



(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



1-0038201

(51)^{2006.01} C07K 16/22; A61P 35/00; C07K 16/32; (13) B
C07K 16/28; C07K 16/30; A61K 39/00

-
- (21) 1-2019-04571 (22) 19/01/2018
(86) PCT/IB2018/000088 19/01/2018 (87) WO2018/134681 26/07/2018
(30) 62/448,800 20/01/2017 US; 1730561.8 20/01/2017 EP
(45) 25/01/2024 430 (43) 30/01/2020 382A
(73) SANOFI (FR)
54, Rue La Boetie, 75008 Paris, FR
(72) SHAPIRO Gary (US); BROWEN Kevin (US); FINN Patrick (US); GREGORY
Richard C. (US); KODURI Rao (IN); LIU Feng (US); MALKOVA Natalia (US);
MANKOO Parminder (US); POLLARD Jack R. (US); QIU Huawei (US);
THEILHABER Joachim (US); WINTER Christopher (US); YU Marcella (US).
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)
-

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG TGF-BETA, CHẾ PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể pan-TGF- β được cải thiện để điều trị các tình trạng bệnh mà kháng thể TGF- β có liên quan, bao gồm bệnh tự miễn, tình trạng bệnh xơ hóa, và bệnh ung thư. Sáng chế còn bộc lộ các đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể, các chế phẩm dược phẩm và bộ kit bao gồm các kháng thể hoặc các đoạn của chúng.

Tham khảo chéo đến các đơn liên quan

Đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ Đơn Tạm Thời Mỹ 62/448,800 và Đơn Châu Âu Số 17305061.8, cả hai đều được nộp ngày 20 tháng 1 năm 2017. Bản mô tả của hai đơn ưu tiên này được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của chúng.

Danh mục trình tự

Đơn sáng chế này có chