dụng kháng thể này.

Theo một khía cạnh, bộ lộ này cung cấp kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 của người tại trị số K_d không quá 10^{-8} M (ví dụ như không quá $\leq 9 \times 10^{-9}$ M, $\leq 8 \times 10^{-9}$ M, $\leq 7 \times 10^{-9}$ M, $\leq 6 \times 10^{-9}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, hoặc $\leq 10^{-9}$ M) như được đo bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó kết hợp với PD-1 ở khi tại nồng độ EC_{50} tối đa 100nM hoặc tối đa 10nM (ví dụ tối đa 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, hoặc 1nM). Theo các phương án nhất định, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó không liên kết với PD-1 của chuột mà liên kết với PD-1 của khi với ái lực liên kết tương tự như ái lực đối với PD-1 của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể ức chế việc liên kết của PD-1 của người hoặc khi với phối tử của nó (ví dụ PD-L1 hoặc PD-L2), tại nồng độ IC_{50} tối đa 100nM (ví dụ tối đa 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, 1 nM, 0,9nM, 0,8nM, 0,7nM, 0,6nM, 0,5nM, 0,4nM, 0,3nM, 0,2nM, hoặc 0,1nM). Theo các phương án nhất định, nồng độ EC_{50} hoặc IC_{50} được đo bằng phân tích phân loại tế bào huỳnh quang kích hoạt (FACS).

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đã làm giảm đáng kể chức năng tác động. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó không tạo ra ADCC hoặc CDC hoặc cả hai.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này chứa trình tự CDR của chuỗi nặng được chọn từ nhóm chứa trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 13, 15, 21, 23, 25, 33, 35 và 37.

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được cung cấp trong tài liệu này chứa trình tự CDR của chuỗi nhẹ được chọn có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 7, 9, 11, 17, 19, 27, 29, 31, 39, 41, 43 và 65.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu CDR được lựa chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 và 11; hoặc được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 13, 15, 5, 7, 17 và 11; hoặc được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 1, 15, 5, 7, 17 và 19; hoặc được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 1, 15, 5, 7, 17, và 65; hoặc được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 21, 23, 25, 27, 29 và 31; hoặc được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41 và 43.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, và/hoặc SEQ ID NO: 5;
- b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5;
- c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5;

d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, và/hoặc SEQ ID NO: 25; và

e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, và/hoặc SEQ ID NO: 37.

Trong các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, và/hoặc SEQ ID NO: 11;

b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 11;

c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 19;

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, và/hoặc SEQ ID NO: 31;

e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, và/hoặc SEQ ID NO: 43; Và

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 65.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, và/hoặc SEQ ID NO: 11;

b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 11;

c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 19;

d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO 23, và/hoặc SEQ ID NO: 25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO 29, và / hoặc SEQ ID NO: 31;

e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, và/hoặc SEQ ID NO: 37; và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, và/hoặc SEQ ID NO: 43; hoặc

f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 65.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO 57 và SEQ ID NO: 61.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được cung cấp trong tài liệu này chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO: 63 và SEQ ID NO: 67.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47;

b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51;

c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55;

d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59;

e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63; hoặc

f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67.

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp trong tài liệu này bao gồm, ví dụ, 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này cạnh tranh cho cùng epitop với các kháng thể 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, hoặc 1.153.7 hAb. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cung cấp trong tài liệu này liên kết với epitop chứa ít nhất một trong các phần dư axit amin sau đây của PD-1: V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 và Q133.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng chặn việc liên kết PD-1 với phối tử của nó và do đó cung cấp ít nhất một trong các hoạt động sau:

- a) tạo ra sự sản xuất của IL-2 trong tế bào T CD4⁺;
- b) tạo ra sự sản xuất của IFN γ trong tế bào T CD4⁺;
- c) tạo ra sự phát triển của tế bào T CD4⁺ và
- d) đảo ngược chức năng ức chế của T reg.

Theo các phương án nhất định, kháng thể được cung cấp trong tài liệu này là kháng thể đơn dòng, kháng thể hoàn toàn của người, kháng thể được người hóa, kháng thể khảm, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể chimeric, kháng thể được dán nhãn, kháng thể hai hóa trị, hoặc kháng thể kháng idiotypic. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người, được sản xuất sử dụng chuột chuyển gen, ví dụ như chuột chuyển gen có biểu hiện nội sinh không được kích hoạt của gen globulin miễn dịch của chuột và mang các globulin miễn dịch của người tái tổ hợp có sự mất J-locu và có đột biến C-kappa.

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này là kháng thể đơn miền được lacer hóa, đoạn kháng

thể đôi, scFv, dime scFv, BsFv, dsFv, (dsFv) 2, dsFv-dsFv', mảnh Fv, Fab, Fab', F(ab') 2, đoạn kháng thể đôi ds, kháng thể siêu vi, kháng thể miễn hoặc kháng thể miễn hai hóa trị.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này chứa thêm vùng cố định globulin miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được cung cấp trong tài liệu này chứa thêm chất cộng hợp.

Theo các phương án nhất định, liên hợp có thể là một nhân có thể phát hiện được, phân tử với đặc tính điều chỉnh được động học, hoặc phân tử có đặc tính tinh sạch.

Trong một khía cạnh khác, sáng chế này cung cấp các polynucleotit đã được phân lập mã hóa các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được cung cấp trong tài liệu này. Theo các phương án nhất định, các polynucleotit được đề xuất mà mã hóa trình tự axit amin của các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được trình bày trong tài liệu này. Theo các phương án nhất định khác, vật truyền được cung cấp chứa các polynucleotit này, và theo các phương án nhất định khác, tế bào chủ được cung cấp chứa các vật truyền này. Theo các phương án nhất định, các phương pháp được sử dụng để biểu hiện một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này thông qua việc nuôi cấy các tế bào chủ trong điều kiện trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được mã hóa bởi các polynucleotit được biểu hiện từ vật truyền. Theo các phương án nhất định, polynucleotit được cung cấp trong tài liệu này được kết hợp với vùng khởi động như vùng khởi động SV40 trong vật truyền. Theo các phương án nhất định, tế bào chủ chứa các vật truyền cung cấp trong tài liệu này là tế bào buồng trứng của chuột lang Trung Quốc, hoặc tế bào 293F.

Trong khía cạnh khác, bộc lộ này cung cấp bộ kit chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Trong khía cạnh khác, kháng thể PD-1 được cung cấp trong tài liệu này, ví dụ như 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, và

1.153.7 hAb có khả năng dung nạp tốt và hoạt tính chống khối u trong cơ thể động vật cao. Theo các phương án nhất định, con vật mang tế bào khối u sử dụng kháng thể PD-1 được cung cấp trong tài liệu này đã giảm khối lượng khối u ít nhất là 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% so với động vật có khối lượng khối u tương tự nhưng chỉ sử dụng tá dược.

Trong một khía cạnh khác, bộc lộ này cung cấp phương pháp điều trị tình trạng liên quan đến PD-1 trong cá nhân, bao gồm: sử dụng trên cá nhân một lượng hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này. Theo các phương án nhất định, cá thể đã được xác định là có rối loạn hoặc một tình trạng có khả năng cao sẽ phản ứng với chất đối vận PD-1. Theo các phương án nhất định, cá nhân đã được xác định là dương tính đối với một mức hiện có hoặc mức tăng cường điều chỉnh của PD-L1 trong một mẫu thử nghiệm sinh học từ cá nhân.

Trong một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được cung cấp trong tài liệu này và một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Theo các phương án nhất định này, các chất mang dược dụng có thể là, ví dụ, chất pha loãng, chất chống oxy hoá, chất phụ gia, chất tẩy rửa, hoặc các chất phụ gia không độc hại.

Trong một khía cạnh khác, bộc lộ này cung cấp các phương pháp điều trị tình trạng trong đối tượng mà hưởng lợi từ việc tăng cường điều chỉnh đáp ứng miễn dịch, bao gồm việc sử dụng một lượng hiệu quả điều trị kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng đã có sự tăng cường điều chỉnh biểu hiện của PD-L1, hoặc đã được xác định là dương tính với biểu hiện PD-L1.

Việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được cung cấp trong tài liệu này trong sản xuất dược phẩm để điều trị một tình trạng có thể hưởng lợi từ việc tăng cường điều chỉnh đáp ứng miễn dịch. Theo các phương án nhất định, tình trạng là bệnh ung thư hoặc nhiễm virus mãn tính.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 cho thấy việc liên kết của kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn với tế bào CHO biểu hiện PD-1 biểu hiện tế bào CHO được đo bằng phân tích phân loại tế bào huỳnh quang kích hoạt (FACS).

Hình 2 cho thấy việc liên kết của kháng thể PD-1 ở người hoàn toàn với tế bào CHO biểu hiện PD-1 tại nồng độ EC_{50} khoảng 2nM được đo bằng phân tích FACS.

Hình 3 là việc liên kết của kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn với PD-1 biểu hiện trên tế bào T $CD4^+$ hoạt hóa được đo bằng phân tích FACS.

Hình 4 cho thấy rằng kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn ức chế liên kết của PD-L1 với PD-1 được chuyển nhiễm tế bào CHO với nồng độ IC_{50} nằm trong khoảng từ 3 đến 8 nM được đo bằng phân tích FACS.

Hình 5 cho thấy rằng kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn liên kết đặc hiệu với PD-1, nhưng không liên kết với thành viên họ CD28 và CTLA4, được đo bằng phân tích FACS.

Hình 6 cho thấy kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn kháng việc liên kết PD-1 với PD-1 ở khi đuôi dài nhưng không kháng việc liên kết PD-1 ở chuột.

Hình 7 là đo lường động học hoàn chỉnh của ái lực liên kết của kháng thể PD-1 với PD-1 ở người nằm trong khoảng từ $3.76E-9$ đến $1.76E-10$ mol/L như được xác định qua cộng hưởng Plasmon bề mặt.

Hình 8 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn đối với sản phẩm IL-2 trong phản ứng hỗn hợp u bạch huyết (MLR).

Hình 9 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn đối với sản phẩm IFN γ trong phản ứng MLR.

Hình 10 cho thấy kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn thúc đẩy sự phát triển tế bào T trong phản ứng MLR.

Hình 11 cho thấy kháng thể kháng PD-1 ở người hoàn toàn thúc đẩy sự phát triển trong phản ứng tế bào T đặc hiệu.

Hình 12 cho thấy kháng thể kháng PD-1 đảo ngược chức năng ức chế của tế bào T điều hòa (Treg).

Hình 13 cho thấy kháng thể kháng PD-1 thiếu ADCC trên tế bào T hoạt hóa.

Hình 14 cho thấy kháng thể kháng PD-1 thiếu CDC trên tế bào T hoạt hóa.

Hình 15 cho thấy rằng 1.103.11-v2 hAbs trong chất đệm khác nhau liên kết với miền ngoại bào PD-1 ở người với ái lực giống nhau được đo bằng kỹ thuật ELISA. “1.103.11-v2 hAb trong chất đệm” dùng để chỉ kháng thể trong chất đệm theo chế phẩm đệm, và “1.103.11-v2 hAb trong PBS” dùng để chỉ kháng thể trong 1x dung dịch muối đệm phosphat, độ pH 7,4.

Hình 16 cho thấy 1.103.11-v2 hAbs trong chất đệm khác nhau liên kết với tế bào CHO biểu hiện PD-1 với ái lực giống nhau được đo bằng phân tích FACS. “1.103.11-v2 hAb trong chất đệm” dùng để chỉ kháng thể trong chất đệm theo chế phẩm đệm, và “1.103.11-v2 hAb trong PBS” dùng để chỉ kháng thể trong 1x dung dịch muối đệm phosphat, độ pH 7,4.

Hình 17 cho thấy điểm nóng phần dư (vùng màu đen) trên cấu trúc tinh thể của PD-L1 ở người mà kháng thể liên kết vào. A cho thấy điểm nóng phần dư thông thường, B đến D cho thấy điểm nóng phần dư cho lần lượt 1.103.11 hAb, Keytruda and 11.148.10 hAb.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mô tả sau đây của bộ lộ chỉ nhằm mục đích minh họa các phương án khác nhau của bộ lộ này. Do đó, các sửa đổi cụ thể được thảo luận không nên được hiểu là những hạn chế về phạm vi của sáng chế. Sẽ rõ ràng với các chuyên gia trong lĩnh vực rằng các điều tương tự, các thay đổi và các sửa đổi khác nhau có thể được đưa ra mà không phải rời khỏi phạm vi sáng chế, và được hiểu rằng các phương án tương tự được đưa vào tài liệu này. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong tài liệu này, bao gồm các ấn phẩm, bằng sáng chế và các ứng dụng bằng sáng chế được dẫn chiếu toàn bộ và đưa vào tài liệu này.

Các định nghĩa

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng trong tài liệu này bao gồm bất kỳ globulin miễn dịch, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể liên kết

nhiều kháng nguyên hoặc kháng thể đặc hiệu kép (hai hóa trị) liên kết với một kháng nguyên đặc hiệu. Một kháng nguyên nguyên bản chứa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Mỗi chuỗi nặng chứa một vùng biến đổi và một vùng cố định thứ nhất, thứ hai và thứ ba, trong khi mỗi chuỗi nhẹ bao gồm một vùng biến đổi và một vùng cố định. Chuỗi nặng của động vật có vú được phân loại là α , δ , ϵ , γ , và μ , và các chuỗi nhẹ của động vật có vú được phân loại là λ hoặc κ . Kháng thể có dạng "Y", với chân của Y bao gồm các vùng cố định thứ hai và thứ ba của hai chuỗi nặng liên kết lại với nhau thông qua liên kết disulfit. Mỗi cánh tay của Y bao gồm vùng biến đổi và vùng cố định đầu tiên của chuỗi nặng duy nhất liên kết với vùng biến đổi và hằng định của một chuỗi nhẹ duy nhất. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng là tác nhân cho liên kết kháng nguyên. Vùng biến đổi trong cả hai chuỗi thường chứa ba vùng độ biến thiên cao được gọi là các vùng hỗ trợ xác định (CDRs) (chuỗi nhẹ (L) CDRs bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3, và chuỗi nặng (H) CDR bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3). Các ranh giới CDR đối với các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được trình bày trong tài liệu này có thể được định nghĩa hoặc xác định bằng các quy ước của Kabat, Chothia, hoặc Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. và Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Ba CDR được đặt giữa các đoạn tiếp giáp gọi là các vùng khung (FRs), được giữ tốt hơn các CDR và tạo ra một khung sinh học để hỗ trợ các vùng siêu bền. Các vùng cố định của chuỗi nặng và nhẹ không liên quan đến sự liên kết kháng nguyên, nhưng biểu hiện các chức năng tác động khác nhau. Các kháng thể được phân thành các lớp dựa trên trình tự axit amin của vùng cố định của chuỗi nặng của chúng. Năm lớp chính hoặc các isotype của các kháng thể bao gồm IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, được đặc trưng bởi sự có mặt của các chuỗi nặng α , δ , ϵ , γ và μ tương ứng. Một vài lớp kháng thể chính được chia thành các lớp phụ như IgG1 (chuỗi nặng γ 1), IgG2 (chuỗi nặng γ 2), IgG3 (chuỗi nặng γ 3), IgG4 (chuỗi nặng γ 4), IgA1 (chuỗi nặng α 1), or IgA2 (chuỗi nặng α 2).

Thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một mảnh kháng thể được tạo thành từ một phần của một kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR hoặc bất kỳ mảnh kháng thể nào khác liên kết với một kháng nguyên nhưng không bao gồm cấu trúc kháng thể tự nhiên nguyên bản. Các ví dụ về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không hạn chế, trong số đoạn kháng thể đôi, Fab, Fab', F(ab')₂, mảnh Fv, mảnh Fv ổn định sulfua (dsFv), (dsFv)₂, dsFv (dsFv-dsFv') đặc hiệu kép, đoạn kháng thể đôi ổn định sulfua (đoạn kháng thể đôi ds), phân tử kháng thể đơn chuỗi (scFv), scFv dime (đoạn kháng thể đôi hai hoá trị), kháng thể liên kết nhiều kháng nguyên, kháng thể đơn miền được lacer hóa, kháng thể siêu vi, kháng thể miền và kháng thể miền hóa trị hai. Mảnh liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với cùng một kháng nguyên mà kháng thể mẹ liên kết với. Theo các phương án nhất định, mảnh kháng thể có thể chứa một hoặc nhiều CDR từ một kháng thể cụ thể của người được cấy vào vùng khung từ một hoặc nhiều kháng thể khác nhau của người.

"Fab" đối với kháng thể đề cập đến phần kháng thể chứa một chuỗi nhẹ duy nhất (cả vùng biến đổi và vùng cố định) liên kết với vùng biến đổi và vùng cố định thứ nhất của chuỗi nặng bằng một liên kết disulfua.

"Fab'" đề cập đến mảnh Fab chứa một phần của khu vực bản lề.

"F(ab')₂" đề cập đến dime của Fab'.

"Fc" liên quan đến kháng thể đề cập đến phần kháng thể bao gồm các vùng cố định thứ hai và thứ ba của chuỗi nặng thứ nhất liên kết với các vùng cố định thứ hai và thứ ba của chuỗi nặng thứ hai thông qua liên kết disulfua. Phần Fc của kháng thể chịu trách nhiệm cho các chức năng tác động khác nhau như ADCC, và CDC, nhưng không có chức năng trong việc liên kết kháng nguyên.

"Fv" liên quan đến kháng thể đề cập đến mảnh nhỏ nhất của kháng thể đề chứa vị trí liên kết kháng nguyên hoàn chỉnh. Mảnh Fv chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ duy nhất liên kết với vùng biến đổi chuỗi nặng duy nhất.

"Kháng thể Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" đề cập đến kháng thể được nuôi cấy chứa một vùng biến đổi chuỗi nhẹ và một vùng biến đổi chuỗi nặng liên kết với

nhau trực tiếp hoặc thông qua trình tự liên kết peptit (Huston JSet al.Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)).

"Kháng thể Fv-Fc chuỗi đơn" hoặc "scFv-Fc" đề cập đến kháng thể được nuôi cấy bao gồm một scFv liên kết với vùng Fc của một kháng thể.

"Kháng thể đơn miền được lạc đà hóa", "kháng thể chuỗi nặng" hoặc "HCAb" đề cập đến một kháng thể có chứa hai miền VH và không chứa chuỗi nhẹ (Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol.Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; U.S. Patent No. 6,005,079). Các kháng thể chuỗi nặng ban đầu có nguồn gốc từ lạc đà (lạc đà, lạc đà một bướu, và lạc đà không bướu). Mặc dù không có chuỗi nhẹ, các kháng thể được lạc đà hóa có kho liên kết kháng nguyên nguyên bản (Hamers-Casterman C. et al., Nature.Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. et al."Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. et al.Immunology. May;109(1):93-101 (2003)). Miền biến thiên của kháng thể của chuỗi nặng (miền VHH) đặc trưng cho đơn vị liên kết kháng nguyên nhỏ nhất được tạo ra bởi các đáp ứng miễn dịch thích ứng (Koch-Nolte F. et al., FASEB J. Nov;21(13):3490-8.Epub 2007 Jun 15 (2007)).

Một "kháng thể siêu vi" đề cập đến mảnh kháng thể bao gồm miền VHH từ kháng thể chuỗi nặng và hai miền hằng định, CH2 và CH3.

"Đoạn kháng thể đôi" bao gồm mảnh kháng thể nhỏ với hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó mảnh bao gồm miền VH liên kết với miền VL trong cùng chuỗi polypeptit (VH-VL hoặc VL-VH) (xem, ví dụ, Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). Bằng cách sử dụng đoạn nối mà quá nliên kết để cho phép ghép cặp giữa hai miền cùng một chuỗi, các miền buộc phải ghép cặp với các miền bổ sung của chuỗi khác, do đó tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Các vị trí liên kết kháng nguyên có thể nhắm tới cùng một loại kháng nguyên khác nhau (hoặc các epitop).

"Kháng thể đơn miền" đề cập đến một mảnh kháng thể chỉ chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Trong các ví dụ nhất định, hai hoặc

nhiều miền V_H liên kết cộng hóa trị với đoạn nối peptit để tạo ra kháng thể đơn miền một hoặc nhiều hóa trị. Miền V_H của một kháng thể đơn miền hóa trị hai có thể đặt đích nhằm vào các kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau.

Theo các phương án nhất định, "(dsFv)" chứa ba chuỗi peptit: hai phân tử V_H liên kết bởi đoạn nối peptit và được liên kết bởi các cầu disulfua thành hai phân tử VL.

Theo các phương án nhất định, "đoạn kháng thể đôi ds đặc hiệu kép" chứa $VH1-VL2$ (liên kết bằng đoạn liên kết peptit) liên kết với $VL1-VH2$ (còn được liên kết bằng đoạn liên kết peptit) thông qua cầu disulfua giữa $VH1$ và $VL1$.

Theo các phương án nhất định, "ds dsfv đặc hiệu kép" hoặc "dsFv-dsFv" chứa ba chuỗi peptit: phân tử $VH1-VH2$, trong đó chuỗi nặng được liên kết bằng đoạn nối peptit (ví dụ, đoạn nối dài linh hoạt) và liên kết lần lượt với phân tử $VL1$ và $VL2$, bằng cầu sulfua, trong đó mỗi sulfua ghép cặp với chuỗi nặng và nhẹ có đặc tính kháng nguyên khác nhau.

Theo các phương án nhất định, "dime scFv" là đoạn kháng thể đôi hai hóa trị hoặc ScFv (BsFv) chứa $VH-VL$ (liên kết bằng đoạn nối peptit) được dime hóa với phân tử $VH-VL$ sao cho một phân tử của VH cùng với một phân tử của VL và tạo ra hai vị trí liên kết mà có thể nhắm đến các kháng nguyên giống nhau (hoặc epitop) hoặc các kháng nguyên khác nhau (hoặc epitop). Theo các phương án khác, "dime scFv" là đoạn kháng thể đôi đặc hiệu kép gồm $VH1-VL2$ (liên kết bằng đoạn nối peptit) liên kết với $VL1-VH2$ (cũng được liên kết bằng đoạn nối peptit) sao cho $VH1$ cũng với $VL1$ và $VH2$ cùng với $VL2$ và mỗi cặp kết hợp có đặc tính kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ "hoàn toàn của người" được sử dụng trong tài liệu này, dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có hoặc bao gồm (các) trình tự axit amin tương ứng với kháng thể được sản sinh bởi người hoặc tế bào miễn dịch của người, hoặc có nguồn gốc không phải từ người ví dụ như động vật khác con người biến đổi gen mà tận dụng kho kháng thể của người hoặc trình tự mã hóa kháng thể khác của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoàn toàn của người không chứa

phần dư axit amin (đặc biệt là phần dư liên kết kháng nguyên) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người.

Thuật ngữ "được người hóa" được sử dụng trong tài liệu này, có liên quan đến kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa các CDR có nguồn gốc từ động vật khác con người, các vùng FR có nguồn gốc từ người và khi sử dụng, các vùng cố định có nguồn gốc từ người. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được được người hóa rất hữu ích như liệu pháp điều trị ở người trong các phương án nhất định bởi vì nó đã làm giảm tính sinh miễn dịch của người. Theo một số phương án, động vật ngoài con người là động vật có vú, ví dụ như chuột, chuột, thỏ, dê, cừu, chuột lang nhà, hoặc chuột hoang. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được người hóa bao gồm về cơ bản là toàn bộ trình tự của người trừ các trình tự CDR không phải của người. Theo một số phương án, vùng FR có nguồn gốc từ người có thể bao gồm trình tự axit amin giống như kháng thể ở người mà chúng bắt nguồn, hoặc chúng có thể bao gồm một số thay đổi axit amin, ví dụ, không nhiều hơn 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 sự thay đổi của axit amin. Theo một số phương án, sự thay đổi như vậy trong axit amin chỉ có thể xảy ra ở các vùng FR của chuỗi nặng, vùng FR của chuỗi nhẹ hoặc trong cả hai. Theo một số phương án được ưa thích, các kháng thể được được người hóa chứa FR1-3 của người và JH của người và Jk.

Thuật ngữ "chimeric" được sử dụng trong tài liệu này, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, có một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ một loài, và phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ một loài khác. Trong ví dụ minh họa, kháng thể chimeric có thể bao gồm một vùng cố định có nguồn gốc từ người và một vùng biến đổi từ một loài không phải là con người, chẳng hạn như từ chuột.

"PD-1" được sử dụng ở đây đề cập đến protein làm chết tế bào theo chương trình, thuộc về siêu họ của globulin miễn dịch và có chức năng như đồng ức chế thụ thể để điều chỉnh tiêu cực hệ miễn dịch. PD-1 là thành viên của họ CD28 / CTLA-4, và có hai phối tử được biết đến bao gồm PD-L1 và PD-L2. Trình tự axit

amin đại diện của PD-1 của người được bộc lộ dưới accession number của NCBI: NP_005009.2, và trình tự axit nucleic đại diện mã hóa PD-1 của người được thể hiện dưới accession number của NCBI: NM_005018.2.

"PD-L1" được sử dụng trong tài liệu này liên quan đến phối tử của protein làm chết tế bào được lập trình 1 (PD-L1, xem, ví dụ, Freeman et al.(2000) J. Exp. Med. 192:1027). Trình tự axit amin đại diện của PD-L1 người được bộc lộ dưới accession number của NCBI: NP_054862.1 và trình tự nucleic axit đại diện mã hóa PD-L1 người được thể hiện dưới accession number của NCBI: NM_014143.3. PD-L1 được biểu hiện trong nhau thai, lá lách, hạch bạch huyết, tuyến ức, tim, gan bào thai, và cũng được tìm thấy trên nhiều khối u hoặc tế bào ung thư. PD-L1 liên kết với thụ thể PD-1 hoặc B7-1 của nó, được biểu hiện trên các tế bào T hoạt hóa, tế bào B và các tế bào tủy. Việc liên kết của PD-L1 và thụ thể của nó tạo ra sự truyền tín hiệu để ức chế sự hoạt hóa trung gian TCR của sự sản xuất cytokin và sự phát triển tế bào T. Theo đó, PD-L1 đóng một vai trò quan trọng trong việc ức chế hệ thống miễn dịch trong các sự việc đặc biệt như mang thai, bệnh tự miễn dịch, cấy ghép mô và được cho là cho phép khối u hoặc tế bào ung thư phá hoại điểm kiểm soát đáp ứng miễn dịch và tránh được đáp ứng miễn dịch.

"Kháng thể kháng PD-1" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 (ví dụ PD-1 của người hoặc khỉ) với một ái lực đủ cho việc chẩn đoán và/hoặc điều trị.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách đặc hiệu" như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một phản ứng không liên kết ngẫu nhiên giữa hai phân tử, chẳng hạn như ví dụ giữa một kháng thể và một kháng nguyên. Trong các phương án nhất định, các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên cung cấp trong tài liệu này liên kết một cách đặc hiệu với PD-1 của người và/hoặc khỉ với ái lực liên kết (K_D) (K_D) của $\leq 10^{-6}$ M (ví dụ như, $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, 10^{-10} M). K_D như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến tốc độ phân

ly với tốc độ kết hợp ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$), có thể được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ví dụ sử dụng công cụ như của Biacore.

Khả năng "chặn việc liên kết" hoặc "cạnh tranh cho cùng epitop" như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến khả năng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên để ức chế sự tương tác liên kết giữa hai phân tử (ví dụ như PD-1 của người và kháng thể kháng PD-1) ở bất kỳ mức độ nhận biết được. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà chặn liên kết giữa hai phân tử ức chế sự tương tác liên kết giữa hai phân tử ít nhất là 50%. Theo các phương án nhất định, sự ức chế này có thể lớn hơn 60%, lớn hơn 70%, lớn hơn 80%, hoặc lớn hơn 90%.

Thuật ngữ "epitop" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến nhóm các nguyên tử hoặc axit amin cụ thể trên một kháng nguyên mà kháng thể liên kết. Hai kháng thể có thể liên kết với cùng một epitop trong kháng nguyên nếu chúng thể hiện liên kết cạnh tranh cho kháng nguyên. Ví dụ, nếu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này chặn việc liên kết của các kháng thể được làm ví dụ như 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb đối với PD-1 của người, sau đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được coi là liên kết với cùng một epitop với các kháng thể được làm ví dụ.

Phần dư axit amin cụ thể trong epitop có thể được đột biến, ví dụ như đột biến quét alanin, và các đột biến làm giảm hoặc ức chế liên kết protein được xác định. "quét đột biến alanin" là một phương pháp có thể được thực hiện để xác định phần dư hoặc các vùng của protein ảnh hưởng đến sự tương tác giữa các epitop với hợp chất hoặc protein liên kết với nó. Phần dư hoặc nhóm phần dư trong protein được thay bằng axit amin trung tính hoặc âm tính (tốt nhất là alanin hoặc polyalanin, hoặc một axit amin thay thế bảo thủ). Đột biến bất kỳ của phần dư axit amin hoặc các mã di truyền mã hóa tương tự làm giảm sự liên kết của protein nhiều hơn ngưỡng hoặc làm giảm sự liên kết của protein đến mức độ tối đa hơn so với các đột biến khác có thể nằm trong các epitop bị ràng buộc bởi protein. Trong các phương án nhất định của bộ lọc này, epitop mà quan trọng đối với

kháng thể PD-1 chứa ít nhất một trong các phần dư axit amin của V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 và Q133.

"1.7.3 hAb" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO 47 và vùng cố định của người của lớp isotype IgG4.

"1.49.9 hAb" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51 và vùng cố định ở người của lớp isotype IgG4.

"1.103.11 hAb" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người có vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53, vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55 và vùng cố định của người của lớp isotype IgG4.

"1.103.11-v2 hAb" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53, vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67 và vùng cố định của người của lớp isotype IgG4 .

"1.139,15 hAb" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57, vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59 và vùng cố định của người với lớp isotype IgG4.

"1.153.7 hAb" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61, vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63 và vùng cố định của người với lớp isotype IgG4.

"Thay thế bảo thủ" liên quan tới trình tự axit amin đề cập đến việc thế phần dư axit amin với phần dư axit amin khác có mạch bên có các đặc tính sinh hóa tương tự. Ví dụ, thay thế bảo thủ có thể được tạo ra trong các phần dư axit amin với các mạch bên kỵ nước (ví dụ Met, Ala, Val, Leu, và Ile), trong số các phần dư

với các mạch bên cạnh trung tính ưa nước (ví dụ Cys, Ser, Thr, Asn và Gln) trong các axit amin với các mạch bên cơ bản (ví dụ His, Lys, và Arg), hoặc trong số các phần dư có các mạch bên thơm (ví dụ như Trp, Tyr, và Phe). Như được biết đến trong lĩnh vực, thay thế bảo thủ thường không gây ra sự thay đổi đáng kể trong hình dáng cấu trúc protein, và do đó có thể giữ lại hoạt tính sinh học của một protein.

"Phần trăm (%) đồng nhất trình tự" đối với trình tự axit amin (hoặc chuỗi axit nucleic) được định nghĩa là phần trăm phần dư axit amin (hoặc axit nucleic) trong trình tự ứng cử viên mà giống hệt với phần dư axit amin (hoặc axit nucleic) trong trình tự dẫn chiếu, sau khi sắp xếp các trình tự, và nếu cần thiết, đưa vào các khoảng trống, để thu được số lượng tối đa các axit amin giống hệt nhau (hoặc các axit nucleic). Thay thế bảo thủ của axit amin có thể hoặc không được coi là phần dư giống hệt nhau. Việc sắp xếp để xác định trình tự nhận dạng phần trăm axit amin (hoặc axit nucleic) có thể đạt được, ví dụ như sử dụng các công cụ sẵn trên thị trường như BLASTN, BLASTp (có trên trang web của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Hoa Kỳ (NCBI), cũng có thể xem Altschul S.F. et al, J. Mol.Biol., 215:403–410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (có trên trang web European Bioinformatics Institute, cũng có thể xem, Higgins D.G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)), và phần mềm ALIGN or Megalign (ADNSTAR). Các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể sử dụng các tham số mặc định được cung cấp bởi công cụ hoặc có thể tùy chỉnh các thông số mà thích hợp cho việc sắp xếp, ví dụ như bằng cách chọn một thuật toán thích hợp.

“Tế bào T” được sử dụng trong tài liệu này bao gồm tế bào T CD4⁺, tế bào T CD8⁺, tế bào T hỗ trợ 1, tế bào T hỗ trợ 2, tế bào T hỗ trợ 17 và các tế bào T ức chế.

"Các chức năng tác động" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến các hoạt động sinh học liên kết liền với vùng Fc của kháng thể với các hiệu lực của nó như phức hợp C1 và thụ thể Fc. Chức năng tác động ví dụ bao gồm: gây độc

tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) do tương tác giữa kháng thể và C1q trên phức hợp C1; gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) gây ra bởi sự liên kết của vùng Fc của kháng thể với thụ thể Fc trên một tế bào tác động; và sự thực bào.

"Ung thư" hoặc "tình trạng ung thư" như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến bất kỳ tình trạng sức khỏe nào được điều chỉnh do sự gia tăng tế bào ác tính hoặc ung thư, sự phát triển, và bao gồm cả ung thư thể rắn và không rắn ví dụ như ung thư máu. "Khối u" như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một khối rắn của các tế bào ung thư và/hoặc ác tính.

"Điều trị" hoặc "việc điều trị" của tình trạng như được sử dụng trong tài liệu này bao gồm việc ngăn ngừa hoặc giảm bớt tình trạng, làm chậm sự khởi phát hoặc tỷ lệ phát triển của tình trạng, giảm nguy cơ phát triển tình trạng, ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự phát triển các triệu chứng liên quan đến tình trạng, thuyên giảm hoặc kết thúc các triệu chứng liên quan đến tình trạng, tạo ra sự suy giảm toàn bộ hoặc một phần của tình trạng, chữa trị, hoặc các sự kết hợp của chúng. Đối với ung thư, "điều trị" hoặc "việc điều trị" có thể đề cập đến việc ức chế hoặc làm chậm sự tăng trưởng tế bào ung thư hoặc ác tính, sự phát triển hoặc di căn, ngăn chặn hoặc trì hoãn sự phát triển của tế bào ung thư hoặc ác tính, sự phát triển, hoặc di căn, hoặc các kết hợp của chúng. Đối với khối u, "điều trị" hoặc "việc điều trị" bao gồm tiêu diệt toàn bộ hoặc một phần khối u, ức chế hoặc làm chậm sự phát triển của khối u và di căn, ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự phát triển khối u, hoặc các kết hợp của chúng.

Chất "được phân lập" đã bị thay đổi bởi bàn tay con người từ trạng thái tự nhiên. Nếu chế phẩm hoặc chất "được phân lập" xảy ra trong tự nhiên, nó đã được thay đổi hoặc loại bỏ khỏi môi trường ban đầu của nó, hoặc cả hai. Ví dụ, một polynucleotit hoặc một polypeptit có mặt tự nhiên trong một động vật sống mà không "được phân lập", nhưng polynucleotit hoặc polypeptit giống nhau "được phân lập" nếu nó đã được tách ra đầy đủ khỏi các chất cùng tồn tại của dạng tự nhiên của nó để tồn tại trong dạng tinh khiết. Theo các phương án nhất định, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên có độ tinh khiết ít nhất 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% được xác định bằng phương pháp điện di (như SDS-PAGE, điện

di tập trung điểm đẳng điện, điện di mao quản), hoặc các phương pháp sắc ký (như sắc ký trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo).

Thuật ngữ "vật truyền" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một tá dược lỏng mà trong đó polynucleotit mã hóa protein có thể được đưa vào để đem lại biểu hiện của protein đó. Vật truyền có thể được sử dụng để biến đổi, chuyển nạp, hoặc chuyển nhiễm một tế bào chủ để đem lại biểu hiện của các yếu tố di truyền mà nó sở hữu trong tế bào chủ. Các ví dụ về vật truyền bao gồm plasmit, thể thực khuẩnmid, cosmid, nhiễm sắc thể nhân tạo như nh nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC), hoặc Nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc từ P1 (PAC), các thực khuẩn thể như Thực khuẩn thể Lambda hoặc thể thực khuẩn M13, và virus động vật. Các loại virus động vật được sử dụng như các vật truyền bao gồm retrovirus (bao gồm lentivirus), adenovirus, virut liên quan đến adeno, herpesvirus (ví dụ virus herpes simplex), poxvirus, baculovirus, papillomavirus, và papovavirus (ví dụ SV40). Một vật truyền có thể chứa nhiều yếu tố để kiểm soát biểu hiện, bao gồm trình tự vùng khởi động, trình tự khởi đầu mã hóa, trình tự vùng tăng cường, các yếu tố có thể chọn được, và các gen chỉ thị. Ngoài ra, vật truyền có thể chứa trình tự khởi đầu sao chép. Vật truyền có thể chứa các chất để hỗ trợ cho sự xâm nhập của nó vào tế bào, bao gồm nhưng không hạn chế trong việc xâm nhập hạt virut, liposome, hoặc bao phủ protein.

Cụm từ "tế bào chủ" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến một tế bào mà trong đó một polynucleotit ngoại lai và/hoặc một vật truyền đã được đưa vào.

"Bệnh liên quan hoặc liên quan đến PD-1" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến bất kỳ tình trạng nào bị gây ra, làm trầm trọng hoặc liên quan đến biểu hiện tăng hoặc giảm hoặc hoạt động của PD-1 (ví dụ như PD-1 của người).

Thuật ngữ "lượng hiệu quả điều trị" hoặc "liều hiệu quả" được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến liều lượng hoặc nồng độ của một loại thuốc có hiệu quả để điều trị một bệnh hoặc tình trạng liên quan đến PD-1 của người. Ví dụ, đối với việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này để điều trị ung thư, lượng hiệu quả điều trị là liều lượng hoặc nồng độ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có khả năng loại bỏ tất cả hoặc

một phần khối u, ức chế hoặc làm chậm sự tăng trưởng của khối u, ức chế sự tăng trưởng hoặc sự phát triển của các tế bào trung gian điều kiện ung thư, ức chế di căn tế bào khối u, cải thiện bất kỳ triệu chứng hoặc dấu hiệu nào liên quan đến khối u hoặc tình trạng ung thư, ngăn ngừa hoặc trì hoãn sự phát triển khối u hoặc tình trạng ung thư, hoặc sự kết hợp của chúng.

Thuật ngữ "được chấp nhận về mặt dược liệu" chỉ ra rằng chất mang, tá dược lỏng, chất pha loãng, chất tẩy rửa và/hoặc muối được chỉ định nói chung là tương thích về mặt hóa học và/hoặc vật lý với các thành phần khác có chứa công thức và tương thích về sinh lý với người nhận.

Kháng thể kháng PD-1

Theo một khía cạnh, bộ lộ này cung cấp kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó. PD-1, còn được gọi là CD279, được biết đến như là một thụ thể điểm kiểm soát đáp ứng miễn dịch được biểu hiện bằng các tế bào T hoạt hóa, mà trung gian cho việc ức chế miễn dịch. Phôi tử 1 của PD-1 (PD-L1) là protein màng tế bào 40 kDa được biểu hiện trên các tế bào khối u, tế bào đệm hoặc cả hai, và liên kết với PD-1. Sự ức chế của tương tác giữa PD-1 và PD-L1 có thể tăng cường phản ứng tế bào T và do đó trung gian hoạt tính chống ung thư.

Theo các phương án nhất định, bộ lộ này cung cấp các kháng thể đơn dòng của người hoàn chỉnh được lấy làm ví dụ 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb, mà có trình tự CDR thể hiện trong bảng 1 dưới đây, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ cũng được trình bày dưới đây.

Bảng 1

	CDR1	CDR2	CDR3
1.7.3 hAb-VH (23466- VH)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5

	STTTYWV	SISYSGNTYYNPSL KS	HLGYNGRYLPFD Y
	SEQ ID NO:2 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	SEQ ID NO:4 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AAC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO:6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.7.3 hAb-VL (23195- VL)	SEQ ID NO:7 TGTSSDVGFYNYV S	SEQ ID NO:9 DVTNRPS	SEQ ID NO:11 SSYTSISTWV
	SEQ ID NO:8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO:10 GAT GTC ACT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO:12 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG
1.49.9 hAb - VH(209 51-VH)	SEQ ID NO:13 SSTYYWG	SEQ ID NO:15 SISYSGSTYYNPSLK S	SEQ ID NO:5 HLGYNGRYLPFD Y
	SEQ ID NO:14 AGT AGT ACT TAC TAC TGG GGC	SEQ ID NO:16 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC	SEQ ID NO:6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC

		TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	CCC TTT GAC TAC
1.49.9 hAb - VH(209 51-VL)	SEQ ID NO:7 TGTSSDVGFYNYV S	SEQ ID NO:17 DVSNRPS	SEQ ID NO: 11 SSYTSISTWV
	SEQ ID NO: 8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO:18 GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO:12 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG
1.103.11 hAb-VH (20975- VH)	SEQ ID NO:1 STTTYWV	SEQ ID NO:15 SISYSGSTYYNPSLK S	SEQ ID NO:5 HLGYNGRYLPFD Y
	SEQ ID NO:2 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	SEQ ID NO:16 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO:6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.103.11 hAb-VH (20975- VL)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:19

	TGTSSDVGFYNYV S	DVSNRPS	SSYTNISTWV
	SEQ ID NO:8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO:18 GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO:20 AGC TCA TAT ACA AAC ATC AGC ACT TGG GTG
1.139.15 hAb - VH(235 21-VH)	SEQ ID NO:21 STTTYWG	SEQ ID NO:23 SISYSGTTYYNPSLK S	SEQ ID NO:25 HLGYNSNWYPFD Y
	SEQ ID NO:22 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GGC	SEQ ID NO:24 AGT ATC TCT TAT AGT GGG ACC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO:26 CAT CTC GGG TAT AAC AGC AAC TGG TAC CCT TTT GAC TAC
1.139.15 hAb - VH(235 21-VL)	SEQ ID NO:27 TGTSSDVGSYNRV S	SEQ ID NO:29 EVSNRPS	SEQ ID NO:31 SSYTSSSTWV
	SEQ ID NO:28 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT	SEQ ID NO:30 GAG GTC AGT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO:32 AGC TCA TAT ACA AGC AGC

	GGT AGT TAT AAC CGT GTC TCC		AGC ACT TGG GTG
1.153.7 hAb - VH(209 42-VH)	SEQ ID NO:33 SHAMS	SEQ ID NO:35 TITGGGGSIYYADS VKG	SEQ ID NO:37 NRAGEGYFDY
	SEQ ID NO:34 AGC CAT GCC ATG AGC	SEQ ID NO:36 ACT ATT ACT GGT GGT GGT GGT AGC ATA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC	SEQ ID NO:38 AAC CGC GCT GGG GAG GGT TAC TTT GAC TAC
1.153.7 hAb - VH(209 42-VL)	SEQ ID NO:39 GGDNIGNKDVH	SEQ ID NO:41 RDSNRPS	SEQ ID NO:43 QVWDSIWV
	SEQ ID NO:40 GGG GGA GAC AAC ATT GGA AAT AAA GAT GTG CAC	SEQ ID NO:42 AGG GAT AGC AAC CGG CCC TCT	SEQ ID NO:44 CAG GTG TGG GAC AGC ATT TGG GTG
1.103.11 -v2 hAb- VH (20975- VH)	SEQ ID NO:1 STTTYWV	SEQ ID NO:15 SISYSGSTYYNPSLK S	SEQ ID NO:5 HLGYNGRYLPFD Y
	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:6

	AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.103.11	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:65
-v2 hAb	TGTSSDVGFYNYV	DVSNRPS	SSYTSISTWV
-	S		
VH(209	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:66
75-2-			
VL)	ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG

1.7.3 hAb-VH (23466-VH): SEQ ID NO: 45 đối với axit amin và SEQ ID NO: 46 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nặng nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 1, 3, 5 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 2, 4, 6 lần lượt là các trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGHV4-39*01

Đoạn D: IGHD1-26*01

Đoạn J: IGHJ4*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L T L T C T V S G D S I S
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GAC TCC ATC AGC

CDR1

~~~~~  
 S T T Y Y W V W I R Q P P G K  
 91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

## CDR2

~~~~~  
 G L E W I G S I S Y S G N T Y
 136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AAC ACC TAC

CDR2

~~~~~  
 Y N P S L K S R V T I S V D T  
 181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

S K N H F S L K L S S V A A T  
 226 TCC AAG AAC CAC TTC TCC CTG AAG CTG AGT TCT GTG GCC GCC ACA

## CDR3

~~~~~  
 D T A L Y Y C A R H L G Y N G
 271 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

~~~~~  
 R Y L P F D Y W G Q G T L V T  
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 45)  
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 46)

1.7.3 hAb-VL (23195-VL): (SEQ ID NO: 47 đối với axit amin và SEQ ID NO: 48 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nhẹ từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 7, 9, 11

lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 8, 10, 12 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGLV2-14\*01

Đoạn J: IGLJ3\*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G  
1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G  
46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A  
91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E L M I Y D V T N R P S G V  
136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC ACT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L  
181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T S I S T W V F G G G T  
261 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 47)  
 316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 48)

1.49,9 hAb-VH (20951-VH): (SEQ ID NO: 49 đối với axit amin và SEQ ID NO: 50 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nặng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 13, 15, 5 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 14, 16, 6 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGHV4-39\*01

Đoạn D: IGHD1-26\*01

Đoạn J: IGHJ4\*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S  
 1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L S L T C T V S G G S I S  
 46 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

#### CDR1

~~~~~  
 S S T Y Y W G W I R Q P P G K
 91 AGT AGT ACT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~  
 G L E W I G S I S Y S G S T Y  
 136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

#### CDR2

~~~~~  
 Y N P S L K S R V T I S V D T
 181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

S K N Q F S L K L S S V T D A
 226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GAC GCA

CDR3

D T A V Y Y C A R H L G Y N G
 261 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

R Y L P F D Y W G Q G T L V T
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 49)
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 50)

1.49.9 hAb -VL(21526-VL): (SEQ ID NO: 51 đối với axit amin và SEQ ID NO: 52 đối với axit nucleic với CDR chuỗi nhẹ từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 7, 17, 11 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 8, 18, 12 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGLV2-14*01

Đoạn J: IGLJ3*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G
 1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G
 46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

~~~~~  
 F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A  
 91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

## CDR2

~~~~~  
 P E V M I Y D V S N R P S G V
 136 CCC GAA GTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L
 181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C
 226 ACT ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

~~~~~  
 S S Y T S I S T W V F G G G T  
 261 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 51)  
 316 AAG CTG ACT GTC CTA (SEQ ID NO: 52)

1.103.11 hAb -VH(20975-VH): (SEQ ID NO: 53 đối với axit amin và SEQ ID NO: 54 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nặng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 1, 15, 5 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 2, 16, 6 lần lượt là các trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGHV4-39\*01

Đoạn D: IGHD1-26\*01

## Đoạn J: IGHJ4\*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S  
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L T L T C T V S A D S I S  
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GCT GAC TCC ATC AGC

## CDR1

~~~~~  
S T T Y Y W V W I R Q P P G K
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~  
G L E W I G S I S Y S G S T Y  
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

## CDR2

~~~~~  
Y N P S L K S R V T V S V D T
181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC GTA TCC GTA GAC ACG

S K N Q F S L K L N S V A A T
226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

~~~~~  
D T A L Y Y C A R H L G Y N G  
261 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

## CDR3

~~~~~  
 R Y L P F D Y W G Q G T L V T
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 53)
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 54)

1.103.11 hAb -VL(21038-VL): (SEQ ID NO: 55 đối với axit amin và SEQ ID NO: 56 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nhẹ nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 7, 17, 19 lần lượt là trình tự axit amino và SEQ ID NO: 8, 18, 20 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGLV2-14*01

Đoạn J: IGLJ3*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G
 1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

~~~~~  
 Q S I T I S C T G T S S D V G  
 46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

## CDR1

~~~~~  
 F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
 91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E L M I Y D V S N R P S G V
 136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L
 181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C
 226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T N I S T W V F G G G T
 261 AGC TCA TAT ACA AAC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 55)
 316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 56)

1.139.15 hAb -VH(23521-VH) (SEQ ID NO: 57 đối với axit amin và SEQ ID NO: 58 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nặng nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 21, 23, 25 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 22, 24, 26 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGHV4-39*01

Đoạn D: IGHD6-13*01

Đoạn J: IGHJ4*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCC TCG

E T L S L T C T V S G G S I S
46 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

CDR1

~~~~~  
S T T Y Y W G W I R Q P P G K  
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

## CDR2

~~~~~  
G L E W I G S I S Y S G T T Y
136 GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG ACC ACC TAC

CDR2

~~~~~  
Y N P S L K S R V T I P V D T  
181 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATC CCC GTA GAC ACG

S K N Q I S L K L S S V T A A  
226 TCC AAG AAC CAG ATC TCC CTG AAA CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

## CDR3

~~~~~  
D T S L Y Y C A R H L G Y N S
261 GAC ACG TCT TTG TAT TAT TGT GCG AGA CAT CTC GGG TAT AAC AGC

CDR3

~~~~~  
N W Y P F D Y W G Q G T L V T  
316 AAC TGG TAC CCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 57)  
 361 GTC TCC TCA (SEQ ID NO: 58)

1.139.15 hAb -VL(22895-VL) (SEQ ID NO: 59 đối với axit amin và SEQ ID NO: 60 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nhẹ nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 27, 29, 31 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 28, 30, 32 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGLV2-18\*02

Đoạn J: IGLJ3\*02

Q S A L T Q P P S V S G S P G  
 1 CAG TCG GCC CTG ACT CAG CCT CCC TCC GTG TCC GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S V T I S C T G T S S D V G  
 46 CAG TCA GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

S Y N R V S W Y Q Q P P G T A  
 91 AGT TAT AAC CGT GTC TCC TGG TAC CAG CAG CCC CCA GGC ACA GCC

CDR2

P E V I I Y E V S N R P S G V  
 136 CCC GAA GTC ATT ATT TAT GAG GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTC

P D R F S G S K S G N T A S L  
 181 CCT GAT CGC TTC TCT GGG TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
 226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

## CDR3

~~~~~  
 S S Y T S S S T W V F G G G T
 261 AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 59)
 316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 60)

1.153.7 hAb -VH(20942-VH): (SEQ ID NO: 61 đối với axit amin và SEQ ID NO: 62 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nặng nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 33, 35, 37 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 34, 36, 38 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGHV3-23*01

Đoạn D: IGHD7-27*01

Đoạn J: IGHJ4*02

E V Q L L E S G G G L V Q P G
 1 GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG

G S L R L S C A A S G F T F S
 46 GGG TCC CTG AGA CTG TCC TGC GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

CDR1

~~~~~  
 S H A M S W V R Q A P G K G L  
 91 AGC CAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG

## CDR2

~~~~~  
 E W V S T I T G G G G S I Y Y
 136 GAG TGG GTC TCA ACT ATT ACT GGT GGT GGT GGT AGC ATA TAC TAC

CDR2

~~~~~  
 A D S V K G R F T I S R D N S  
 181 GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC

K N T L Y L Q M N S L R A E D  
 226 AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

## CDR3

~~~~~  
 T A V Y Y C A K N R A G E G Y
 261 ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AAA AAC CGC GCT GGG GAG GGT TAC

CDR3

~~~~~  
 F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 61)  
 316 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA (SEQ ID NO:  
 62)

1.153.7 hAb -VL(21110-VL) (SEQ ID NO: 63 đối với axit amin và SEQ ID NO: 64 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nhẹ nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 39, 41, 43 lần lượt là axit amin và SEQ ID NO: 40, 42, 44 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGLV3-9\*01

Đoạn J: IGLJ3\*02

S Y E L T Q P L S V S V A L G  
 1 TCC TAT GAG CTG ACT CAG CCA CTC TCA GTG TCA GTG GCC CTG GGA

## CDR1

Q T A R I T C G G D N I G N K  
 46 CAG ACG GCC AGG ATT ACC TGT GGG GGA GAC AAC ATT GGA AAT AAA

## CDR1

D V H W Y Q Q K P G Q A P V L  
 91 GAT GTG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG CTG

## CDR2

V I Y R D S N R P S G I P E G  
 136 GTC ATC TAT AGG GAT AGC AAC CGG CCC TCT GGG ATC CCT GAG GGA

F S G S N S G N T A T L T I S  
 181 TTC TCT GGC TCC AAC TCG GGG AAC ACG GCC ACC CTG ACC ATC AGC

## CDR3

R A Q A G D E A D Y Y C Q V W  
 226 AGA GCC CAA GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG

## CDR3

D S I W V F G G G T K L T V L (SEQ ID  
 NO: 63)  
 261 GAC AGC ATT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ  
 ID NO: 64)

1.103.11-v2 hAb -VH(20975-VH): (SEQ ID NO: 53 đối với axit amin và SEQ ID NO: 54 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nặng nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NOs: 1, 15, 5 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 2, 16, 6 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGHV4-39\*01

Đoạn D: IGHD1-26\*01

Đoạn J: IGHJ4\*02

Q L Q L Q E S G P G L V K P S  
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

E T L T L T C T V S A D S I S  
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GCT GAC TCC ATC AGC

#### CDR1

~~~~~  
S T T Y Y W V W I R Q P P G K
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~  
G L E W I G S I S Y S G S T Y  
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

#### CDR2

~~~~~  
Y N P S L K S R V T V S V D T
181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC GTA TCC GTA GAC ACG

S K N Q F S L K L N S V A A T
226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

D T A L Y Y C A R H L G Y N G
 261 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

R Y L P F D Y W G Q G T L V T
 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 53)
 361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 54)

1.103.11-v2 hAb -VL(21038-2-VL): (SEQ ID NO: 67 đối với axit amin và SEQ ID NO: 68 đối với axit nucleic) với CDR chuỗi nhẹ nằm trong khoảng từ 1 đến 3: SEQ ID NO: 7, 17, 65 lần lượt là trình tự axit amin và SEQ ID NO: 8, 18, 66 lần lượt là trình tự axit nucleic:

Đoạn V: IGLV2-14*01

Đoạn J: IGLJ3*02

Q S A L T Q P A S V S G S P G
 1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G
 46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
 91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E L M I Y D V S N R P S G V
 136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L
 181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C
 226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T S I S T W V F G G G T
 261 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 67)
 316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 68)

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa trình tự CDR chuỗi nặng được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 13, 15, 21, 23, 25, 33, 35 và 37. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 7, 9, 11, 17, 19, 27, 29, 31, 39, 41, 43 và 65. Theo một số phương án, một hoặc nhiều trình tự CDR được cung cấp trong tài liệu này có thể được biến đổi hoặc thay đổi sao cho kháng thể thu được cải thiện trên kháng thể mẹ trong một hoặc nhiều tính chất (như cải thiện sự liên kết kháng nguyên, cải thiện mô hình glycosyl hóa, giảm nguy cơ glycosyl hóa trên phần dư CDR, làm giảm sự khử amin trên phần dư

CDR, kéo dài thời gian bán huỷ được động học, tăng độ nhạy pH và khả năng tương thích với liên hợp) và có thể so sánh được với kháng nguyên mẹ (tức là kháng thể có cùng một bộ các trình tự CDR ngoại trừ các biến đổi hoặc thay đổi nêu trên), hoặc ít nhất về cơ bản là giữ lại đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể mẹ.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa một vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 và/hoặc SEQ ID NO: 5; một vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; một vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; một vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, và/hoặc SEQ ID NO: 25; và một vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, và/hoặc SEQ ID NO: 37.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa một vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 và/hoặc SEQ ID NO: 11; một vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 11; một vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 19; một vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, và/hoặc SEQ ID NO: 31; một vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, và/hoặc SEQ ID NO: 43; và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 65.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, và/hoặc SEQ ID NO: 11; b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:

15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 11; c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 19; d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO 23, và/hoặc SEQ ID NO: 25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, và/hoặc SEQ ID NO: 31; e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, và/hoặc SEQ ID NO: 37; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, và/hoặc SEQ ID NO: 43; hoặc f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15, và/hoặc SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 17, và/hoặc SEQ ID NO: 65.

Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng trình tự CDR được cung cấp trong Bảng 1 có thể được biến đổi để chứa một hoặc nhiều thay thế của các axit amin, để cung cấp hoạt động sinh học được cải thiện ví dụ như cải thiện việc liên kết với PD-1 của người. Ví dụ, một thư viện các biến thể của kháng thể (như các biến thể Fab hoặc scFv) có thể được tạo ra và biểu hiện bằng công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn, và sau đó sàng lọc cho ái lực với PD-1 của người. Ví dụ khác, phần mềm máy tính có thể được sử dụng để mô phỏng hầu hết việc liên kết của các kháng thể với PD-1 của người, và xác định phần dư axit amin trên các kháng thể tạo thành giao diện liên kết. Phần dư như vậy có thể tránh được trong sự thay thế để ngăn ngừa sự giảm ái lực liên kết, hoặc nhắm đến sự thay thế để đem lại liên kết mạnh hơn. Theo các phương án nhất định, ít nhất một (hoặc tất cả) sự thay thế trong các trình tự CDR là đột biến thay thế bảo thủ.

Theo một số phương án, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa một hoặc nhiều trình tự CDR có ít nhất 80% (ví dụ: ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99%) trình tự tương đồng với trình tự (hoặc các trình tự) được liệt kê trong Bảng 1, và cùng lúc đó, giữ lại ái lực liên kết với PD-1 của người ở mức tương đương hoặc thậm chí cao hơn kháng thể mẹ

có trình tự giống nhau, ngoại trừ trình tự CDR tương ứng tương đồng 100% với trình tự (hoặc các trình tự) được liệt kê trong Bảng 1.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên hoàn toàn của người. Các kháng thể hoàn toàn của người không có các vấn đề gây miễn dịch ở người và/hoặc giảm ái lực liên kết thường thấy với các kháng thể được người hóa.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 hoàn toàn của người và mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, và trình tự tương đồng của chúng có ít nhất 80% (ví dụ: ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% , 96%, 97%, 98%, 99%) tương đồng trình tự; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, và trình tự tương đồng có ít nhất 80% (ví dụ, ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) tương đồng trình tự. Kháng thể hoàn toàn của người giữ được ái lực liên kết với PD-1 của người, tốt hơn ở mức độ tương tự như một trong các kháng thể mẫu: 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139. 15 hAb, và 1.153.7 hAb.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 hoàn toàn của người và mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47; b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51; c) vùng biến đổi chuỗi nặng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55; d) vùng biến đổi chuỗi nặng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59; e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63; hoặc f)

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67.

Cũng được đề cập trong tài liệu này là kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà cạnh tranh với cùng epitop với kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này. Theo các phương án nhất định, kháng thể chặn liên kết của 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, or 1.153.7 hAb với PD-1 của người hoặc khỉ, Ví dụ, tại trị số IC₅₀ (tức là 50% nồng độ ức chế) dưới 10^{-6} M, dưới 10^{-7} M, dưới $10^{-7.5}$ M, dưới 10^{-8} M, dưới $10^{-8.5}$ M, dưới 10^{-9} M, hoặc dưới 10^{-10} M. Trị số nồng độ IC₅₀ được xác định dựa trên thử nghiệm cạnh tranh như thử nghiệm ELISA, thử nghiệm liên kết cạnh tranh radioligand, và phân tích FACS.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp trong tài liệu này có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 của người với ái lực liên kết (K_d) $\leq 10^{-6}$ M (ví dụ $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, 10^{-10} M) được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Ái lực liên kết có thể được thể hiện bằng trị số KD, được tính bằng cách lấy tỷ lệ giữa tốc độ phân ly và tốc độ kết hợp (k_{off}/k_{on}) khi liên kết giữa kháng nguyên và phân tử liên kết kháng nguyên đạt trạng thái cân bằng. Ái lực liên kết kháng nguyên (ví dụ KD) có thể được thích hợp xác định bằng các phương pháp thích hợp được biết trong lĩnh vực, bao gồm, ví dụ, sử dụng các công cụ như Biacore (có thể xem, ví dụ, Murphy, M. et al, Current protocols in protein science, Chapter 19, unit 19.14, 2006).

Theo các phương án nhất định, các kháng thể và các mảnh kháng thể này được cung cấp ở đây liên kết với PD-1 của người với (tức là nồng độ liên kết 50%) EC₅₀ của 0,1nM-100nm (ví dụ 0,1nM-50nm, 0,1nM-30nm, 20nm-0,1nM- , 0,1nM-10nM, hoặc 0.1nM-1nM). Việc liên kết của các kháng thể với PD-1 của người có thể được đo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ như thử nghiệm kiểu bánh mỳ kẹp chẳng như ELISA, Phân tách Tây, FACS hoặc các xét nghiệm liên kết khác. Trong một ví dụ minh họa, kháng thể thử nghiệm (tức là

kháng thể đầu tiên) được cho phép liên kết với PD-1 của người bị bất hoạt hoặc tế bào biểu hiện PD-1 của người, sau khi rửa đi kháng thể không liên kết, kháng thể thứ cấp được dán nhãn được đưa vào để liên kết và do đó cho phép việc phát hiện các kháng thể đầu tiên đã liên kết. Việc phát hiện có thể được thực hiện với một máy đọc vi phiên khi sử dụng PD-1 bị bất hoạt hoặc bằng cách sử dụng phân tích FACS khi các tế bào biểu hiện PD-1 của người được sử dụng. Trong các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh kháng thể của chúng được đề xuất trong tài liệu này liên kết với PD-1 của người với EC_{50} (tức là nồng độ hiệu quả 50%) nằm trong khoảng từ 1nM đến 10nM, hoặc 1nM đến 5nM được đo bằng phân tích FACS.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh kháng thể của chúng được đề xuất trong tài liệu này ức chế việc liên kết PD-1 của người với phối tử ở IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,2nM đến 100nM (ví dụ nằm trong khoảng từ 0,2nM đến 50nM, 0,2nM đến 30nM, 0,2nM đến 20nM, 0,2nM đến 10nM, hoặc 1nM đến 10nM), được đo trong thử nghiệm cạnh tranh.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh kháng thể của chúng được đề xuất trong tài liệu này chặn việc liên kết của PD-1 của người với phối tử của nó và do đó cung cấp hoạt tính sinh học bao gồm, ví dụ, đem lại sự sinh ra xytokin từ các tế bào T hoạt hóa (như tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$), đem lại sự phát triển của tế bào T hoạt hóa (như tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$), và đảo ngược chức năng ức chế của tế bào T reg. Các xytokin ví dụ bao gồm IL-2 và IFN γ . Thuật ngữ "IL-2" dùng để chỉ interleukin 2, một loại xytokin báo hiệu phân tử trong hệ thống miễn dịch mà trong đó điều chỉnh hoạt tính của bạch cầu (ví dụ tế bào bạch cầu). Thuật ngữ "Interferon gamma (IFN γ)" là một xytokin được sinh ra bởi các tế bào ăn mồi tự nhiên (NK), tế bào T NK, tế bào T $CD4^+$ và $CD8^+$, mà chất hoạt hóa quan trọng của các đại thực bào và tác nhân gây cảm ứng của phức hợp phù hợp tổ chức chính (MHC) của biểu hiện phân tử. Việc sản xuất xytokin có thể được xác định được bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ như ELISA. Các phương pháp cũng có thể được sử dụng để phát hiện sự phát triển các tế bào T, bao gồm thử nghiệm sự kết hợp thymidine [3H].

Các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó đặc hiệu với PD-1. Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó không liên kết với CD28 và/hoặc CTLA-4. Ví dụ, ái lực liên kết với CD28 và/hoặc CTLA-4 nhỏ hơn 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% của chúng với PD-1.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với PD-1 của khi ở nồng độ EC_{50} không quá 100nM, ví dụ, tối đa hoặc ở khoảng 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6 nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, 1nM, 0,9nM, 0,8nM, 0,7nM, 0,6nM, 0,5nM, 0,4nM, 0,3nM, 0.2nM, 0,1nM, 0,09nM, 0,08nM, 0,07nM, 0,06nM, 0,05nM, 0,04nM, 0,03nM, 0,02nM, hoặc 0,01nM, được đo bằng ELISA. Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với PD-1 của khi ở nồng độ EC_{50} khoảng 1nM-10 nM.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó không liên kết với PD-1 của chuột nhưng liên kết với PD-1 của khi với ái lực liên kết giống như ái lực với PD-1 của người. Ví dụ, việc liên kết của kháng thể ví dụ 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.103.11-v2 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb đối với PD-1 của chuột không thể phát hiện được theo thử nghiệm liên kết thông thường như ELISA, hoặc phân tích FACS, trong khi việc liên kết của các kháng thể này với PD-1 của khi có cùng trị số ái lực hoặc trị số EC_{50} với PD-1 của người được đo bằng ELISA hoặc FACS.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có chức năng tác động bị hạn chế hoặc mất đi. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có vùng cố định của isotype IgG4, có chức năng tác động bị hạn chế hoặc mất đi. Các chức năng tác động như ADCC và CDC có thể gây độc tế bào đối với các tế bào thể hiện PD-1. Thông thường, các tế bào như tế bào T biểu hiện PD-1. Để tránh những độc tính không mong muốn tiềm tàng đối với những tế bào bình thường, các phương án nhất định của các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này có thể có các chức năng tác động bị hạn

chế hoặc thậm chí mất đi. Các thử nghiệm khác nhau đã biết để đánh giá các hoạt tính ADCC hoặc CDC, ví dụ, thử nghiệm liên kết thụ thể Fc, thử nghiệm liên kết C1q và thử nghiệm phân tách tế bào, và có thể được chọn bởi những người trong lĩnh vực. Mặc dù không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, nhưng các kháng thể với các chức năng tác động bị hạn chế hoặc mất đi như ADCC hoặc CDC được tin rằng sẽ không gây ra hoặc ít gây độc tế bào đối với các tế bào biểu hiện PD-1, ví dụ các tế bào T nêu trên, và do đó tránh cho chúng khỏi các phản ứng phụ không mong muốn, trong khi đó, việc ngăn chặn PD-1 sẽ tăng cường hệ miễn dịch để điều trị các bệnh như ung thư hoặc nhiễm trùng mãn tính.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong tài liệu này có hạn chế các tác dụng phụ. Ví dụ, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong tài liệu này có thể có trình tự IgG hoàn toàn của người và do đó làm giảm khả năng miễn dịch hơn so với trình tự IgG hoàn toàn của kháng thể được người hóa. Trong ví dụ khác, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong tài liệu này có thể là kiểu IgG4 để loại bỏ ADCC và CDC.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong tài liệu này ưu thế ở chỗ chúng có thể được sử dụng kết hợp với các tác nhân miễn dịch như tế bào khối u, kháng nguyên khối u tinh khiết và các tế bào được truyền nhiễm với các gen mã hóa kích thích miễn dịch xytokin, vắc xin khối u. Ngoài ra, kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được đưa vào trong các liệu pháp kết hợp, bao gồm hóa trị liệu và liệu pháp sóng radio, liệu pháp nhắm mục tiêu phân tử nhỏ, liệu pháp điều chế điểm kiểm soát đáp ứng miễn dịch đang phát triển khác. Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng làm cơ sở của các liên hợp kháng thể, thuốc kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể nhiều hóa trị.

Các kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong tài liệu này có thể là một kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể hoàn toàn của người, kháng thể được người hóa, kháng thể chimeric,

kháng thể tái tổ hợp, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể được dán nhãn, kháng thể hai hóa trị, hoặc kháng thể kháng idiotypic. Kháng thể tái kết hợp là kháng thể được điều chế in vitro bằng phương pháp tái tổ hợp hơn là ở động vật. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai hóa trị là kháng thể nhân tạo có các mảnh của hai kháng thể đơn dòng khác nhau và có thể liên kết hai kháng nguyên khác nhau. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà có "hai hóa trị" chứa hai vị trí liên kết kháng nguyên. Hai vị trí liên kết kháng nguyên có thể liên kết với cùng một kháng nguyên, hoặc chúng có thể liên kết với kháng nguyên khác nhau, trong trường hợp này, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đặc trưng là "đặc hiệu kép".

Trong một số phương án, các kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất trong tài liệu này là các kháng thể hoàn toàn của người. Trong các phương án nhất định, các kháng thể hoàn toàn của người được điều chế bằng phương pháp tái tổ hợp. Ví dụ, động vật biến đổi gen như chuột có thể được khiến cho mang gen biến đổi hoặc nhiễm sắc thể biến đổi của gen globulin miễn dịch của người, và do đó có khả năng sản xuất kháng thể hoàn toàn của người sau khi tạo miễn dịch với kháng nguyên thích hợp như PD-1 của người. Các kháng thể hoàn toàn của người có thể được phân lập từ động vật biến đổi gen này, hoặc có thể được thực hiện bằng công nghệ tế bào lai bằng cách kết hợp các tế bào lá lách của động vật biến đổi gen với một dòng tế bào bất tử để sinh ra các tế bào lai tạo ra các kháng thể hoàn toàn của người. Động vật biến đổi gen ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn, trong số OmniRat, mà có biểu hiện gen nội tiết của globulin miễn dịch của chuột bị bất hoạt và đồng thời được nuôi cấy để chứa các loci globulin miễn dịch tái tổ hợp chức năng; OmniMouse, mà có biểu hiện gen nội tiết miễn dịch của chuột bị bất hoạt và đồng thời được nuôi cấy để chứa các loci globulin miễn dịch tái tổ hợp của người có loại bỏ J-locus và đột biến C-kappa; OmniFlic, là chuột biến đổi gen có biểu hiện gen nội tiết miễn dịch của chuột bị bất hoạt và đồng thời được nuôi cấy để chứa các loci globulin miễn dịch tái tổ hợp của người có duy nhất một chuỗi nhẹ VkJk thông thường, được sắp xếp lại và chuỗi nặng chức năng. Thông tin chi tiết có thể được tìm thấy tại:

Osborn M. et al, *Journal of Immunology*, 2013, 190: 1481-90; Ma B. et al, *Journal of Immunological Methods* 400–401 (2013) 78-86; Geurts A. et al, *Science*, 2009, 325:433; U.S. Pat. 8,907,157; EP patent 2152880B1; EP patent 2336329B1, tất cả đều được kết hợp trong tài liệu này qua dẫn chiếu toàn bộ. Động vật biến đổi gen thích hợp khác cũng có thể được sử dụng, ví dụ như chuột HuMab (xem chi tiết, Lonberg, N. et al. *Nature* 368(6474): 856 859 (1994)), Xeno-Mouse (Mendez et al. *Nat Genet.*, 1997, 15:146–156), TransChromo Mouse (Ishida et al. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4:91–102) and VelocImmune Mouse (Murphy et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111:5153–5158), Kymouse (Lee et al. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 356-363), và thỏ biến đổi gen (Flisikowska et al. *PLoS One*, 2011, 6:e21045).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể lạc đà đơn miền, đoạn kháng thể đôi (diabody), scFv, dime scFv, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv- dsFv', đoạn Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, đoạn kháng thể đôi ds, đoạn kháng thể siêu nhỏ, kháng thể miền hoặc một kháng thể miền hai hóa trị.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn chứa vùng cố định liên kết globulin miễn dịch. Theo một số phương án, vùng cố định liên kết globulin miễn dịch bao gồm vùng cố định của chuỗi nặng và/hoặc vùng cố định của chuỗi nhẹ. Vùng cố định của chuỗi nặng bao gồm vùng CH1, CH1-CH2, hoặc CH1-CH3. Theo một số phương án, vùng cố định có thể bao gồm một hoặc nhiều biến đổi để đem lại các đặc tính mong muốn. Ví dụ, vùng cố định có thể được biến đổi để hạn chế hoặc làm mất một hoặc nhiều chức năng tác động để cải thiện khả năng liên kết của thụ thể FcRn, hoặc để đưa vào một hoặc nhiều phần dư cystein.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn chứa liên hợp. Có thể dự tính rằng một loạt các liên hợp có thể được liên kết với các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này (xem, ví dụ: "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger

Press, New York, (1989)). Các liên hợp này có thể liên kết với các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bằng cách liên kết cộng hóa trị, liên kết ái lực, trộn hợp, liên kết cộng hóa trị phối hợp, phức hợp, kết hợp, pha trộn hoặc bổ sung, trong số các phương pháp khác. Theo các phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này có thể được nuôi cấy để chứa các vị trí cụ thể bên ngoài phần liên kết epitop mà có thể được sử dụng để liên kết với một hoặc nhiều liên hợp. Ví dụ, một địa điểm như vậy có thể bao gồm một hoặc nhiều phần dư axit amin phản ứng, ví dụ như phần dư cystein hoặc histidin, để tạo điều kiện liên kết cộng hóa trị với liên hợp. Theo các phương án nhất định, các kháng thể có thể liên kết với liên hợp một cách gián tiếp, hoặc thông qua liên hợp khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được liên hợp với biotin, sau đó liên kết gián tiếp với liên hợp thứ hai mà đã được liên hợp với avidin. Liên hợp này có thể là một nhãn có thể phát hiện được, phân tử biến đổi được động học, phân phân tử tinh chế, hoặc phân tử gây độc tế bào. Ví dụ về nhãn có thể phát hiện được có thể bao gồm các nhãn huỳnh quang (ví dụ huỳnh quang, rhodamin, dansyl, phycoerythrin hoặc Texas Red), nhãn enzym-chất nền (ví dụ peroxidaza cải ngựa, phosphataza kiềm, luciferase, glucoamylas, lyszym, sacharit oxidaza hoặc β -D- galactosidaza), hạt nhân phóng xạ (ví dụ, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , và ^{32}P , other lanthanit, nhãn phát quang), phân tử mang màu, digoxigenin, biotin/avidin, phân tử ADN hoặc vàng để phát hiện. Theo các phương án nhất định, liên hợp này có thể là một phân tử biến đổi được động học như PEG giúp gia tăng chu kỳ bán rã của kháng thể. Các polyme phù hợp khác bao gồm, như cacboxymetyl xenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, copolyme của etylen glycol/propylen glycol, và các chất tương tự. Theo các phương án nhất định, liên hợp này có thể là phân phân tử tinh chế ví dụ như hạt từ tính. “Phân phân tử gây độc tế bào” có thể là bất kỳ tác nhân mà gây hại đối với các tế bào hoặc có thể gây tổn hại hoặc diệt tế bào. Các ví dụ về phân phân tử gây độc tế bào bao gồm nhưng không giới hạn trong số taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin,

etoposide, tenoposide, vincristin, vinblastin, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dion, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, -dehydrotestosterone, glucocorticoid, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, puromycin và các chất tương tự, các tác nhân chống chuyển hóa (ví dụ, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), các tác nhân alkyl hóa (ví dụ: mechlorethamin, thioepa chlorambucil, melanin và cis-dichlorodiamin platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracycline (ví dụ, daunorubicin (ban đầu là daunomycin) và doxorubicin), kháng sinh (ví dụ, dactinomycin (ban đầu là actinomycin), bleomycin, mithramycin và anthramycin (AMC)), và các tác nhân chống phân bào (vincristin và vinblastin).

Polynucleotit và phương pháp tái tổ hợp

Sáng chế này đề xuất các polynucleotit được phân lập mã hóa các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo các phương án nhất định, các polynucleotit được phân lập bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit như trong Bảng 1 mã hóa các trình tự CDR được đề xuất trong Bảng 1.

Theo một số phương án, các polynucleotit được phân lập mã hóa một vùng biến đổi chuỗi nặng và bao gồm trình tự được chọn từ nhóm nêu trong SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 50, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 58, SEQ ID NO: 62, và trình tự tương tự với chúng có mức độ tương đồng ít nhất 80% (ví dụ: ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99%). Theo một số phương án, các polynucleotit được phân lập mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và bao gồm trình tự được chọn từ nhóm nêu trong SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 52, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 60, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68, và trình tự tương tự với chúng có mức độ tương đồng ít nhất 80% (ví dụ: ít nhất 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98%, 99%). Theo các phương án nhất định, tỷ lệ tương đồng là do tính thoái hóa mã di truyền, trong khi trình tự protein mã hoá vẫn không thay đổi.

Các polynucleotit được phân lập mã hóa các kháng thể kháng PD-1 và mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, bao gồm các trình tự trong Bảng 1) có

thể được chèn vào vật truyền để nhân bản tiếp (khuếch đại ADN) hoặc để biểu hiện, sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp được biết đến trong lĩnh vực. Theo một phương án khác, kháng thể có thể được tạo ra bởi việc tái tổ hợp đồng nhất được biết đến trong lĩnh vực. ADN mã hoá kháng thể đơn dòng được phân lập dễ dàng và sắp xếp trình tự sử dụng quy trình thông thường (ví dụ bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể). Có nhiều vật truyền có sẵn. Các thành phần vật truyền thường bao gồm, nhưng không giới hạn, một hoặc nhiều các yếu tố sau: trình tự thông báo, gốc của sao chép, một hoặc nhiều gen tín hiệu, yếu tố khuếch đại, vùng khởi động (ví dụ SV40, CMV, EF-1 α), và trình tự chấm dứt mã hóa.

Theo một số phương án, hệ thống vật truyền bao gồm các lớp thú, vi khuẩn, nấm men, v.v., và bao gồm các plasmit như, nhưng không giới hạn, pALTER, pBAD, pcADN, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pPLD, pVTRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 v.v. và các vật truyền trong phòng thí nghiệm và có sẵn trên thị trường khác. Các vật truyền thích hợp có thể bao gồm, plasmit, hoặc các vật truyền virus (ví dụ, retrovirus tái tạo không hoàn toàn, adenovirus và các virus liên quan đến adeno).

Các vật truyền chứa trình tự polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có thể được đưa vào một tế bào chủ để nhân bản hoặc biểu hiện gen. Các tế bào chủ thích hợp để nhân bản hoặc biểu hiện ADN trong các vật truyền trong tài liệu này là các tế bào sinh vật nhân sơ, nấm men, hoặc tế bào bậc cao của sinh vật nhân thực được mô tả ở trên. Các sinh vật nhân sơ thích hợp cho mục đích này bao gồm vi khuẩn, thí dụ như Gram âm hoặc Gram dương, ví dụ như họ Enterobacteriaceae như *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ như *Serratia marcescens*, và *Shigella*, cũng như trực khuẩn như *B. subtilis* và *B. licheniformis*, *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*.

Ngoài các sinh vật nhân sơ, các vi sinh vật nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men thích hợp cho việc nhân bản nhân hoặc biểu hiện tế bào chủ cho các vật

truyền mã hoá kháng thể kháng PD-1. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc men làm bánh thông thường, được sử dụng phổ biến nhất trong số các vi sinh vật bậc thấp có nguồn gốc sinh vật nhân thực. Tuy nhiên, một số chi, loài và chủng khác thường có sẵn và hữu ích trong tài liệu này, chẳng hạn như *Schizosaccharomyces pombe*; Các tế bào chủ *Kluyveromyces* ví dụ là *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, *Aspergillus* và các tế bào chủ như *A. nidulans* và *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện các kháng thể được glycosyl hóa hoặc mảnh kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này có nguồn gốc từ các sinh vật đa bào. Ví dụ về các tế bào không xương bao gồm tế bào của thực vật và côn trùng. Đã xác định được rất nhiều chủng và biến thể của vi khuẩn và các tế bào chủ côn trùng tùy chọn tương ứng từ các vật chủ như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), muỗi *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (fruitfly) và *Bombyx mori*. Một loạt chủng virus để chuyển nhiễm có sẵn công khai, ví dụ như biến thể L-1 của *Autographa californica* NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và những virus như vậy có thể được sử dụng như virus theo sáng chế trong tài liệu này, đặc biệt cho sự chuyển nhiễm của tế bào *Spodoptera frugiperda*. Việc nuôi cấy tế bào thực vật của bông, ngô, khoai tây, đậu tương, Dã yên thảo, cà chua và thuốc lá cũng có thể được sử dụng như vật chủ.

Tuy nhiên, sự quan tâm lớn nhất đối với các tế bào động vật có xương, và sự phát triển của tế bào động vật có xương (nuôi cấy mô) đã trở thành một quy trình thông thường. Ví dụ về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận của khỉ được biến đổi bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng tế bào thận của người (293 hoặc 293 tế bào được tái tạo dòng để tăng trưởng trong môi trường huyền phù, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); tế bào thận của

chuột hàng sơ sinh (BHK, ATCC CCL 10); Tế bào buồng trứng của chuột lang Trung Quốc/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); tế bào thận của khỉ (CV1 ATCC CCL 70); Tế bào thận của khỉ châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587); tế bào ung thư cổ tử cung của người (HELA, ATCC CCL 2); tế bào thận của chó (MDCK, ATCC CCL 34); các tế bào gan chuột buffalo (BRL3A, ATCC CRL 1442); tế bào phôi của người (W138, ATCC CCL 75); tế bào gan của người (Hep G2, HB 8065); khối u vú của chuột (MMT 060562, ATCC CCL51); Tế bào TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad.Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2). Theo một số phương án ưu tiên, tế bào chủ là tế bào 293F.

Các tế bào chủ được biến đổi với các biểu hiện được mô tả ở trên hoặc các vật truyền nhân bản để sản xuất kháng thể kháng PD-1 và nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được biến đổi thích hợp để kích thích vùng khởi động, chọn các biến đổi hoặc khuếch đại các gen mã hoá trình tự mong muốn.

Các tế bào chủ được sử dụng để tạo ra các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này có thể được nuôi cấy trong một môi trường đa dạng. Các môi trường có sẵn có trên thị trường như Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM), Sigma, RPM 1640 (Sigma), và Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, bất kỳ môi trường được mô tả trong Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), U.S. Pat. No. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; or U.S. Pat. Re. 30,985 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ. Bất kỳ môi trường nào trong số các môi trường này có thể được bổ sung khi cần với các hoóc môn và/hoặc các yếu tố tăng trưởng khác (như insulin, transferrin, hoặc yếu tố tăng trưởng biểu bì), muối (như natri clorua, canxi, magiê và phosphat), các chất đệm (như HEPES), nucleotit (như adenosine và thymidine), kháng sinh (như thuốc GENTAMYCINTM), các yếu tố vi lượng (được định nghĩa là các hợp chất vô cơ thường có mặt ở nồng độ cuối trong dải micromol) và glucoza hoặc nguồn

năng lượng tương tự. Các yếu tố bổ sung cần thiết khác cũng có thể được sử dụng ở nồng độ thích hợp mà đã biết bởi những chuyên gia trong lĩnh vực. Các điều kiện nuôi cấy, chẳng hạn như nhiệt độ, độ pH, và điều kiện tương tự, là những điều kiện được sử dụng trước đó với tế bào chủ được chọn để biểu hiện và sẽ rõ ràng đối với các chuyên gia trong lĩnh vực.

Khi sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản sinh trong tế bào, trong chu chất, hoặc trực tiếp được cấy vào môi trường. Nếu kháng thể được tạo ra bên trong tế bào, như bước thứ nhất, các mảnh hạt, là các tế bào chủ hoặc các mảnh được phân giải, sẽ được loại bỏ, ví dụ bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) mô tả quy trình để phân lập các kháng thể được cấy vào chu chất của *E. coli*. Tóm lại, việc dán tế bào được làm tan khi có mặt của natri axetat (pH 3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonyl florua (PMSF) trong khoảng 30 phút. Mảnh tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Nơi mà kháng thể được cấy trong môi trường, dịch bề mặt từ các hệ thống biểu hiện này thường đầu tiên được tập trung bằng cách sử dụng bộ lọc tập trung protein có sẵn trên thị trường, ví dụ như thiết bị siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể được đưa vào trong bước bất kỳ nêu trên để ức chế sự phân giải protein và các kháng sinh có thể được đưa vào để ngăn ngừa sự sinh trưởng của các tác nhân gây ô nhiễm ngẫu nhiên.

Các kháng thể được điều chế từ tế bào có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, sắc ký trao đổi ion DEAE-xenloluza, kết tủa amoni sulfat, loại muối, sắc ký ái lực, với sắc ký ái lực là kỹ thuật tinh chế được ưu tiên. Sự thích hợp của protein A như phối tử ái lực phụ thuộc vào các loài và isotype của bất kỳ miền Fc globulin miễn dịch nào có mặt trong kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế các kháng thể dựa trên các chuỗi nặng của gamma1, .gamma.2 hoặc .gamma.4 (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein G được khuyến dùng cho tất cả các isotype của chuột và gamma.3 đối với người (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Ma trận mà phối tử liên kết với thường là agarose, nhưng ma trận khác là có sẵn. Các ma trận ổn định về mặt cơ học như thủy tinh xốp có kiểm soát hoặc

poly (styrenedivinyl)benzen cho phép tốc độ dòng chảy nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn so với khi sử dụng agarose. Trường hợp kháng thể chứa một miền CH₃, nhựa Bakerbond ABX.TM. (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) là hữu ích cho việc tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein như chưng cất trên cột trao đổi ion, kết tủa ethanol, HPLC pha đảo, sắc ký trên silic, sắc ký trên SEPHAROSE TM, sắc ký trên nhựa trao đổi cation hoặc anion (như cột axit polyaspartic), sắc ký theo điểm đẳng nhiệt, SDS-PAGE, và kết tủa sunfat amoni cũng có sẵn tùy thuộc vào kháng thể được thu hồi.

Sau bất kỳ bước tinh lọc sơ bộ nào, hỗn hợp chứa kháng thể mong muốn và các tác nhân gây ô nhiễm có thể được trải qua áp phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước với độ pH thấp bằng cách sử dụng chất đệm rửa giải ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, tốt hơn là thực hiện ở nồng độ muối thấp (ví dụ, nồng độ này nằm trong khoảng từ 0 đến 0,25M).

Kit

Sáng chế này đề xuất kit chứa các kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, kit hữu ích cho việc phát hiện sự có mặt hoặc mức độ của PD-1 trong mẫu sinh học. Mẫu sinh học có thể chứa một tế bào hoặc một mô.

Theo một số phương án, kit này chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được liên hợp với nhãn có thể phát hiện được. Theo các phương án khác, kit chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên không liên kết nhãn và còn chứa một kháng thể được liên kết nhãn thứ cấp có khả năng liên kết với kháng thể kháng PD-1 không liên kết nhãn. Kit này có thể bao gồm hướng dẫn sử dụng và gói mà tách từng phần trong kit.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với nền hoặc thiết bị hữu ích trong thử nghiệm kiểu

bánh mỳ kẹp như ELISA hoặc trong thử nghiệm miễn dịch. Nền hoặc thiết bị hữu ích có thể là, ví dụ, vi phiên và dải thí nghiệm.

Dược phẩm và phương pháp điều trị

Sáng chế này còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và một hoặc nhiều chất mang dược dụng về mặt dược liệu.

Các chất mang dược dụng để sử dụng trong tài liệu này được tiết lộ trong tài liệu này có thể bao gồm, ví dụ, chất lỏng, gel, hoặc chất mang dạng rắn, chất mang chứa nước, chất mang không chứa nước, chất chống vi trùng, chất đồng notron, chất đệm, chất chống oxy hóa, thuốc gây mê, tác nhân ngưng tụ/phân rã, chất tạo cang hoặc chất tách ion, chất pha loãng, chất phụ trợ, tá dược hoặc chất hỗ trợ không độc, các thành phần khác đã biết hoặc các hợp chất của chúng.

Các thành phần thích hợp có thể bao gồm, ví dụ, các chất chống oxy hoá, chất độn, chất kết dính, chất phân huỷ, chất đệm, chất bảo quản, chất bôi trơn, hương liệu, chất làm đặc, chất nhuộm màu, chất nhũ hoá hoặc chất làm ổn định như đường và xichlodextrin. Các chất chống oxy hoá thích hợp có thể bao gồm, ví dụ, methionin, axit ascorbic, EDTA, natri thiosulfat, bạch kim, catalas, axit xitric, cystein, thioglyxerol, axit thioglycolic, thiosorbitol, hydroxanisol được butylat hóa, hydroxytoluen được butylat hóa, và/hoặc propyl gallat. Như được bộc lộ trong tài liệu này, việc đưa vào một hoặc nhiều chất chống oxy hoá như methionin trong chế phẩm hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa một kháng thể và các liên hợp như được đề xuất trong tài liệu này làm giảm quá trình oxy hóa của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên. Sự giảm trong quá trình oxy hóa này ngăn ngừa hoặc hạn chế sự mất đi của ái lực liên kết, do đó cải thiện sự ổn định của kháng thể và tối đa hóa thời hạn sử dụng. Do đó, theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được bộc lộ trong tài liệu này và một hoặc nhiều chất chống oxy hoá như methionin. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để ngăn ngừa quá trình oxy hóa, kéo dài thời hạn sử dụng, và/hoặc nâng cao tính hiệu quả của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được đề xuất trong tài liệu này bằng cách

trộn kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên với một hoặc nhiều chất chống oxy hoá như methionin.

Để minh hoạ thêm, chất mang dược dụng có thể bao gồm, ví dụ, các chất mang chứa nước như natri clorua, Ringer's injection, chất đẳng trương, nước vô trùng, hoặc Ringer's injection dextroza và lactat hóa, các chất mang không chứa nước như dầu nền có nguồn gốc thực vật, dầu hạt bông, dầu ngô, dầu mè, dầu vừng, dầu lạc, chất chống vi trùng, chất ức chế vi khuẩn, chất ức chế nấm, chất đồng notron như natri clorua, dextroza, thuốc gây mê cục bộ ví dụ như procain hydroclorua, chất ngưng tụ và phân tán như natri cacboxymetyl Xenluloza, hydroxypropyl metyl Xenluloza, hoặc polyvinylpyrrolidon, các chất nhũ tương hóa như Polysorbate 80 (TWEEN-80), hoặc chất cation hóa hoặc tách ion như EDTA (axit etylenđiamintetraaxetic) hoặc EGTA (axit etylen glycol tetraaxetic), rượu etyl, polyetylen glycol, propylen glycol, natri hydroxit, axit clohidric, axit xitric, hoặc axit lactic. Các chất kháng khuẩn được sử dụng làm chất mang có thể được thêm vào dược phẩm trong các hộp chứa đa liều bao gồm các phenol hoặc cresol, chế phẩm thủy ngân, rượu benzyl, chlorobutanol, este axit metyl và propyl p-hydroxybenzoic, thimerosal, benzalkonium clorua và benzethonium clorua. Các tá dược thích hợp có thể bao gồm, ví dụ, nước, muối, dextroza, glyxerol, hoặc etanol. Các chất phụ trợ không độc thích hợp có thể bao gồm, ví dụ, chất làm ướt hoặc chất nhũ tương hóa, chất đệm pH, chất làm ổn định, các chất tăng cường độ hòa tan, hoặc chất như natri axetat, monoraurat sorbitan, olean triethanolamin hoặc cyclodextrin.

Dược phẩm có thể là dung dịch nước, dung dịch, nhũ tương, thuốc viên, viên nang, viên nén, chế phẩm phóng thích kéo dài hoặc bột. Chế phẩm uống có thể chứa chất mang tiêu chuẩn như các dược phẩm của mannitol, lactoza, tinh bột, magiê stearat, polyvinyl pyrrolidon, natri saccharin, xenluloza, magiê cacbonat, v.v.

Theo các phương án, dược phẩm được tạo thành một chế phẩm có thể tiêm. Dược phẩm có thể tiêm có thể được điều chế ở bất kỳ dạng thông thường nào, chẳng hạn như dung dịch lỏng, huyền phù, nhũ tương hoặc thể rắn thích hợp

để tạo thành dung dịch lỏng, huyền phù hoặc nhũ tương. Việc chuẩn bị cho việc tiêm có thể bao gồm dung dịch vô trùng và/hoặc dung dịch giảm sốt sẵn cho việc tiêm, sản phẩm hòa tan khô khử trùng, như bột đã được làm khô lạnh, sẵn để kết hợp với dung môi ngay trước khi sử dụng, bao gồm thuốc tiêm dưới da, huyền phù vô trùng sẵn cho việc tiêm, sản phẩm vô trùng khô không hòa tan sẵn để kết hợp với chất mang ngay trước khi sử dụng, nhũ tương vô trùng và/hoặc nhũ tương giảm sốt. Các dung dịch có thể chứa nước hoặc không chứa nước.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa theo liều đơn được đóng gói trong lọ nhỏ, ống nhỏ hoặc ống tiêm có kim. Tất cả các chế phẩm dành cho việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa phải là vô trùng và không gây sốt, như đã biết và thực hiện trong lĩnh vực.

Theo các phương án nhất định, bột vô trùng đã được làm khô lạnh được điều chế bằng cách hòa tan kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được trình bày trong tài liệu này trong dung môi thích hợp. Dung môi có thể chứa tá dược cải thiện tính ổn định hoặc thành phần dược liệu khác của bột hoặc dung dịch được pha chế lại được điều chế từ bột. Tá dược có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn, trong số nước, dextroza, sorbital, fructoza, sirô ngô, xylitol, glyxerin, glucoza, sucroza hoặc các tá dược thích hợp khác. Dung môi này có thể chứa chất đệm, như xitrat, natri hoặc kali phosphat hoặc chất đệm khác đã biết bởi các chuyên gia trong lĩnh vực, theo một phương án, về độ pH trung tính. Việc lọc vô trùng sau đó của dung dịch tiếp theo việc làm khô theo các điều kiện chuẩn đã biết bởi các chuyên gia trong lĩnh vực này tạo ra chế phẩm mong muốn. Theo một phương án, dung dịch thu được sẽ được phân bố vào các lọ để làm khô lạnh. Mỗi lọ có thể chứa liều đơn hoặc nhiều liều của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc chế phẩm của chúng. Việc làm đầy các lọ với lượng nhỏ trên mức cần thiết cho một liều hoặc nhiều liều (ví dụ khoảng 10%) là chấp nhận được để tạo điều kiện cho việc thu hồi mẫu và dùng liều chính

xác. Bột được làm đông lạnh có thể được lưu trữ trong điều kiện thích hợp, chẳng hạn như nằm trong khoảng từ 4°C đến nhiệt độ phòng.

Việc tái cấu trúc của bột được làm đông lạnh với nước để tiêm cho ra chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Theo một phương án, để tái cấu trúc nước vô trùng và/hoặc nước giảm sốt hoặc chất mang dạng lỏng thích hợp khác được đưa vào bột được làm đông lạnh. Lượng chính xác tùy thuộc vào liệu pháp đã chọn, và có thể được xác định theo thử nghiệm.

Phương pháp điều trị cũng được đề xuất, bao gồm: sử dụng lượng hiệu quả điều trị kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được đề xuất trong tài liệu này cho đối tượng cần điều trị, nhờ đó điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng hoặc rối loạn có liên quan đến PD-1. Trong một khía cạnh khác, phương pháp được đề xuất để điều trị tình trạng trong đối tượng có thể hưởng lợi từ việc tăng cường điều chỉnh của đáp ứng miễn dịch, bao gồm việc sử dụng lượng hiệu quả điều trị kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được đề xuất trong tài liệu này cho đối tượng cần nó.

Lượng điều trị tối đa của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như trọng lượng cơ thể, tuổi tác, bệnh sử, liệu pháp hiện tại, tình trạng sức khỏe của đối tượng và tiềm năng phản ứng chéo, dị ứng, nhạy cảm và các phản ứng phụ bất lợi, cũng như đường sử dụng và mức độ phát triển khối u. Các liều có thể được giảm hoặc tăng cân đối bởi chuyên gia thông thường trong lĩnh vực (tức là, bác sĩ hoặc bác sĩ thú y) được chỉ định bởi các chuyên gia như vậy và các hoàn cảnh hoặc yêu cầu khác.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này có thể được sử dụng với liều hiệu quả điều trị nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến khoảng 100mg/kg (ví dụ khoảng 0,01mg/kg, khoảng 0,5mg/kg, khoảng 1mg/kg, khoảng 2mg/kg, khoảng 5mg/kg, khoảng 10mg/kg, khoảng 15mg/kg, khoảng 20mg/kg, khoảng 25mg/kg, khoảng 30mg/kg, khoảng 35mg/kg, khoảng 50mg/kg, khoảng 55mg/kg, khoảng 60mg/kg, khoảng 65mg/kg, khoảng 70mg/kg, khoảng 75mg/kg, khoảng 80mg/kg, khoảng

85mg/kg, khoảng 90mg/kg, khoảng 95mg/kg, hoặc khoảng 100mg/kg). Theo các phương án nhất định này, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được sử dụng tại liều lượng khoảng 50mg/kg hoặc thấp hơn, và theo các phương án nhất định này, liều lượng là 10mg/kg hoặc thấp hơn, 5mg/kg hoặc ít hơn, 1mg/kg hoặc ít hơn, 0,5mg/kg hoặc thấp hơn, hoặc 0,1mg/kg hoặc thấp hơn. Theo các phương án nhất định, liều lượng sử dụng có thể thay đổi trong quá trình điều trị. Ví dụ, theo các phương án nhất định, liều lượng sử dụng ban đầu có thể cao hơn liều lượng sử dụng tiếp theo. Theo các phương án nhất định, liều lượng sử dụng có thể khác nhau trong quá trình điều trị tùy thuộc vào phản ứng của người bệnh.

Chế độ sử dụng liều có thể được điều chỉnh để đem lại phản ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, phản ứng điều trị). Ví dụ, liều đơn có thể được sử dụng, hoặc một số liều được chia ra có thể được sử dụng theo thời gian.

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này có thể được sử dụng qua đường bất kỳ trong lĩnh vực, ví dụ như tiêm dưới da (ví dụ tiêm dưới da, màng bụng, tĩnh mạch, kể cả tiêm truyền tĩnh mạch, tiêm bắp, hoặc tiêm trong da) hoặc các đường không dưới da (ví dụ miệng, mũi, trong mắt, dưới lưỡi, trực tràng, hoặc cục bộ).

Tình trạng và rối loạn liên quan đến PD-1 có thể là bệnh hoặc rối loạn liên quan đến miễn dịch. Theo các phương án nhất định, tình trạng và rối loạn liên quan đến PD-1 bao gồm khối u và ung thư, ví dụ như ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư tế bào thận, ung thư kết tràng, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư bàng quang, ung thư thực quản, u trung biểu mô, khối u ác tính, ung thư đầu cổ, ung thư tuyến giáp, sacôm, ung thư tuyến tiền liệt, u nguyên bào đệm, ung thư cổ tử cung, ung thư biểu mô tuyến giáp, ung thư bạch cầu, ung thư bạch huyết, u tủy, u sùi dạng nấm, ung thư tế bào merkel, và các bệnh lý huyết học ác tính khác ví dụ như ung thư Hodgkin (CHL), ung thư tế bào lympho B lớn trung thất chính, ung thư lympho B giàu mô bào/tế bào T, dương tính với EBV dương tính và u lympho thể lan toả tế bào B lớn liên quan tới EBV (DLBCL), lympho nguyên bào tương, u lympho tế bào T/NK/, lympho tràn dịch nguyên phát liên quan HHV8, u lympho

Hodgkin, u hệ thần kinh trung ương (CNS), ví dụ như u lympho CNS nguyên phát, u cột sống, u thần kinh đệm thân não. Theo các phương án nhất định, khối u và ung thư là di căn, đặc biệt là khối u di căn biểu hiện PD-L1. Theo các phương án nhất định, tình trạng và rối loạn liên quan đến PD-1 bao gồm các bệnh tự miễn dịch, như lupus ban đỏ hệ thống (SLE), vẩy nến, xơ cứng bì toàn thân, tiểu đường tự miễn dịch và các bệnh tương tự. Theo các phương án nhất định, tình trạng và rối loạn liên quan đến PD-1 bao gồm các bệnh truyền nhiễm như nhiễm virus mãn tính, ví dụ, nhiễm virus viêm gan B, viêm gan C, virus mụn rộp, virus Epstein-Barr, HIV, virus cytomegalo, virus herpes simplex loại I, virus herpes simplex 2, virus HPV, virus adeno, virus Kaposi West sarcoma liên quan đến dịch bệnh virus herpes, virus vòng mỏng (Torquetenovirus), virus JC hoặc vi rút BK.

Phương pháp sử dụng

Sáng chế này còn đề xuất phương pháp sử dụng các kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, sáng chế này đề xuất các phương pháp điều trị tình trạng hoặc rối loạn liên quan đến PD-1 ở một cá nhân, bao gồm việc sử dụng lượng hiệu quả điều trị kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo các phương án nhất định, cá nhân đã được xác định là có rối loạn hoặc tình trạng có thể phản ứng với chất đối vận PD-1.

Sự có mặt hoặc mức độ PD-L1 trên một mẫu sinh học mong muốn có thể chỉ ra liệu cá thể mà mẫu sinh học bắt nguồn có thể ứng với chất đối vận PD-1. Phương pháp khác nhau có thể được sử dụng để xác định sự có mặt hoặc mức độ của PD-L1 trong mẫu sinh học thử nghiệm từ cá nhân này. Ví dụ, mẫu sinh học thử nghiệm có thể được tiếp xúc với kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh kháng thể của nó mà liên kết và phát hiện protein PD-L1 được biểu hiện. Ngoài ra, PD-L1 cũng có thể được phát hiện ở mức độ biểu hiện axit nucleic, sử dụng các phương pháp như qPCR, mã hóa ngược PCR, phương pháp vi mạng, SAGE, FISH, và phương pháp tương tự. Theo một số phương án, mẫu thử nghiệm được lấy từ tế bào hoặc mô ung thư, hoặc các tế bào miễn dịch xâm nhập khối u. Theo các phương án nhất định, sự có mặt hoặc mức độ tăng cường điều chỉnh của PD-

L1 trong mẫu sinh học thử nghiệm cho thấy khả năng phản ứng. Thuật ngữ "tăng cường điều chỉnh" được sử dụng trong tài liệu này, đề cập đến mức tăng tổng thể không thấp hơn 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% , 65%, 70%, 75%, 80% hoặc cao hơn, ở mức protein của PD-L1 trong mẫu thử nghiệm được phát hiện sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đề xuất trong tài liệu này, so với mức protein Protein PD-L1 một mẫu tham chiếu được phát hiện sử dụng cùng một kháng thể. Mẫu tham chiếu có thể là mẫu đối chứng thu được từ một cá thể khỏe mạnh hoặc không mắc bệnh, hoặc mẫu khỏe mạnh hoặc không mắc bệnh thu được từ cùng một cá nhân mà mẫu xét nghiệm thu được. Ví dụ, mẫu tham chiếu có thể là mẫu không mắc bệnh gần với hoặc trong vùng lân cận của mẫu thử nghiệm (ví dụ khối u).

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều các liệu pháp điều trị hoặc tác nhân bổ sung. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này có thể được kết hợp với hóa trị liệu, xạ trị, phẫu thuật điều trị ung thư (ví dụ phẫu thuật khối u), một hoặc nhiều thuốc chống nôn hoặc các phương pháp điều trị khác cho các biến chứng phát sinh từ hóa trị liệu, hoặc bất kỳ thuốc điều trị khác để sử dụng trong điều trị ung thư hoặc bất kỳ rối loạn bệnh lý được bắt nguồn từ PD-1. Theo các phương án nhất định này, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này mà được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung có thể được dùng cùng lúc với một hoặc nhiều thuốc điều trị bổ sung, và theo các phương án nhất định này kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên và chất điều trị bổ sung có thể được sử dụng như một phần của cùng một dược phẩm. Tuy nhiên, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được sử dụng "kết hợp" với một chất điều trị khác không nhất thiết phải được dùng cùng lúc với hoặc trong cùng một chế phẩm với chất này. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được sử dụng trước hoặc sau chất khác được coi là được sử dụng "kết hợp" với chất này như một cụm từ được sử dụng trong tài liệu này, ngay cả khi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên và chất thứ hai được sử dụng theo các đường khác nhau. Nếu có thể, tác nhân điều trị bổ sung

kết hợp với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong tài liệu này được thực hiện theo lộ trình được liệt kê trong tờ thông tin sản phẩm của tác nhân điều trị bổ sung hoặc theo the Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (tháng 11, 2002)) hoặc quy chuẩn đã biết trong lĩnh vực.

Theo các phương án nhất định, tác nhân điều trị có thể kích thích hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại ung thư. Ví dụ, vắc xin cho khối u có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch đối với một khối u nhất định hoặc ung thư. Liệu pháp xytokin cũng có thể được sử dụng để tăng cường sự có mặt của kháng nguyên khối u đối với hệ thống miễn dịch. Các ví dụ về điều trị bằng xytokin bao gồm nhưng không giới hạn trong số các interferon như interferon- α , - β , và - γ , yếu tố kích thích cụm khuẩn như đại thực bào-CSF, và bạch cầu hạt-CSF, interleukin ví dụ như 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 và IL-12, các yếu tố hoại tử khối u như TNF- α và TNF- β . Tác nhân mà làm bất hoạt các mục tiêu ức chế miễn dịch cũng có thể được sử dụng, ví dụ, các tác nhân ức chế TGF-beta, IL-10, và tác nhân ức chế phối tử Fas. Nhóm các tác nhân khác bao gồm các tác nhân mà hoạt hóa đáp ứng miễn dịch đối với khối u hoặc tế bào ung thư, ví dụ như tăng cường hoạt tính của tế bào T (ví dụ như chất đối vận của phân tử đồng kích thích tế bào T như CTLA-4, ICOS và OX-40) và các tế bào này tăng cường chức năng tế bào tua và sự có mặt của kháng nguyên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được cung cấp để thể hiện tốt hơn sáng chế được yêu cầu bảo hộ và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Tất cả các chế phẩm, chất và phương pháp cụ thể được mô tả dưới đây, toàn bộ hoặc một phần nằm trong phạm vi của sáng chế. Các chế phẩm, chất và phương pháp này không nhằm mục đích giới hạn sáng chế này, mà chỉ nhằm minh họa các phương án cụ thể thuộc phạm vi của sáng chế này. Chuyên gia trong lĩnh vực có thể phát triển chế phẩm, chất và phương pháp tương đương mà không cần sử dụng năng lực sáng tạo và không rời khỏi phạm vi của sáng chế. Cần được hiểu rằng nhiều biến thể

có thể được thực hiện trong các quy trình được mô tả dưới đây trong khi vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế. Mục đích của tác giả phát minh là các biến thể này được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể tế bào lai

1.1 Sự tạo ra kháng nguyên: Các ADN mã hoá ECD PD-1 và PD-L1 hoặc chiều dài hoàn chỉnh được tổng hợp và chèn vào trong vật truyền biểu hiện pcADN3.3. Điều chế tối đa các ADN plasmit và các trình tự ADN chèn được xác định bằng cách sắp xếp. Việc dung hợp protein liên kết PD-1 ECD và PD-L1 ECD có chứa các thể khác nhau, bao gồm Fc của người, Fc của chuột và thể His, thu được bằng cách chuyển nhiễm ECD PD-1 của người vào các tế bào CHO-S hoặc HEK293. Sau 5 ngày, dịch bề mặt thu được từ nuôi cấy của tế bào được chuyển nhiễm nhất thời đã được sử dụng để tinh chế protein. Protein dung hợp được tinh chế và định lượng để sử dụng cho việc tạo miễn dịch và sàng lọc.

1.2 Sự hình thành các dòng tế bào ổn định. Để thu được công cụ cho việc sàng lọc và xác nhận kháng thể, chúng tôi đã tạo ra các dòng tế bào chuyển nạp PD-1 và PD-L1. Trong thời gian niên kết, tế bào CHO-K1, 293F hoặc Ba/F3 đã được chuyển nhiễm với vật truyền biểu hiện pCND3.3 chứa PD-1 hoặc PD-L1 sử dụng sử dụng kit chuyển nhiễm Lipofectamine 2000 theo quy chuẩn của nhà sản xuất. Tại 48 đến 72 giờ sau khi chuyển nhiễm, tế bào được chuyển nhiễm đã được nuôi cấy trong môi trường chứa Blasticidin hoặc G418 cho việc chọn. Cuối cùng, việc này sẽ chọn tế bào được kết hợp ổn định gen PD-1 hoặc PD-L1 vào ADN di truyền của chúng. Trong khi, tế bào đã được kiểm tra cho biểu hiện gen PD-1 và PD-L1 mong muốn. Một khi biểu hiện đã được xác minh, clon đơn mong muốn được chọn lọc bởi sự pha loãng có giới hạn và tăng thể tích lớn. Dòng tế bào đơn dòng được duy trì trong môi trường chứa liều lượng thấp của kháng sinh Blasticidin hoặc G418.

1.3 Sự tạo ra kháng thể tế bào lai.

1.3.1 Tạo miễn dịch và dung hợp tế bào: chuột OMT (lấy từ Open Monoclonal Technology, Inc., Palo Alto, US), nằm trong khoảng từ 8 đến 10 tuần tuổi, được tạo miễn dịch bằng 10 µg protein ECD PD-1 của người trong TiterMax

tại bàn chân để tăng cường lần thứ nhất, lặp lại việc tạo miễn dịch mỗi 3 ngày với protein ECD PD-1 trong nhôm. Chuột bị làm chảy máu mỗi hai tuần để lấy huyết thanh và hàm lượng kháng thể được đo bằng phương pháp ELISA hoặc FACS. Khi hàm lượng kháng thể đạt đến mức cao, chuột được tăng cường lần cuối cùng mà không có chất bổ trợ (thêm 100 μ l 1XPBS thay vào đó) và sự dung hợp tế bào được thực hiện như sau: tế bào lympho B phân lập từ hạch bạch huyết của chuột OMT đã được tạo miễn dịch được kết hợp với tế bào tủy (ở tỷ lệ 1:1). Hỗn hợp tế bào được rửa sạch và ngưng tụ với dung dịch ECF nằm trong khoảng từ 5 đến 10ml. Thêm dung dịch ECF để điều chỉnh nồng độ lên 2×10^6 tế bào/ml. Sau khi dung hợp tế bào bằng điện, huyền phù tế bào từ buồng dung hợp đã được chuyển ngay vào ống vô trùng chứa lượng lớn hơn của môi trường. Sau khi ủ trong hơn 24 giờ ở 37°C , huyền phù tế bào được trộn và hút vào đĩa có 96 lỗ (0.5×10^6 tế bào/tấm). Tế bào được ủ ở 37°C , 5% CO_2 . Khi clon đủ lớn, chuyển 100 μ l dịch bề mặt từ đĩa có 96 lỗ để thử nghiệm cho việc sàng lọc kháng thể.

1.3.2 Sàng lọc lần thứ nhất và xác nhận dịch bề mặt tế bào lai: thử nghiệm ELISA được sử dụng như phương pháp sàng lọc lần thử nhất để kiểm tra liên kết của của dịch bề mặt tế bào lai với protein PD-1. Tóm lại, tấm (Nunc) được bao phủ với protein hòa tan trong miễn ngoài tế bào PD-1 của người ở $1 \mu\text{g/ml}$ qua đêm ở 4°C . Sau khi chặn và rửa, dịch bề mặt tế bào lai được chuyển vào đĩa được bao phủ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa sau đó được rửa và sau đó ủ với IgG1 HRP (Bethyl) chuột kháng kháng thể dê và IgP HR2 (Bethyl) chuột kháng kháng thể dê trong 45 phút. Sau khi rửa, nền TMB đã được thêm và sự tương tác đã được dừng lại bởi HCl 2M. Độ hấp thụ ở bước sóng 450nm đã được đọc bằng cách sử dụng máy đọc vi phiên (Molecular Device). Để xác nhận liên kết nguyên thể của kháng thể PD-1 trên các phân tử cấu trúc PD-1 biểu hiện trên màng tế bào, phân tích FACS được thực hiện trên dòng tế bào CHO-S chuyển nhiễm PD-1. Tế bào CHO-S biểu hiện PD-1 của người được chuyển vào đĩa đáy chữ U có 96 lỗ (BD) ở mật độ 1×10^6 tế bào/ml. Dịch bề mặt tế bào lai sau đó được chuyển sang các đĩa và ủ trong 1 giờ ở 4°C . Sau khi rửa bằng 1XPBS/1% BSA, FITC chuột kháng kháng thể dê thứ cấp (Jackson ImmunoResearch Lab) được áp dụng và ủ

với tế bào ở 4°C trong bóng tối trong 1 giờ. Tế bào sau đó được rửa sạch và được tái huyền phù trong 1XPBS/1% BSA hoặc cố định với 4% paraformaldehyt, và được phân tích bằng phân tích tế bào theo dòng chảy (BD). Kháng thể liên kết với dòng tế bào CHO-S tiền thân được thực hiện bằng phương pháp tương tự. Hình 1 cho thấy sự liên kết của các kháng thể PD-1 kháng người với tế bào CHO biểu hiện PD-1. Tế bào CHO được chuyển nhiễm với PD-1 của người có độ dài hoàn chỉnh được chuyển nhiễm bằng kháng thể kháng PD-1 của người từ tế bào lai của chuột, tiếp theo là chuyển nhiễm kháng thể thứ 2 với FITC được liên hợp với Fc dê kháng IgG chuột và phân tích bằng FACS. Dữ liệu cho thấy các kháng thể liên kết đặc hiệu với PD-1 biểu hiện trên tế bào CHO.

Để kiểm tra ái lực liên kết của kháng thể với PD-1 nguyên thể đã được biểu hiện trên tế bào T CD4⁺ của người, tế bào T CD4⁺ của người được tạo ra từ PBMC đã được nuôi cấy trong IL-2 và OKT3 trong 3 ngày và được chuyển nhiễm với kháng thể đối với PD-1 của người. Việc liên kết của kháng thể với PD-1 trên tế bào T được phân tích bằng FACS. Như thể hiện trong hình 3, phân tích FACS cho thấy kháng thể liên kết đặc hiệu với PD-1 nguyên thể đã được biểu hiện trên tế bào T CD4⁺.

Kiểm tra hoạt tính ngăn chặn của kháng thể đã được sử dụng như màng lọc xác nhận để chọn các kháng thể kháng thể HIT tiềm ẩn. Kháng thể đã được chọn được kiểm tra về khả năng ngăn chặn sự liên kết của phối tử PD-L1 với các tế bào CHO-S đã được chuyển nhiễm PD-1 bởi phân tích FACS. Tế bào CHO-S biểu hiện PD-1 của người được chuyển tới đĩa đáy chữ U có 96 lỗ (BD) ở mật độ 1x10⁶ tế bào/ml. Kháng thể được pha loãng từng kỳ trong chất đệm rửa (1XPBS / 1% BSA) và ủ với tế bào ở 4°C trong 1 giờ. Sau khi rửa, protein PD-L1 người dung hợp Fc người đã được thêm vào và ủ ở 4°C trong 1 giờ. Kháng thể FITC IgG Fc người kháng kháng thể dê thứ cấp (không có phản ứng chéo với IgG Fc chuột, Jackson ImmunoResearch Lab) đã được ủ với tế bào ở 4°C trong bóng tối trong 1 giờ. Tế bào sau đó được rửa sạch và được tái huyền phù trong 1XPBS/1% BSA

hoặc cố định với 4% paraformaldehyt, và được phân tích bằng phân tích tế bào theo dòng chảy (BD).

1.3.3 Tái tạo dòng tế bào lai: một khi việc liên kết và ngăn chặn đặc hiệu đã được xác định thông qua sàng lọc thứ nhất và xác định, dòng tế bào của tế bào lai dương tính có thể được sử dụng để tái tạo dòng. Tóm lại, đối với mỗi dòng tế bào của tế bào lai, tế bào được đếm và pha loãng để cho 5 tế bào/lỗ, 1 tế bào/lỗ và 0,5 tế bào/lỗ trong môi trường clon. Đĩa 200µl/lỗ vào đĩa có 96 lỗ, một đĩa 5 tế bào/lỗ, một đĩa 1 tế bào/lỗ và 4 đĩa tại 0.5 tế bào/lỗ. Đặt tất cả các đĩa trong thiết bị ủ ở 37°C, 5% CO₂. Ủ cho đến khi tất cả các dòng tế bào có thể được kiểm tra bằng phương pháp ELISA.

Ví dụ 2: Trình tự tế bào lai của kháng thể và đặc tính kháng thể của người hoàn chỉnh

2.1 Trình tự tế bào lai của kháng thể: ARN đã được phân lập từ tế bào lai đơn dòng với thuốc thử Trizol.VH và VL của các kháng thể PD-1 được khuếch đại theo quy chuẩn sau: trong một thời gian liên kết, ARN đầu tiên được mã hóa ngược vào cADN sử dụng enzym mã hóa ngược như được mô tả dưới đây, Hệ thống phản ứng (20µl):

Chất đệm RT x 10	2,0µl
dNTP Trộn x 25 (100mM)	0,8µl
Đoạn mồi RT ngẫu nhiên/oligo dT/đoạn mồi đặc hiệu	2,0µl
Enzym mã hóa ngược MultiScribe™	1,0µl
Enzym ức chế RNase	1,0µl
ARN	2µg
H ₂ O không có nuclease	lên đến 20,0µl

Điều kiện phản ứng

	Bước 1	Bước 2	Bước 3	Bước 4
Nhiệt độ	25	37	85	4
Thời gian	10 phút	120 phút	5 phút	∞

cADN thu được được sử dụng làm kiểu mẫu cho việc khuếch đại PCR tiếp theo sử dụng đoạn mồi đặc hiệu cho gen mong muốn. Phản ứng PCR đã được thực hiện theo quy trình sau;

cADN	1 μ l
Dung dịch đệm PCR	5 μ l
dNTP	2 μ l
P1(25pM)	0,5 μ l
P2(25pM)	0,5 μ l
P2(25pM)	0,5 μ l
ddH ₂ O	40,5 μ l

Điều kiện phản ứng:

94°C 3 phút

94°C 30 giây

60°C 30 giây

72°C 1 phút

72°C 10 phút

} 30 vòng

Lấy 10 μ l của phản ứng PCR để thực hiện việc thất buộc với vật truyền pMD18-T. Thực hiện việc biến đổi các tế bào khả biến Top10 với 10 μ l sản phẩm thất buộc và chuyển hỗn hợp vào đĩa 2-YT + Cab đã được làm nóng trước đó theo

quy chuẩn, ủ qua đêm. Clon dương tính được kiểm tra bằng PCR sử dụng đoạn mồi M13-48 và M13-47 sau đó là sắp xếp trình tự.

2.2 Xây dựng phân tử kháng thể hoàn chỉnh của người: VH và VL của kháng thể PD-1 được khuếch đại như mô tả ở trên. Phản ứng PCR được tinh chế bằng kit làm sạch PCR và VL và vật truyền pCI được tiêu hóa với các enzym giới hạn Pme I và BssH II ở 37°C trong 2 giờ. Bắt đầu phản ứng trong 1% agarose và chiết xuất gel với kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự thất bại của VL đã được tiêu hóa và vật truyền pCI như sau:

Thành phần	Lượng
vật truyền pCI	80ng
Mảnh VL (chèn)	100ng
Dung dịch đệm T4 ADN	1µl
ligase	
Ligase ADN T4	0,5µl
ddH ₂ O	Lên đến 10µl

Hỗn hợp được ủ ở 16°C trong 30 phút. 10 µl của phản ứng đã được sử dụng cho sự biến đổi và tăng trưởng clon. Clon đã được xác định được sử dụng cho việc chiết xuất ADN plasmit pCI-VL. Vật truyền pCI-VL và mảnh VH sau đó được tiêu hóa với XbaI và Sal I và VH đã được tiêu hóa và tinh khiết và vật truyền được thất bại với ligase ADN T4 trong 30 phút ở 16°C. Khi trình tự của VL và VH đã được liên kết được xác nhận qua việc sắp xếp, vật truyền biểu hiện chứa toàn bộ IgG của kháng thể PD-1 của người hoàn chỉnh được sử dụng cho chuyển nhiễm nhanh chóng và phát triển dòng tế bào ổn định.

Ví dụ 3: Đặc tính kháng thể của người hoàn chỉnh

3.1 Liên kết ái lực của các kháng thể PD-1 với phân tử PD-1 bề mặt tế bào được kiểm tra bởi phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS): ái lực liên kết của kháng thể với bề mặt tế bào PD-1 được thực hiện bằng phân tích FACS. Tế bào CHO-S biểu hiện PD-1 của người đã được chuyển vào đĩa đáy chữ U có 96 lỗ (BD) ở mật độ 5×10^5 tế bào/ml. Kháng thể đã được kiểm tra được pha loãng theo

tỷ lệ 1:2 trong từng kỳ trong dung dịch đệm rửa (1XPBS/1% BSA) và ủ với tế bào ở 4°C trong 1 giờ. Kháng thể dê kháng người thứ phát IgG Fc, FITC (3,0mol FITC trên mỗi mol IgG, (Jackson ImmunoResearch Lab) đã được thêm và ủ ở 4°C trong bóng tối trong 1 giờ. Tế bào sau đó được rửa một lần và được tái huyền phù trong 1XPBS/1% BSA, và được phân tích bằng phân tích tế bào theo dòng chảy (BD). Cường độ huỳnh quang sẽ được chuyển đổi thành phân tử/tế bào dựa trên số lượng hạt Quantum™ MESF Kits, Bangs Laboratories, Inc. KD đã được tính toán bằng cách sử dụng Graphpad Prism5. Hình 2 cho thấy sự liên kết của kháng thể PD-1 của người hoàn chỉnh (tức là 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb) với PD-1 biểu hiện tế bào CHO. Kháng thể người hoàn chỉnh kháng PD-1 của người được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào CHO đã được chuyển nhiễm PD-1 và phân tích FACS cho thấy rằng kháng thể PD-1 của người hoàn chỉnh liên kết đặc hiệu với PD-1 với EC₅₀ về 2nmol/L.

HAb 1.103.11-v2 được tạo ra bởi việc đột biến axit amin đơn Asn93 (Kabat Numbering) trên kháng thể gốc 1.103.11 hAb-VH (20975-VL) tới phần dư serin để giảm nguy cơ glycosyl hóa trên phần dư CDR. Mặc dù Asn93 nằm trong CDR3 của chuỗi nhẹ, mô hình phức hợp kháng thể và kháng nguyên được tạo ra từ kỹ thuật mô hình hóa máy tính cho thấy Asn93 không có tiếp xúc trực tiếp với bất kỳ phần dư nào trên kháng nguyên của PD-1 của người.

Hầu hết các chức năng liên kết của CDR3 của chuỗi nhẹ có vẻ được góp phần bởi phần dư Tyr91 lân cận mà có tương tác với một số phần dư trên vòng lặp PD-1 FG. Thử nghiệm chức năng dựa trên tế bào của hAb3.11-v2 đã xác định được rằng đột biến không ảnh hưởng đến khả năng liên kết (xem kết quả thực nghiệm dưới đây và Hình 15 và 16). Ái lực liên ekets của hAg101.11-v2 với PD-1 của người được đo bằng thử nghiệm FACS và ELISA. Hình 16 cho thấy liên kết của các hAbs 1.103.11-v2 trong các dung dịch đệm khác nhau với PD-1 biểu hiện tế bào CHO, và liên kết cũng được kiểm tra trong điều kiện tương tự như thử nghiệm FACS như được mô tả ở trên, ngoại trừ việc kháng thể ở trong chế phẩm đệm hoặc trong 1xPBS (độ pH 7,4) và các tế bào CHO-S biểu hiện PD-1 của người đã được chuyển vào đĩa đáy chữ U có 96 lỗ (BD) với mật độ 2x10⁵ tế bào/ml. Kết

quả là tương đương đối với 1.103.11 Hab."1.103.11-v2 hAb trong dung dịch đệm" đề cập đến kháng thể trong chế phẩm đệm, và "HbA1103.11-v2 trong PBS" đề cập đến kháng thể trong 1xPBS, pH 7.4. Kháng thể trong cả hai dung dịch liên kết với bề mặt tế bào PD-1 trên tế bào CHO và không có sự khác biệt lớn về ái lực với PD-1 của người giữa hai điều kiện (với 1xPBS có nồng độ EC50 khoảng 2.52nmol/L, và chế phẩm đệm là khoảng 3,12nmol/L).

Hình 15 cho thấy việc liên kết kháng thể 1.103.11-v2 hAbs với protein PD-1 trong dung dịch khác nhau được đo bằng ELISA. Sau cùng một quy chuẩn ELISA như được mô tả ở trên, thời gian ủ đối với hAb 1.103.11-v2 là 2 giờ, và thời gian ủ đối với kháng thể đề kháng người thứ IgG, FcHRP (1:5000, Abcam) là 1 giờ."1.103.11-v2 hAb trong dung dịch đệm" đề cập đến kháng thể trong chế phẩm đệm, và "1.13.11-v2 hAb trong PBS" dùng để chỉ kháng thể trong 1xPBS (độ pH 7.4). Ái lực liên kết với PD-1 của người đã được thể hiện trong cả hai điều kiện.

Tế bào CHO biểu hiện PD-1 của người được ủ với nồng độ khác nhau của kháng thể kháng PD-1, sau đó PD-L1 người được liên kết thể Fc của chuột được thêm vào tế bào. Việc liên kết PD-L1 của người với tế bào biểu hiện PD-1 của người được phát hiện bằng cách sử dụng IgG kháng chuột đề được liên hợp-FITC, sau đó là phân tích FACS. Như thể hiện trong hình 4, kháng thể kháng PD-1 ngăn chặn sự liên kết giữa PD-L1 với PD-1 được chuyển nhiễm tế bào CHO. HAb 1.103.11-v2 cũng đã được kiểm tra cho việc ngăn chặn của liên kết giữa PD-L1 với PD-1 chuyển nhiễm tế bào CHO, và kết quả là tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.2 Ái lực liên kết động học toàn bộ được kiểm tra bằng cộng hưởng Plasmon bề mặt (SPR): Kháng thể được đặc tính cho ái lực và liên kết động học với PD-1 bằng thử nghiệm SPR sử dụng ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Protein A Protein (Sigma) đã được cố định vào một con chip cảm biến GLM (Bio-Rad) qua ghép đôi amin. Kháng thể được tinh chế đã được chảy qua chip cảm biến và bị bắt bởi Protein A. Chip được xoay 90° và rửa với dung dịch đệm đang chảy (1xPBS / 0,01% Tween 20, Bio-Rad) cho đến khi đường cơ sở ổn định. Năm nồng độ PD-

l của người và dung dịch đệm được chảy vào tế bào dòng kháng thể với tốc độ dòng chảy là 100 μ L/phút với giai đoạn liên kết trong 240 giây, sau đó là phân ly trong 600. Chip được tái tạo với độ pH 1,7 H₃PO₄ sau mỗi lần chảy. Đường cong liên kết và phân ly được làm khớp với tỷ lệ mô hình liên kết Langmiur 1: 1 bằng phần mềm ProteOn.

Như thể hiện trong hình 7, sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt, ái lực của kháng thể kháng PD-1 với PD-1 của người tái tổ hợp nằm trong khoảng từ 3,76E-9 đến 1,76E-10 mol/L. Ái lực của 1.103.11-v2 hAb dự kiến sẽ tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.3 Sàng lọc đồng dạng (vượt loài) và đồng đẳng (vượt họ):

3.3.1 Phản ứng chéo đối với PD-1 của khí đuôi dài và PD-1 của chuột: Mức độ phản ứng chéo được đo bằng ELISA. Đĩa (Nunc) được phủ bằng PD-1 của khí đuôi dài (Sino Biological) và PD-1 của chuột (Sino sinh học) ở 1 μ g/ml và để qua đêm ở 4°C. Sau khi chặn và rửa, kháng thể 1 μ g/ml đã được thêm vào các đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đĩa sau đó được rửa sạch và sau đó ủ với kháng thể dê kháng chuột thứ phát IgG1 HRP (Bethyl) và IgP HR2 (Bethyl) trong 45 phút. Sau khi rửa, thêm chất nền TMB và tương tác đã được dừng bởi 2M HCL. Độ hấp thụ ở bước sóng 450nm đã được đọc bằng cách sử dụng máy đọc vi phiên (Molecular Device).

Kết quả của thử nghiệm chéo cho thấy kháng thể kháng PD-1 liên kết với PD-1 của khí đuôi dài nhưng không liên kết với PD-1 của chuột (Hình 6). HAb 1.103.11-v2 trong cùng một thử nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương với 1.103.11 hAb.

3.3.2 Phản ứng chéo với các thành viên trong họ PD-1 CD28, CTLA4 và ICOS: để kiểm tra hoạt tính liên kết vượt họ giữa kháng thể của người hoàn chỉnh, dòng tế bào mà biểu hiện PD-1, CD28, CTLA4 hoặc ICOS được nhuộm với kháng thể, tiếp theo là nhuộm kháng thể thứ hai với liên hợp dê kháng IgG Fc, FITC. PD-1 biểu hiện tế bào đã được sử dụng như đối chứng dương. Dòng tế bào tiền thân tương ứng được sử dụng như đối chứng âm. Tế bào đã được nhuộm được phân

tích bằng cách sử dụng phần mềm BD Biosciences FACSCanto II và FlowJo Version.

Hình 5 cho thấy rằng tế bào CHO được chuyển nhiễm với PD-1, CD28 và 293F chuyển nhiễm với CTLA4 được nhuộm với kháng thể kháng PD-1 và được phân tích bằng FACS. Kết quả cho thấy kháng thể PD-1 liên kết đặc biệt với PD-1, nhưng không liên kết với CD28 và CTLA4 của họ PD-1.HAb 1.103.11-v2 trong cùng một thử nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương với 1.103.11 hAb.

3.4 Thử nghiệm liên kết epitop:

3.4.1 epitop liên kết của kháng thể PD-1 đã được đặt trong lọ cạnh kháng thể A và B tiêu chuẩn bằng thử nghiệm SPR sử dụng ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Kháng thể A và B tiêu chuẩn được cố định trên chip cảm biến GLC (Bio-Rad) thông qua ghép đôi amin. Dung dịch PD-1 của người được chảy qua các kênh cố định kháng thể và thu được bởi kháng thể tiêu chuẩn. Sau đó, chip được xoay 90° và rửa với dung dịch đệm cho đến khi đường cơ sở ổn định. Kháng thể đã được chọn được chảy qua chip cảm biến.

3.4.2 Các epitop liên kết của kháng thể PD-1 đã được đặt vào lọ cạnh kháng thể A và B tiêu chuẩn bằng FACS. Tế bào CHO biểu hiện PD-1 của người trên bề mặt tế bào được ủ với kháng thể tiêu chuẩn A hoặc B ở nồng độ 10µg/ml trong 1 giờ. Tế bào được rửa sạch và kháng thể PD-1 của sáng chế này được thêm vào và ủ trong 1 giờ. Kháng thể thứ phát kháng chuột IgG-FITC được thêm vào và ủ trong 1 giờ ở 4°C. Tế bào sau đó được rửa một lần và tái huyền phù trong 1XPBS/1% BSA, và được phân tích bằng phân tích tế bào theo dòng chảy (BD).

Kết quả của thử nghiệm SPR và FACS cho thử nghiệm binning cho thấy epitop trên PD-1 của người được liên kết bởi kháng thể PD-1 của người hoàn chỉnh (tức là 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb) khác với kháng thể PD-1 hiện có (tức là kháng thể tiêu chuẩn A và B). HAb

1.103.11-v2 trong cùng một thí nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.5 Chức năng in vitro của kháng thể PD-1 được kiểm tra bằng thử nghiệm dựa trên tế bào:

3.5.1 Ảnh hưởng của kháng thể PD-1 của người đối với sự tăng trưởng tế bào T. Phản ứng dị sinh đã được sử dụng để kiểm tra các ảnh hưởng của kháng thể PD-1 đối với sự tăng trưởng của tế bào lympho T. Tế bào tua sơ cấp (DC)-MLR đã được kích thích được thực hiện trong đĩa nuôi cấy mô đáy chữ U có 96 lỗ ở 200 μ l RPMI 1640 chứa 10% FCS và kháng thể. DC được trộn với tổng cộng 1×10^5 tế bào T CD4⁺ dị sinh với tỷ lệ nằm trong khoảng 1:10 và 1:100, DC: tế bào T. Nuôi cấy cũng được tiến hành với sự có mặt hoặc không có mặt của mAbs trung hòa: kháng thể PD-1 của người và kháng thể tiêu chuẩn A và B và được sử dụng ở liều lượng 10 μ g/ml. Thử nghiệm được ủ trong 5 ngày, và trong 16 giờ cuối, [³H]thymidin đã được thêm ở mức 1 uCi/giếng. Việc hợp nhất [³H]thymidin được đo bằng cách đo sáng nhấp nháy, và phản ứng tăng sinh được biểu hiện dưới dạng kết hợp [³H]thymidin (số đếm mỗi phút) của ba lỗ. Số đếm chỉ tính riêng DC thường <1000 cpm. Kết quả được trình bày là ví dụ đại diện của tối thiểu năm thí nghiệm được thực hiện.

Tế bào tua của người (DC) và tế bào T CD4⁺, CD8⁺ và tổng tế bào được sử dụng trong allo-MLR ở trên được tạo ra từ PBMC theo quy trình sau: Các monocyte của người đã được tinh chế từ PBMC bằng cách chọn lọc âm tính sử dụng kit cocktail giàu monocyte của người theo hướng dẫn của nhà sản xuất (StemCell Meylan). Trong thời gian nliên kết, PBMC đã được phân lập từ máu của người hiến khỏe mạnh sử dụng lớp Ficoll-Paque. Tế bào được rửa hai lần với PBS, sau đó ngưng tụ ở 1×10^8 tế bào/ml trong dung dịch đệm phân lập, và ủ với hỗn hợp monocyte giàu Ab ở 4°C trong 30 phút. Tế bào được rửa sạch và sau đó ủ với keo từ tính ở 4°C trong 30 phút. Monocyte không liên kết nhấn đã chạy qua cột MACS và đã thu được. Để tạo ra iDC, monocyte được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FCS và kháng thể với GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ 800 U/ml) và IL-4 (PeproTech 500 U/ml) ở nồng độ 2×10^6 tế bào/ml.

Giảm nửa môi trường được thay thế mỗi ngày với môi trường chứa GM-CSF và IL-4. DC trưởng thành được tạo ra bằng cách kích thích iDC với LPS (026: B6, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1µg/ml) vào ngày thứ 5 trong thêm 24 giờ. Tế bào T CD4⁺, CD8⁺ và tổng tế bào T được tinh chế bằng cách chọn lọc âm tính bởi việc ủ PBMC với Tế bào T CD4⁺, CD8⁺ và tổng hỗn hợp giàu tế bào T và và keo từ tính theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Stemsep).

Tế bào T CD4⁺ của người được kích thích với DC dị sinh trong sự có mặt hay vắng mặt của kháng thể PD-1 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb và 1.153.7 hAb. Sự tăng trưởng của tế bào T CD4⁺ được đánh giá bởi hợp nhất [3H] thymidin. Hình 10 cho thấy rằng 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb và 1.153.7 hAb tăng cường sự tăng trưởng nồng độ tế bào T. hAb 1.103.11-v2 trong cùng một thí nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.5.2 Ảnh hưởng của kháng thể PD-1 của người đối với sự bài tiết xytokin IFN γ in vitro: để trực tiếp đánh giá tác dụng của kháng thể PD-1 của người chặn việc sinh ra xytokin IFN γ , chúng tôi đã thực hiện các thí nghiệm về sự sinh ra IFN γ trong allo-MLR. Trong thời gian nliên kết, tế bào T CD4 của người được tinh chế từ PBMC bằng cách chọn lọc âm tính với kit cocktail làm giàu tế bào T CD4⁺ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DC chưa trưởng thành được tạo ra từ monocyte bằng cách nuôi cấy trong GM-CSF và IL-4 trong 5 ngày và DC trưởng thành được phân biệt bằng kích thích với LPS ở 1µg/ml và để qua đêm. Tế bào T CD4⁺ được trộn với iDC/mDc ở tỷ lệ T:DC nằm trong khoảng từ 10:1 và 100:1. Nuôi cấy đã được tiến hành khi có mặt hoặc không có mặt kháng thể PD-1 của người và kháng thể tiêu chuẩn. Sau 5 ngày, dịch bệ mặt từ mỗi nuôi cấy đã được thu thập cho việc đo xytokine IFN γ . Mức độ IFN γ trong dịch bệ mặt đã được đo bằng thử nghiệm ELISA. Trong thời gian nliên kết, đĩa Coat Maxisorp với mAbs IFN-gamma kháng người được pha loãng trong dung dịch đệm phủ (0,75µg/ml, tức là pha loãng 1/1360), 50µl/lỗ (ví dụ cho đĩa có 96 lỗ thêm 3,7 µl kháng thể vào 5 ml của dung dịch đệm phủ) và ủ qua đêm ở 4°C. Ngăn chặn khả năng liên kết protein phụ bằng cách thêm 200µl/lỗ của dung dịch đệm ngăn chặn trong 2

giờ. Điều chế pha loãng của IFN-gamma tái tổ hợp để làm tiêu chuẩn, pha loãng gấp đôi từ 8000g/ml xuống 125gp/ml, pha loãng trong môi trường hoàn chỉnh, thêm với chỉ môi trường hoàn chỉnh. Rửa các đĩa và thêm tiêu chuẩn này và kiểm tra chất dịch bề mặt (100 μ l/lỗ), ủ trong từ 2 đến 4 giờ. mAb kháng IFN-gamma được biotinyl hoá (1/1333) trong dung dịch đệm ngăn chặn được thêm theo sau đó thêm Extra-avidin Peroxidaza. Phản ứng đã được phát triển bằng cách thêm chất nền TMB và dừng lại với 2M HCl. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 450nm.

Hình 9 cho thấy tế bào T CD4⁺ của người được kích thích với DC dị sinh khi có mặt hoặc không có mặt kháng thể 1.7.3 hAb, 1.49.9 hAb, 1.103.11 hAb, 1.139.15 hAb, và 1.153.7 hAb. Mức độ IFN γ được đo bằng ELISA. Kết quả cho thấy các kháng thể PD-1 của người hoàn chỉnh làm tăng bài tiết IFN γ theo liều. HAb 1.103.11-v2 trong cùng một thí nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.5.3 Ảnh hưởng của kháng thể PD-1 của người đối với sản xuất interleukin 2 (IL-2) in vitro: tế bào T CD4⁺ là hỗn hợp với iDC/mDc ở tỷ lệ T:DC nằm trong khoảng từ 10:1 và 100:1. Nuôi cấy đã được tiến hành khi có mặt hoặc không có mặt kháng thể PD-1 của người và kháng thể tiêu chuẩn. Sau 5 ngày, dịch bề mặt từ mỗi môi trường đã thu được để đo xytokin. Mức độ IL-2 trong dịch bề mặt được đo bằng thử nghiệm ELISA.

Hình 8 cho thấy tế bào T CD4⁺ của người được kích thích với DC dị sinh khi có mặt hoặc không có mặt kháng thể dẫn hoặc Ab đối chứng. Mức độ IL-2 được đo bằng ELISA. Kết quả cho thấy kháng thể kháng PD-1 tăng bài tiết IL-2 theo cách phụ thuộc vào liều. hAb 1.103.11-v2 trong cùng thử nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.5.4 Ảnh hưởng của kháng thể PD-1 của người đối với sự tăng trưởng tế bào và sự sinh ra xytokin bằng đáp ứng miễn dịch kháng nguyên đặc hiệu tự kháng nguyên: trong thử nghiệm này, tế bào T và DC lấy từ cùng một người hiến. Trong thời gian nliên kết, tế bào T CD4⁺ đã được tinh chế từ PBMC và nuôi cấy với sự có mặt của của CMV pp65 peptit và liều thấp của IL2 (20U/ml), trong lúc đó, DCs được tạo ra bởi việc nuôi cấy monocyte từ PBMC cùng người hiến trong GM-

CSF và IL-4. Sau 5 ngày, peptit pp65 CMV điều trị tế bào T CD4⁺ đã đồng nuôi cấy với DC rung với peptit pp65 có mặt hoặc không có mặt của kháng thể PD-1 của người và kháng thể tiêu chuẩn (như đối chứng). Vào ngày thứ năm, 100µl của dịch bề mặt được lấy từ mỗi nuôi cấy để đo xytokin IFN γ và IL-2. Mức độ IFN γ và sản sinh IL-2 được phát hiện bằng thử nghiệm ELISA. Sự phát triển của tế bào T đặc hiệu cho peptit CMVpp65-DC được rung được đánh giá bởi sự kết hợp [3H]thymidin.

Như thể hiện trong hình 11, kháng thể PD-1 tăng cường sự phát triển tế bào T CMV⁺-CD4⁺ phụ thuộc nồng độ được kích thích peptit CMV pp65-nạp DC tự thân. hAb 1.103.11-v2 trong cùng một thử nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.5.5 Ảnh hưởng của kháng thể PD-1 của người đối với chức năng ức chế tế bào T điều hòa (Treg): Treg, một quần thể phụ của tế bào T, là tác nhân điều biến miễn dịch chính và đóng vai trò chính trong việc duy trì khả năng dung nạp. Tế bào T CD4⁺CD25⁺ điều hòa có liên quan đến khối u do số lượng Treg gia tăng được tìm thấy ở các bệnh nhân với các loại ung thư và liên quan đến việc chẩn đoán bệnh kém hơn. Để trực tiếp đánh giá hiệu quả của kháng thể PD-1 ở đối với phản ứng ức chế miễn dịch, chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm trên Treg. Tế bào T CD4⁺CD25⁺ và CD4⁺CD25⁻ được tách ra bằng cách sử dụng các loại vi hạt kháng CD25 đặc hiệu (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) và tương ứng chọn lọc dương tính hoặc âm tính. Ban đầu, tế bào T CD4⁺ đã được tinh sạch bởi chọn lọc âm tính bằng cách ủ PBMC với hỗn hợp làm giàu tế bào T CD4⁺ người và keo từ tính theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Stemsep). Tế bào T CD4⁺ sau đó được tái huyền phù trong chất đệm MACS, được ủ với vi hạt CD25⁺ trên nước đá trong 30 phút, rửa sạch, và được đổ lên cột. Tế bào T CD4⁺CD25⁻, không liên kết với cột, được thu thập từ dòng chảy và rửa sạch trước khi sử dụng. Sau đó, tế bào T CD4⁺CD25⁺ được lấy ra từ cột và rửa sạch trước khi sử dụng. Treg được nuôi cấy với tế bào T CD4⁺CD25⁻ và DC (tỷ lệ Treg:Teff là 1:1) khi có mặt hoặc không có mặt kháng thể PD-1 ở người ở nồng độ 10µg/ml. Không có kháng thể hoặc có isotype của kháng thể được sử dụng như đối chứng âm. Dịch bề mặt từ nuôi cấy

đã được lấy ra vào ngày thứ năm để phát hiện các xytokin bằng kỹ thuật ELISA và sự phát triển tế bào được đo bằng cách thêm $[3H]$ thymidin ở nồng độ 1uCi/lỗ và ủ thêm 18 giờ. Sự kết hợp $[3H]$ thymidin được đo bằng cách đếm sáng nhấp nháy. Như thể hiện trong hình 12, kháng thể PD-1 đã loại bỏ chức năng ức chế của Treg và khôi phục sự phát triển tế bào T phản ứng và sự bài tiết IFN γ . HAb 1.103.11-v2 trong cùng một cuộc thử nghiệm sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.6 Thử nghiệm ADCC/CDC: để giảm thiểu độc tính không mong muốn trên tế bào PD-1⁺ khỏe mạnh, kháng thể kháng PD-1 người hoàn chỉnh đã được chọn được xác định là không có chức năng ADCC và CDC.

3.6 ADCC: Tế bào T hoạt hóa biểu hiện PD-1 trên bề mặt tế bào đã được sử dụng làm tế bào đích và được ủ trước với nồng độ khác nhau của kháng thể hoàn toàn của người trong đĩa có 96 lỗ trong 30 phút, sau đó tế bào PBMC hoạt hóa IL-2- (được sử dụng như nguồn của các tế bào ăn mồi tự nhiên (NK), tức là tế bào hiệu lực) được thêm ở tỷ lệ tế bào hiệu lực/tế bào đích là 50:1. Đĩa được ủ trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Phân ly tế bào đích được xác định bằng kit phát hiện độc tính tế bào (Roche). Mật độ quang học được đo bằng máy đọc đĩa Molecular Devices SpectraMax M5e. Kết quả cho thấy rằng ADCC không có nguồn gốc từ kháng thể hoàn toàn của người kháng PD-1 đã được kiểm tra (Hình 13). HAb 1.103.11-v2 trong cùng một thử nghiệm sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

3.6.2 CDC: tế bào đích (tế bào T hoạt hóa), huyết thanh bổ sung được pha loãng của người (Quidel-A112) và nồng độ khác nhau của kháng thể PD-1 hoàn toàn được trộn vào đĩa có 96 lỗ. Tấm được ủ trong 4 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ 5% CO₂. Việc phân ly tế bào đích được xác định bởi CellTiter glo (Promega-G7573). Rituxan (Roche) và dòng tế bào u bạch huyết B người Raji (CD20 dương tính) được sử dụng làm đối chứng dương. Dữ liệu cho thấy CDC không bắt nguồn

từ kháng thể PD-1 (Hình 14).HAb 1.103.11-v2 trong cùng thử nghiệm dự kiến sẽ có kết quả tương đương đối với 1.103.11 hAb.

Ví dụ 4: Lập bản đồ epitop của kháng thể hoàn toàn của người

Để xác định sự khác biệt giữa epitop giữa kháng thể 1.103.11 hAb này được đề xuất trong tài liệu này và Keytruda, một kháng thể hPD-1 đã biết, thử nghiệm quét alanin trên hPD-1 và sự đánh giá tác dụng đối với việc liên kết kháng thể được thực hiện bằng 1.103.11 hAb, Keytruda và 11.148 .10 (một kháng thể hPD-1 đối chứng với epitop không chồng chéo với epitop của 1.103.11 hAb hoặc epitop của Keytruda).

Phần dư alanin trên hPD-1 được đột biến thành codon glycine, và tất cả phần dư khác được đột biến thành codon alanin. Đối với mỗi phần dư của miền ngoại bào hPD-1 (ECD), việc thể thể điểm axit amin được thực hiện bằng cách sử dụng hai bước PCR theo tuần tự. Plasmid pcADN3.3-hPD-1_ECD. His mã mã hoá ECD của PD-1 của người và thể His đầu C đã được sử dụng làm kiểu mẫu, và một bộ đoạn mồi gây đột biến đã được sử dụng cho bước đầu của PCR sử dụng kit tạo đột biến định hướng nhiều điểm ánh sáng QuikChange (Agilent technologies, Palo Alto, CA). DpnI endonuclease được sử dụng để tiêu hóa kiểu mẫu mẹ sau phản ứng tổng hợp chủng đột biến. Trong bước thứ hai của PCR, trình tự biểu hiện ADN tuyến tính bao gồm một vùng khởi động CMV, miền ngoại bào (ECD) của PD-1, thể His và polyadenylation thymidin kinase (TK) polyadenylation được khuếch đại và biểu hiện tức thời trong tế bào HEK293F (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Kháng thể đơn dòng 1.103.11 hAb, keytruda và 11.148.10 hAb được phủ trong đĩa cho thử nghiệm liên kết ELISA. Sau khi tương tác với dịch bề mặt có chứa đột biến PD-1 được định lượng, kháng thể kháng His được liên hợp HRP (Rockland, Cat#200-303-382) đã được thêm vào như là kháng thể phát hiện. Sự hấp thụ được chuẩn hóa theo mức trung bình của đột biến đối chứng. Sau khi thiết lập giá trị ngắt bổ sung để thay đổi số lần liên kết (<0.55), phần dư epitop đã được xác định được nhận biết.

30 đột biến hPD-1 được thể điểm dẫn đầu mà làm giảm đáng kể việc liên kết kháng thể được trình bày trong Bảng 2. Việc kiểm tra vị trí của tất cả phần dư trên cấu trúc tinh thể hPD-1 (mã PDB là 3RRQ và 4ZQK) tiết lộ rằng một số axit amin (ví dụ Val144, Leu142, Val110, Met108, Cys123 v.v.) đã được chôn chặt hoàn toàn trong protein, và không có khả năng trực tiếp tiếp xúc với bất kỳ kháng thể nào. Sự giảm việc liên kết quan sát được có lẽ là do sự bất ổn hoặc thậm chí sự phá vỡ của cấu trúc hPD-1 sau sự thế alanin. Để tránh hiểu sai những dữ liệu này như điểm nóng epitop, chúng tôi đã tận dụng kháng thể đối chúng 11.148.10 HAB mà liên kết với vị trí khá khác trên kháng nguyên, nhưng dự kiến sẽ phản ứng với sự phá vỡ của cấu trúc HPD-1 nếu nó thực sự xảy ra. Đột biến mà ảnh hưởng đến cả hai kháng thể được coi là các điểm nóng giả và đã được loại bỏ khỏi danh sách. Sau khi thiết lập giá trị ngắt bỏ sung để thay đổi số lần liên kết (<0.55), phần dư epitop được xác định cuối cùng được liệt kê trong Bảng 3. Có 9 vị trí với 1.103.11 hAb và 5 vị trí với Keytruda, và 10 phần dư còn lại với kháng thể kiểm soát 11.148.10 hAb.

Bảng 2: Ảnh hưởng của đột biến điểm PD-1 đối với việc liên kết kháng thể

Phần dư PD-1#		Phần dư PD-1#		Phần dư PD-1#		Phần dư PD-1#	
1.103.11 hAb		Keytruda		11.148.10 hAb			
Số lần		Số lần		Số lần			
thay		thay		thay			
đổi ^a SD		đổi ^a SD		đổi ^a SD			
V 144	0,22 0,00	P 89	0,18 0,02	V 144	0,03 0,01		
A 129	0,22 0,00	D 85	0,38 0,01	F 56	0,06 0,02		
D 85	0,24 0,01	V 144	0,40 0,01	L 142	0,09 0,00		
P 83	0,30 0,01	R 94	0,46 0,04	D 48	0,21 0,01		
L 128	0,32 0,01	F 106	0,47 0,05	R 143	0,26 0,01		
V 64	0,32 0,01	K 78	0,48 0,00	C 123	0,27 0,01		
Q 133	0,37 0,03	P 83	0,50 0,01	F 106	0,29 0,04		

P 130	0,41	0,00	D 92	0,50	0,02	V 44	0,34	0,01
F 106	0,41	0,02	P 39	0,54	0,00	L 41	0,35	0,00
K 131	0,43	0,01	A 81	0,57	0,01	A 50	0,35	0,02
L 142	0,44	0,00	C 123	0,57	0,01	F 95	0,37	0,91
C 123	0,46	0,00	N 66	0,57	0,03	V 43	0,37	0,01
A 132	0,53	0,01	L 142	0,59	0,01	V 110	0,41	0,01
P 39	0,55	0,02	F 82	0,61	0,03	M 108	0,43	0,11
M 108	0,56	0,00	F 95	0,61	0,04	R 94	0,46	0,12
F 52	0,59	0,00	F. 52	0,63	0,01	C 93	0,48	0,03
K 135	0,62	0,01	M 108	0,64	0,06	R 86	0,49	0,01
S 137	0,62	0,01	L 128	0,68	0,01	D 117	0,49	0,12
F 95	0,63	0,02	I 126	0,72	0,01	A 113	0,51	0,01
I 126	0,64	0,01	A 113	0,72	0,01	T 45	0,51	0,03
F 82	0,65	0,01	V 110	0,73	0,04	L 42	0,53	0,01
I 134	0,69	0,01	G 47	0,73	0,01	A 40	0,54	0,00
R 94	0,70	0,01	D 117	0,73	0,07	P 39	0,55	0,00
A 50	0,73	0,01	N 49	0,73	0,00	G 90	0,56	0,08
D 117	0,73	0,01	S 87	0,74	0,06	N 49	0,58	0,01
A 113	0,73	0,02	L 42	0,76	0,01	S 137	0,58	0,02
N 49	0,73	0,01	N 102	0,76	0,01	Y 68	0,58	0,03
L 65	0,75	0,01	W 67	0,81	0,01	W 67	0,60	0,03
W 67	0,76	0,01	P 101	0,81	0,04	F 52	0,60	0,05
G 47	0,77	0,00	A 80	0,82	0,01	R 69	0,61	0,05

In đậm: các axit amin chồng lên nhau với 11.148.10 hAb đối chứng để duy trì cấu trúc đã được loại bỏ khỏi danh sách các điểm nóng.

Thay đổi số lần trong việc liên kết liên quan đến việc liên kết của một số thể alanin im lặng.

Bảng 3: Xác định các epitop tiềm năng

PD-1 với				PD-1 với			
1.103.11	vị trí	PD-1 với	vị trí	11.148.10	vị trí		
hAb	phần dư	Keytruda	phần dư	hAb	phần dư		
V 64	C	K 78	C'	L 41	A'		
P 83	C'	P 83	C'	V 43	A'		
D 85	C''	D 85	C''	V 44	A'		
L 128	FG	P 89	C''	T 45	A'		
A 129	FG	D 92	C''D	D 48	A'B		
P 130	FG			A50	B		
K 131	G			F 56	B		
A 132	G			R 86	C''		
Q 133	G			C 93	C''D		
				R 143	G		

Giá trị ngắt: số lần thay đổi <0,55

*C, C', C'', F, G, A' đại diện cho các sợi peptit trong cấu trúc tinh thể của hPD-1 như thể hiện trong hình 17. Chúng C' được quan sát trên mPD-1 không tồn tại trên cấu trúc hPD-1. Bảng β này được thay bằng vòng lặp không có cấu trúc trên hPD-1. Chúng tôi vẫn sử dụng C'' để liên kết nhãn vùng này, vì mục đích so sánh dễ dàng với mPD-1.

So sánh phần dư epitop của 1.103.11 hAb và Keytruda trong Bảng 3 chỉ cho thấy hai điểm nóng phần dư được chồng lên. Phần còn lại khá đa dạng, trong đó chỉ ra rằng hai kháng thể có thể đã áp dụng các cơ chế rất khác nhau về sự ngăn chặn hPD-1 và hPD-L1. Việc đọc các ID phần dư trong Bảng 3 không trực tiếp giải thích cơ chế. Tất cả dữ liệu trong bảng 3, cũng như vị trí liên kết hPD-L1, do đó được ánh xạ trên cấu trúc tinh thể của hPD-1 để tạo ra sự hình dung và so sánh tốt hơn. (Hình 17).

Như thấy được từ hình 17, điểm nóng phần dư phụ trách việc liên kết hPD-L1 thu thập được ở giữa các sợi C, F và G (Hình 17A). Hai kháng thể được khảo

sát 1.103.11 hAb và Keytruda, mặc dù cả hai đều có chức năng trong việc liên kết hPD-1 và ngăn chặn hPD-L1, nhưng có epitop khác nhau rõ ràng (hình 17B cho 1.103.11 hAb, 17C cho Keytruda). epitop của Keytruda chủ yếu đóng góp bởi phần dư trên vòng lặp C'D (tương ứng với sợi C 'trên mPD-1) mà hoàn toàn không giao cắt vị trí liên kết PD-L1. Điều này cho thấy chức năng ngăn chặn hPD-L1 của Keytruda dựa nhiều hơn vào ảnh hưởng cản trở không gian của nó được đem lại bởi kích thước của kháng thể. Ngược lại, epitop của kháng thể 1.103.11 hAb của chúng tôi bao gồm các điểm nóng được phân bố trên nhiều vị trí, và đã chồng chéo trực tiếp với vị trí liên kết hPD-L1 (Hình 17A, 17B). 1.103.11 hAb này chặn hPD-L1 bằng phương tiện có tính cạnh tranh hơn hPD-L1 khi phản ứng với vị trí liên kết thông thường của chúng. Do đó, 1.103.11 hAb được dự kiến sẽ có nhiều chức năng hơn trong quá trình phát triển xuôi dòng.

Tuy nhiên, kháng thể 11.148.10 hAb liên kết với một vị trí hoàn toàn khác (Hình 17D) từ hai kháng thể chức năng mà tự xác nhận là kháng thể đối chứng tốt để theo dõi chức năng của hPD-1 trong việc thể alanin.

Mặc dù việc tiết lộ đã được thể hiện và mô tả với ví dụ cụ thể (một số trong đó là các phương án được ưu tiên), cần được hiểu rằng thay đổi về hình thức và chi tiết có thể được thực hiện bởi các chuyên gia trong lĩnh vực mà không rời khỏi ý tưởng và phạm vi của sáng chế như đã trình bày trong tài liệu này.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể kháng PD-1 được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa:

- a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa vùng quyết định tính bổ sung (CDR) của chuỗi nặng (H) 1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, và HCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 của chuỗi nhẹ (L) chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, LCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, và LCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11;
- b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, HCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, và HCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, LCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11;
- c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, và HCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, LCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19;
- d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, HCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, và HCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, LCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29, và LCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31;
- e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33, HCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 35, và HCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 39, LCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41, và LCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43; hoặc

f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, và HCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, LCDR2 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65.

2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, chứa:

- a) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 45; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 47;
- b) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 49; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 51;
- c) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 55;
- d) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 57; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 59;
- e) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 61; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 63; hoặc
- f) vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 80% trình tự tương đồng với trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 67.

3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, bao gồm:

- a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47;

- b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51;
- c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55;
- d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59;
- e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63; hoặc
- f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, có khả năng liên kết đặc hiệu với PD-1 của người tại trị số KD không quá 10^{-8} M như được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với PD-1 của khi ở nồng độ EC_{50} tối đa 100nM, hoặc tối đa 10nM, và/hoặc không liên kết với PD-1 của chuột.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà có khả năng ức chế liên kết của PD-1 của người hoặc khi với phối tử của nó ở nồng độ IC_{50} tối đa 100 nM.

7. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà về cơ bản là không liên kết với CD28 hoặc CTLA4.

8. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà không tạo ra ADCC hoặc CDC hoặc cả hai.

9. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người.

10. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 14, trong đó kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người được sản xuất bởi chuột chuyển gen.

11. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà có khả năng ngăn chặn việc liên kết PD-1 của người với phối tử của nó và do đó đem lại ít nhất một trong các hoạt động sau:

- a) tạo ra sự sản sinh của IL-2 trong tế bào T CD4⁺;
- b) tạo ra sự sản sinh của IFN γ trong tế bào T CD4⁺;
- c) tạo ra sự phát triển của tế bào T CD4⁺; và
- d) đảo ngược chức năng ức chế của T reg.

12. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, mà là kháng thể đơn miền được lạc đà hóa, đoạn kháng thể đôi, scFv, dime scFv, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', mảnh Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, đoạn kháng thể đôi ds, kháng thể siêu vi, kháng thể miền hoặc kháng thể miền hai hóa trị.

13. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chứa thêm vùng cố định globulin miễn dịch.

14. Thẻ liên hợp chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên và một nhãn có thể phát hiện được, phân tử với đặc tính điều chỉnh được động học, hoặc phân tử có đặc tính tinh sạch.

15. Polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm từ 1 đến 13.

16. Vật truyền chứa polynucleotit được phân lập theo điểm 15.

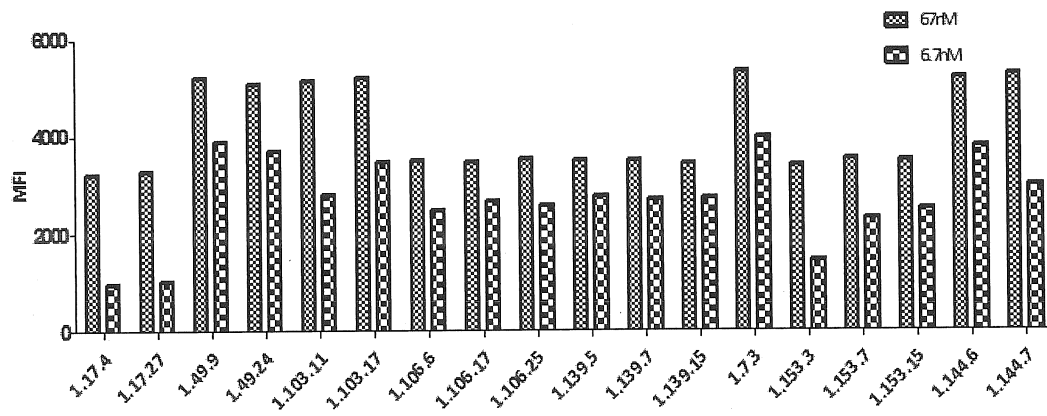
17. Tế bào chủ biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, chứa vật truyền theo điểm 16.

18. Phương pháp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 17 trong điều kiện mà ở đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được biểu hiện.

19. Bộ kit để phát hiện sự có mặt hoặc mức PD-1 trong mẫu sinh học, chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 hoặc thể liên hợp theo điểm 14 và hướng dẫn sử dụng.

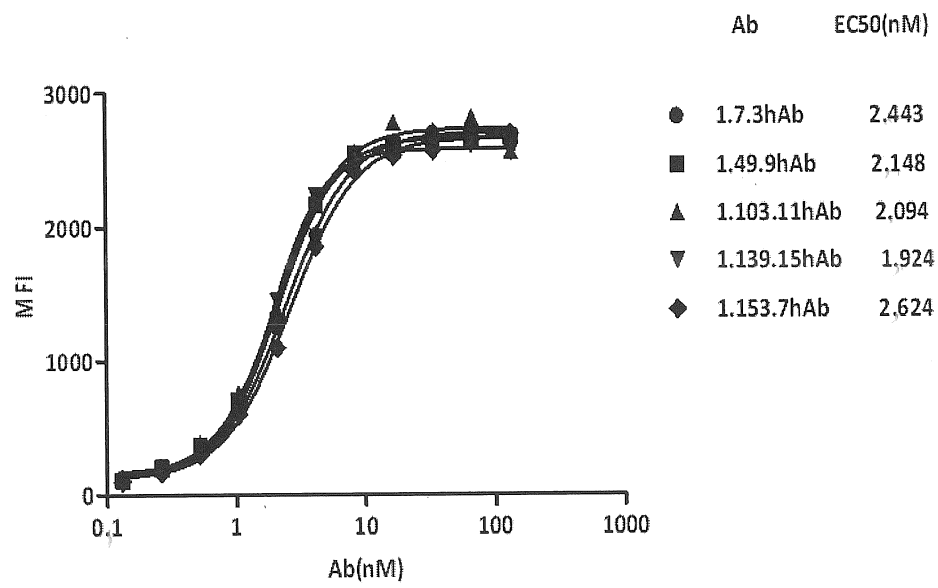
20. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng hoặc rối loạn liên quan hoặc kết hợp với PD-1 hoặc có thể hưởng lợi từ việc tăng cường điều chỉnh đáp ứng miễn dịch, chứa lượng hiệu quả trong trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 hoặc thể liên hợp theo điểm 14 và một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

1/17



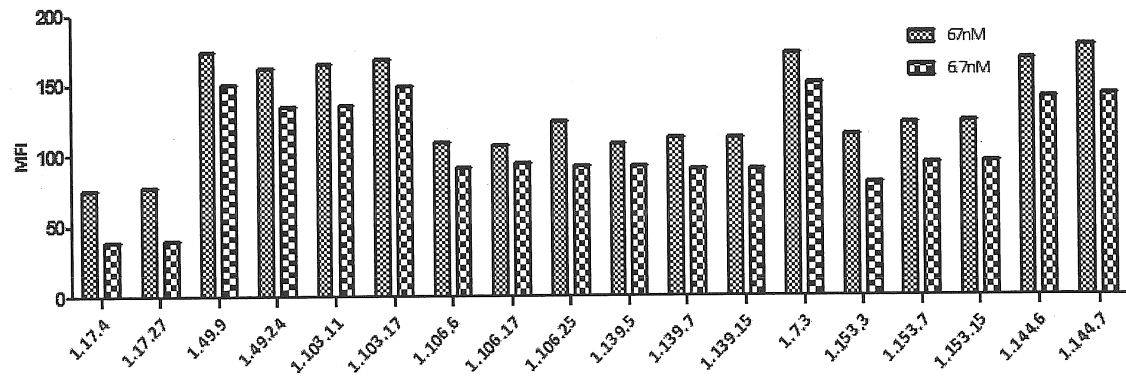
Hình 1

2/17



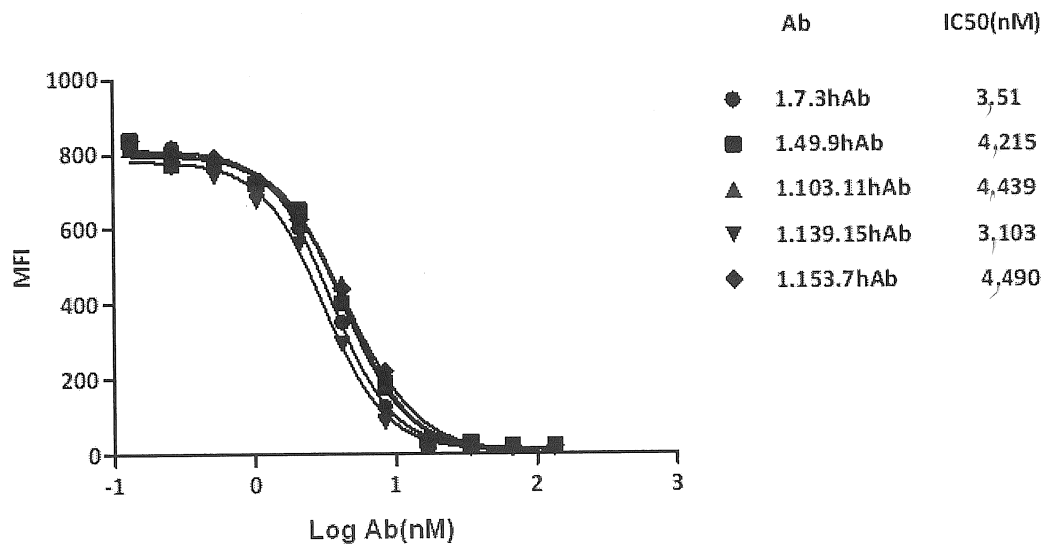
Hình 2

3/17



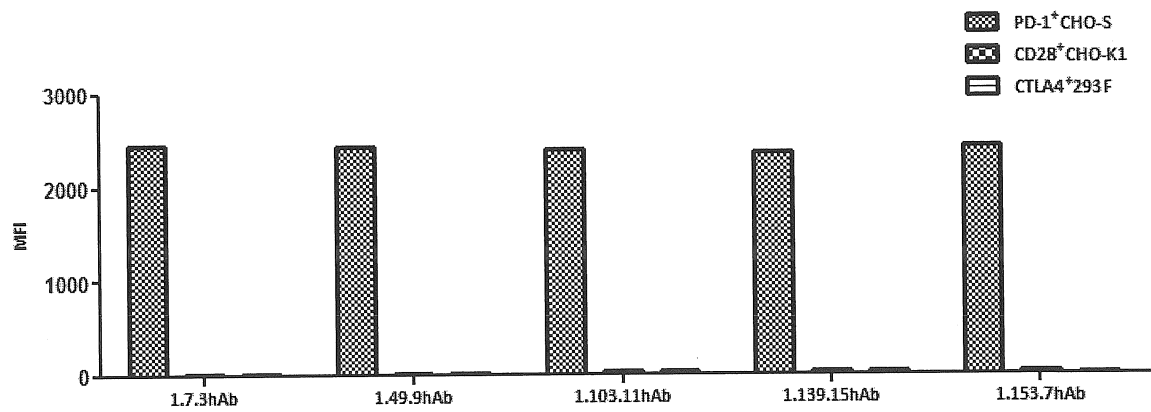
Hình 3

4/17

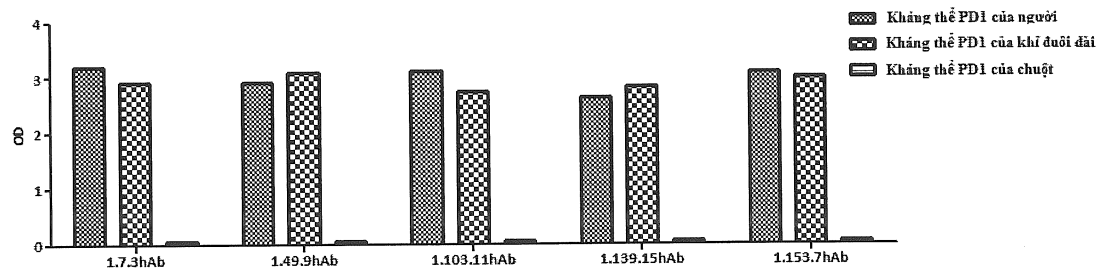


Hình 4

5/17



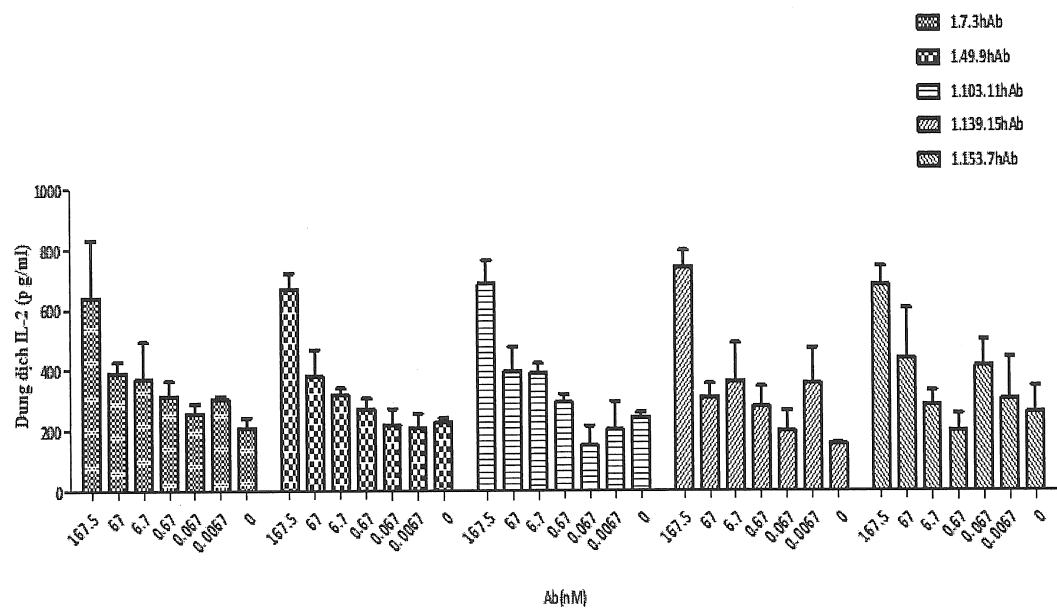
Hình 5



Hình 6

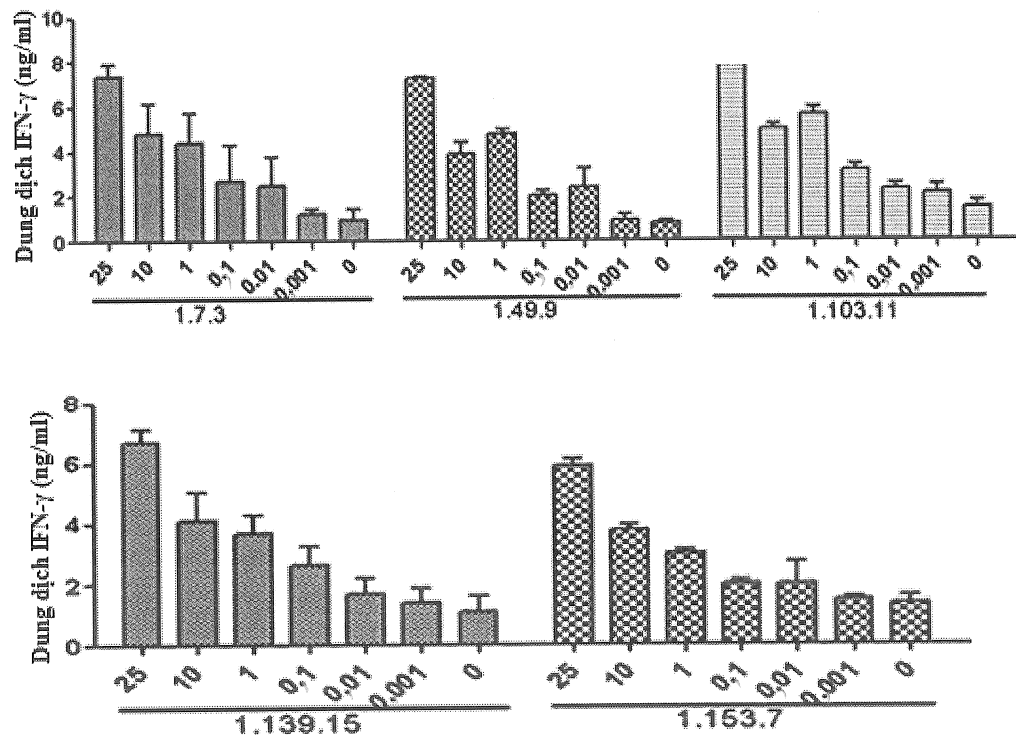
Hóa phân tích	Phối tử	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU)
WBP305.hpro1.ECD.his	1.7.3 hAb	1,70E+06	2,98E-04	1,76E-10	61,9	2,63
	1.49.9 hAb	1,08E+06	1,16E-03	1,07E-09	44,15	2,43
	1.103.11 hAb (305-2)	1,12E+06	1,96E-04	1,75E-10	54,14	2,58
	1.139.15 hAb	1,05E+06	3,89E-03	3,71E-09	65,02	2,16
	1.153.7 hAb (305-1)	2,62E+05	7,33E-04	2,79E-09	53,54	2,05

Hình 7



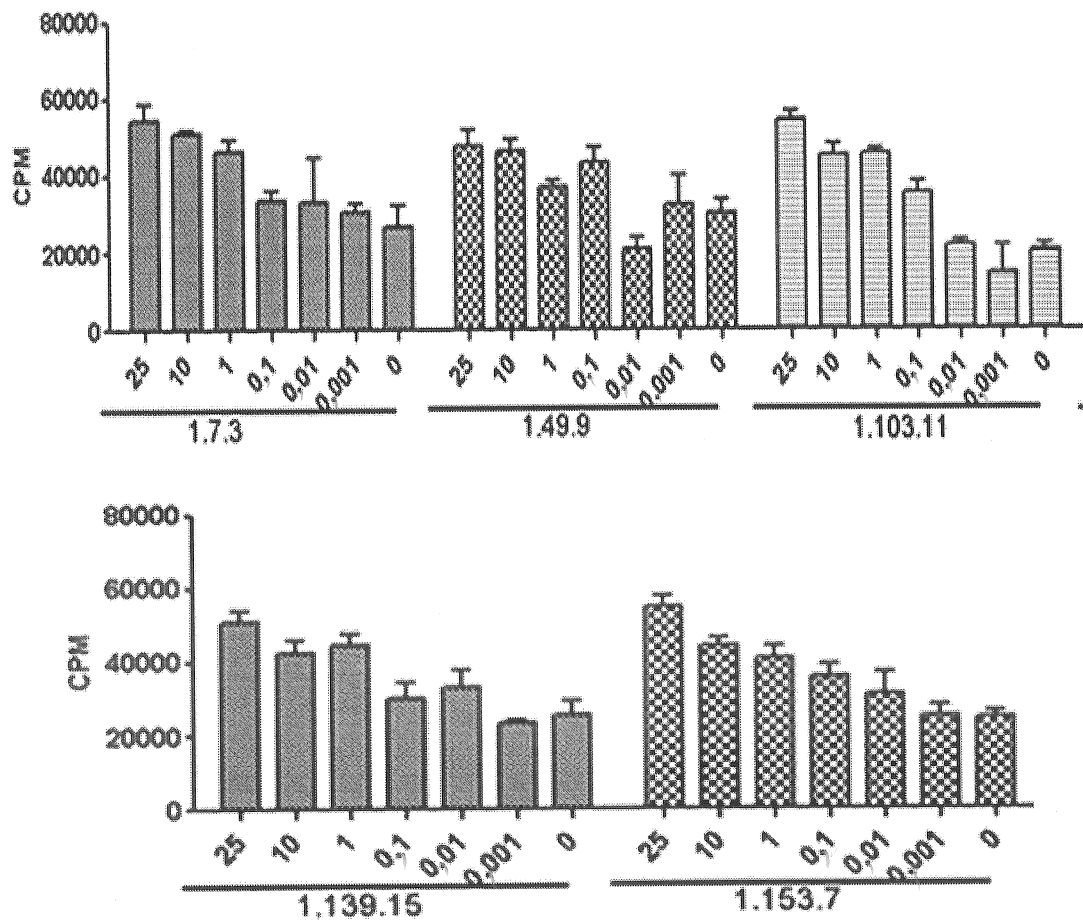
Hình 8

9/17



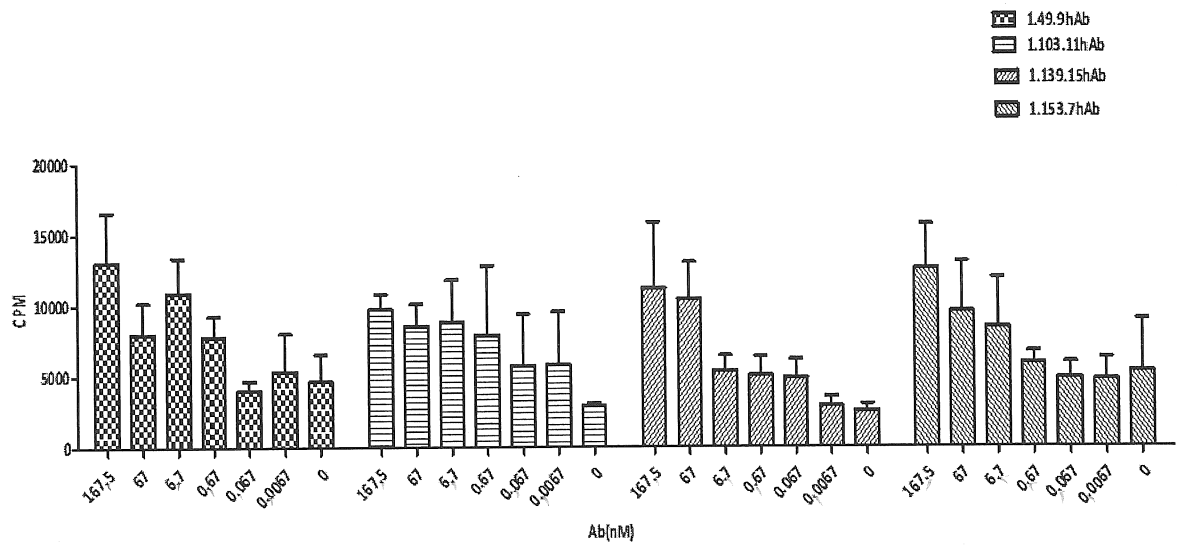
Hình 9

10/17



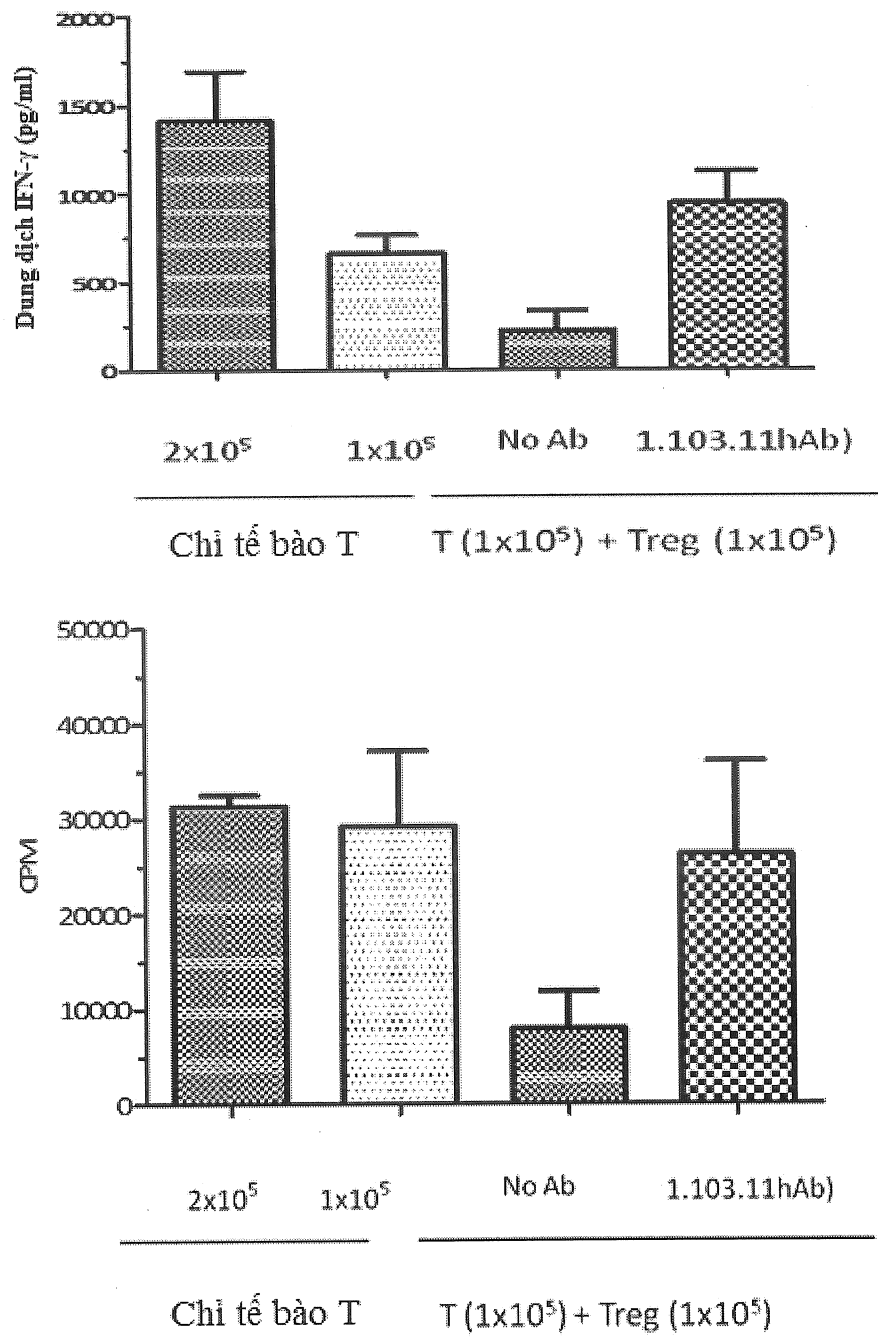
Hình 10

11/17

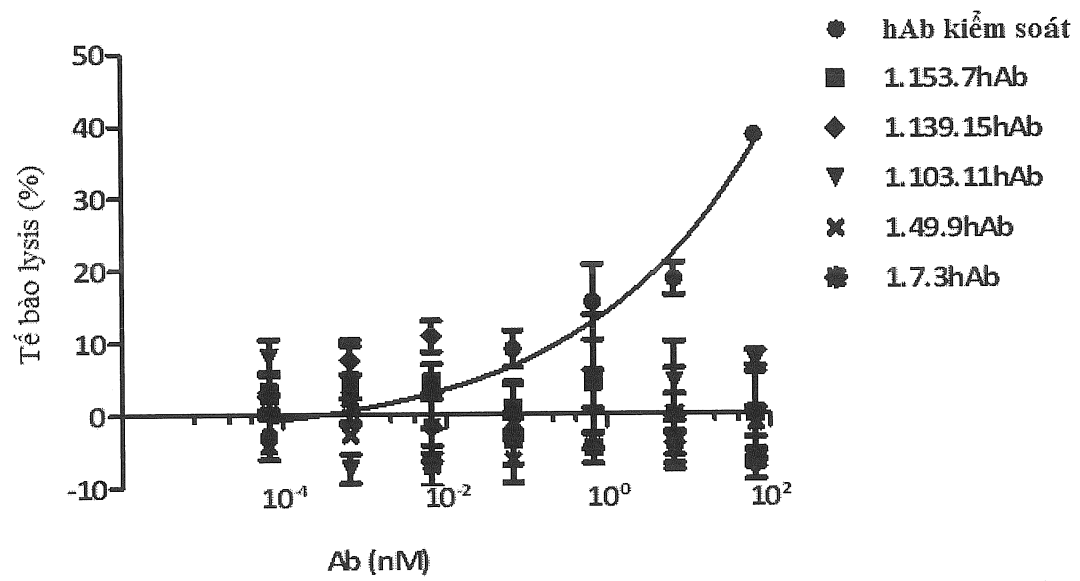


Hình 11

12/17

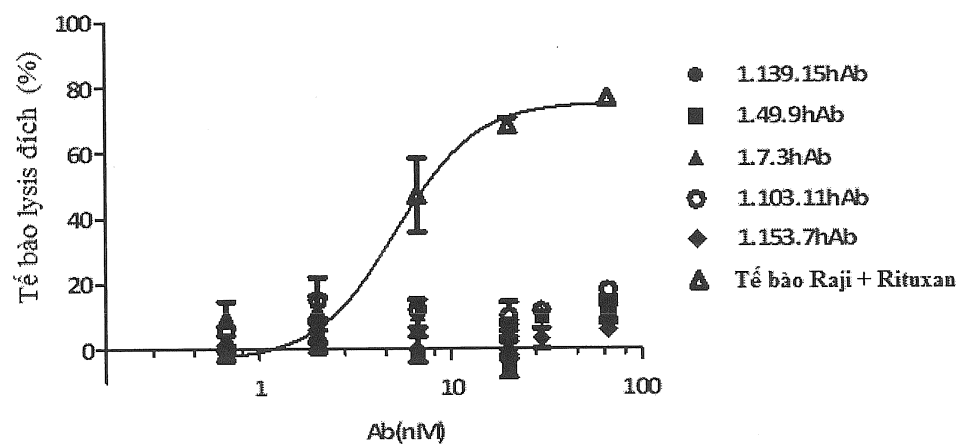


Hình 12



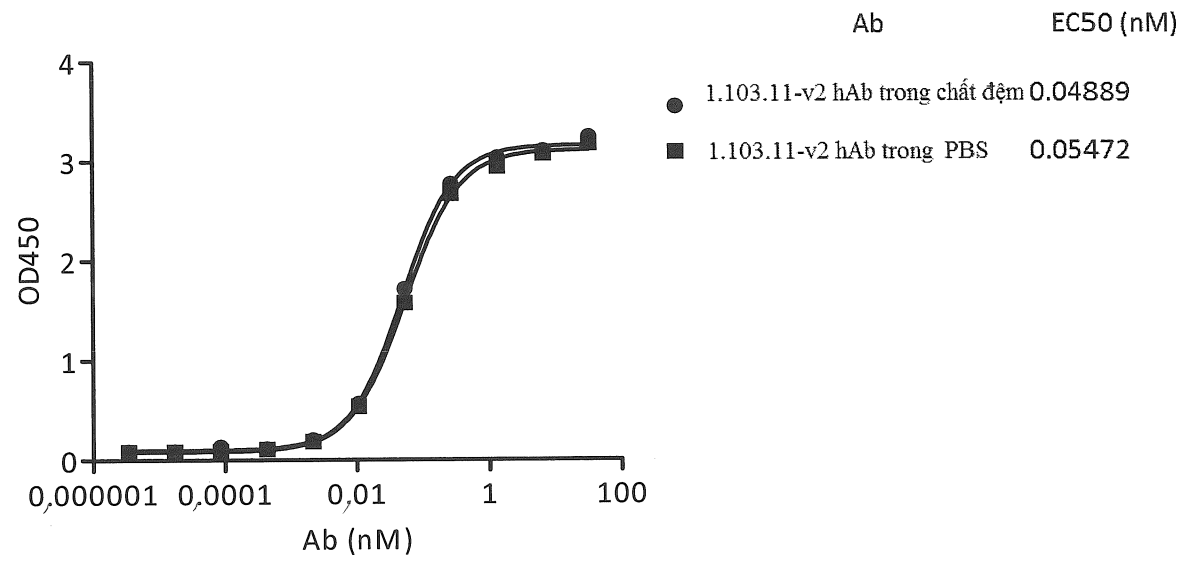
Hình 13

14/17



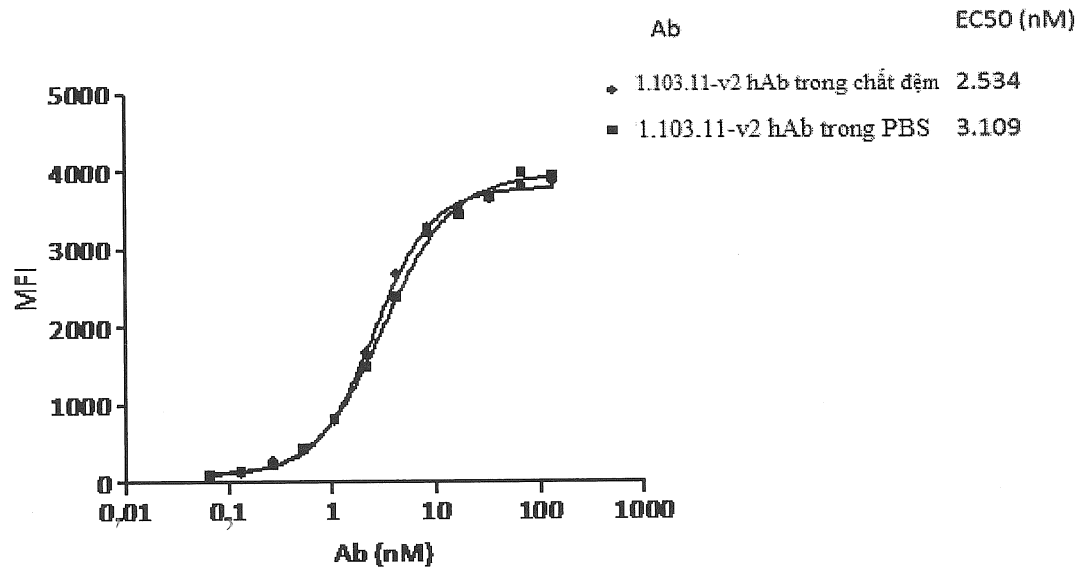
Hình 14

15/17

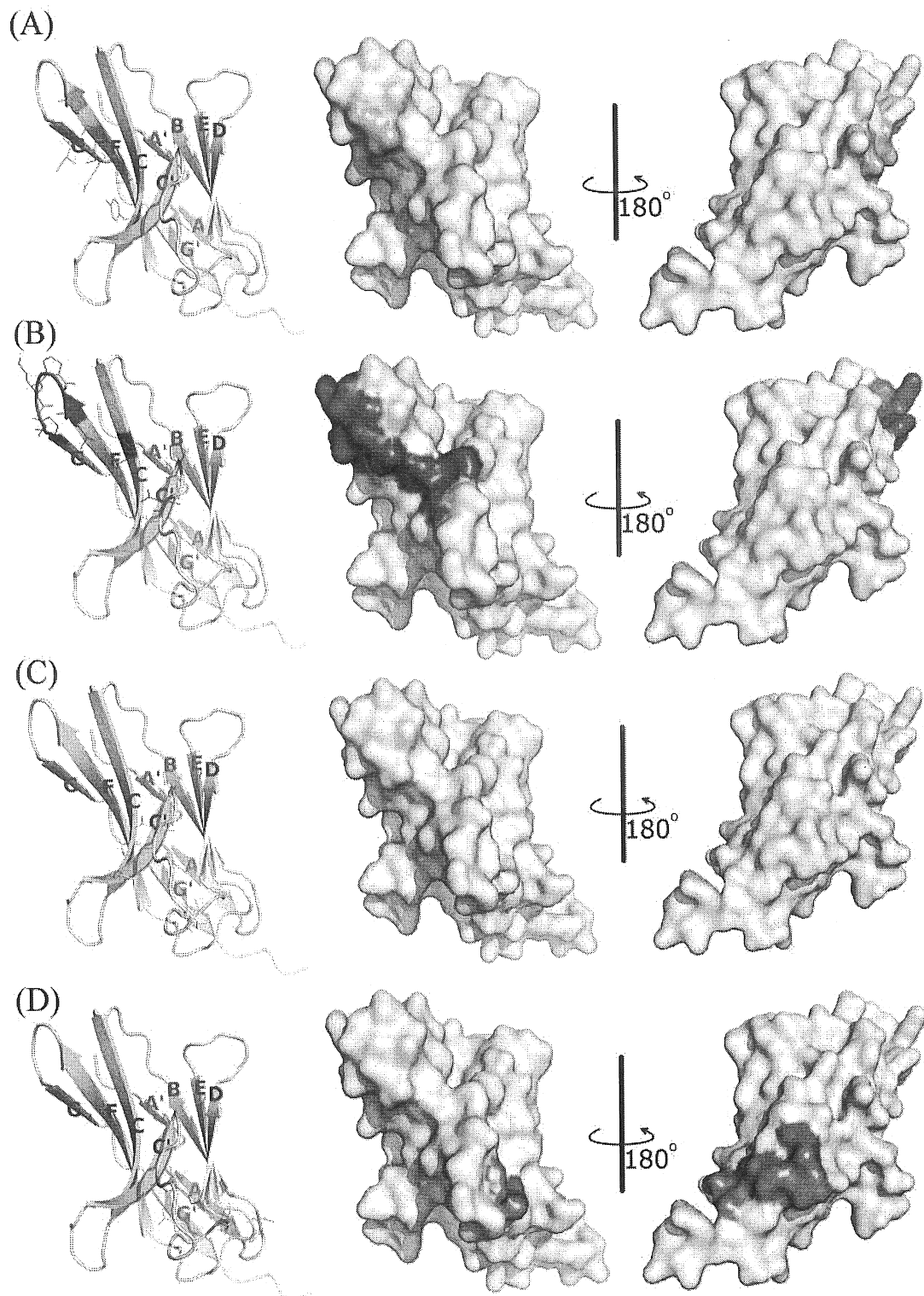


Hình 15

16/17



Hình 16



Hình 17

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> WuXi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.
Open Monoclonal Technology, Inc

<120> Kháng thể kháng PD-1, phương pháp biểu hiện và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 053674-8008W002

<160> 68

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Thr Thr Tyr Tyr Trp Val
1 5

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

agtactactt actactgggt c

21

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

agtatctctt atagtgggaa cacctactac aatccgtccc tcaagagt

48

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 catctagggt ataatgggag gtacctcccc ttgactac 39

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 actggaacca gcagtgacgt tggtttttat aactatgtct cc 42

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gatgtcacta atcggccctc a 21

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Ser Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Trp Val

```

1                               5                               10

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
agctcatata caagcatcag cacttgggtg                               30

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Ser Thr Tyr Tyr Trp Gly
1                               5

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14
agtagtactt actactgggg c                               21

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1                               5                               10                               15

<210> 16
<211> 48
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16
agtatctctt atagtgggag cacctactac aatccgtccc tcaagagt                               48

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1                               5

```

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 gatgtcagta atcggccctc a

21

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Ser Ser Tyr Thr Asn Ile Ser Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 agtcatata caaacatcag cacttgggtg

30

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Thr Thr Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 agtactactt actactgggg c

21

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 agtatctctt atagtgggac cacctactac aaccgcgtccc tcaagagt

48

<210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

His Leu Gly Tyr Asn Ser Asn Trp Tyr Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 26
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 catctcgggt ataacagcaa ctggtaccct tttgactac

39

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Arg Val Ser
 1 5 10

<210> 28
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 actggaacca gcagtgacgt tggtagttat aaccgtgtct cc

42

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 gaggtcagta atcggccctc a

21

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 agctcatata caagcagcag cacttgggtg

30

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ser His Ala Met Ser
 1 5

<210> 34
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 agccatgccca tgagc

15

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Thr Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 36
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 actattactg gtggtggtgg tagcatatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Asn	Arg	Ala	Gly	Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 aaccgcgctg gggagggtta ctttgactac 30

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Gly	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Asn	Lys	Asp	Val	His
1				5						10

<210> 40
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 gggggagaca acattggaaa taaagatgtg cac 33

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Arg	Asp	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 agggatagca accggccctc t

21

<210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Val Trp Asp Ser Ile Trp Val
 1 5

<210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 caggtgtggg acagcatttg ggtg

24

<210> 45
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Ala Ala Thr Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 46
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgaccctc 60
 acctgcactg tctctggtga ctccatcagc agtactactt actactgggt ctggatccgc 120
 cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gaacacctac 180
 tacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccacttc 240
 tccctgaagc tgagttctgt ggccgccaca gacacggctc tatattactg tgcgagacat 300
 ctaggggtata atgggaggta cctccccctt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctcc 369

<210> 47
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Phe Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Asp Val Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ile
 85 90 95
 Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 48
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ttttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 caccaggga aagccccga actcatgatt tatgatgtca ctaatcggcc ctgaggggtt 180

tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcatcag cacttgggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 49
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 50

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtactt actactgggg ctggatccgc 120
 cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gagcacctac 180
 tacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gaccgacgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacat 300
 ctaggggtata atgggaggta cctccccttt gactactggg gccaggggaac cctgggtcacc 360
 gtctcctcc 369

<210> 51
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

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

<210> 52
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 52

catgtctgccc	tgactcagcc	tgccctccgtg	tctgggtctc	ctggacagtc	gatcaccatc	60
tcctgcactg	gaaccagcag	tgacgttggt	ttttataact	atgtctcctg	gtaccaacag	120
cacccaggca	aagccccga	agtcatgatt	tatgatgtca	gtaatcggcc	ctcaggggtt	180
tctgatcgct	tctctggctc	caagtctggc	aacacggcct	ccctgactat	ctctgggctc	240
caggctgagg	acgaggctga	ttattactgc	agctcatata	caagcatcag	cacttgggtg	300
ttcggcggag	ggaccaagct	gactgtccta				330

<210> 53
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Thr
			20					25					30		

Thr Tyr Tyr Trp Val Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Ala Ala Thr Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg His Leu Gly Tyr Asn Gly Arg Tyr Leu Pro Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgaccctc 60
 acctgcactg tctctgctga ctccatcagc agtactactt actactgggt ctggatccgc 120
 cagccccag ggaagggact ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gagcacctac 180
 tacaatccgt ccctcaagag tcgagtcacc gtatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgaactctgt ggccgccaca gacacggctc tatattactg tgcgagacat 300
 ctaggggtata atgggaggta cctccccttt gactactggg gccagggaac cctgggtcacc 360
 gtctcctcc 369

<210> 55
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

Ser	Thr	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu
			100					105					110

```
<210> 56
<211> 330
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

<400>	56
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc	60
tcttgcaactg gaaccagcag tgacgttggg tttataact atgtctcctg gtaccaaacag	120
caccaggga aagcccccgaa actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcagggggtt	180
tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacctt ctctgggctc	240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caaatcatcag cacttgggtg	300
ttcggcggaq qqaccaagct qaccgtccta	330

```
<210> 57
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 57

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

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

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

Trp Ile Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Pro Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ile
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr
85 90 95

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	58
<211>	369
<212>	ADN

<213> Homo sapiens

<400> 58

```
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtactactt actactgggg ctggatccgc      120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct cttatagtgg gaccacctac      180
tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atccccgtag acacgtccaa gaaccagatc      240
tccctgaaac tgagctctgt gaccgccgca gacacgtctt tgtattattg tgcgagacat      300
ctcgggtata acagcaactg gtaccctttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc      360
gtctcctca                                     369
```

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

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

Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Glu Val
                35              40              45

Ile Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
10              50              55              60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65              70              75              80

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

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
                100             105             110
```

<210> 60

<211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 60

```
cagtcggccc tgactcagcc tccctccgtg tccgggtctc ctggacagtc agtcaccatc      60
tcttgactg gaaccagcag tgacgttggt agttataacc gtgtctcctg gtaccagcag      120
ccccaggca cagccccga agtcattatt tatgaggta gtaatcggcc ctcaggggctc      180
cctgatcgct tctctgggtc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc      240
```

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttggggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 61
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Ile 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 Asn Arg Ala Gly Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 62

gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactg 60
 tcttgccgag cctctggatt caccttttagc agccatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact attactggtg gtgggtggtag catatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaaaaccgc 300
 gctggggagg gttactttga ctactggggc cagggaaccc tgggtcaccgt ctctca 357

<210> 63
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

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

<210> 64

<211> 315

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 64

tcctatgagc tgactcagcc actctcagtg tcagtggccc tgggacagac ggccaggatt 60
 acctgtgggg gagacaacat tggaaataaa gatgtgcact ggtaccagca gaagccaggc 120
 caggcccctg tgctgggtcat ctatagggat agcaaccggc cctctgggat ccctgaggga 180
 ttctctgggt ccaactcggg gaacacggcc accctgacca tcagcagagc ccaagccggg 240
 gatgaggctg actattactg tcaggtgtgg gacagcattt ggggtgttcgg cggagggacc 300
 aagctgaccg tccta 315

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 65

Ser Ser Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 66

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 66

agctcatata caagcatcag cacttgggtg

30

<210> 67

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 67

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 68

<211> 330

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 68

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggt ttttataact atgtctcctg gtaccaacag 120

cacccaggca aagccccga actcatgatt tatgatgtca gtaatcggcc ctcagggggtt 180

tctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcatcag cacttgggtg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330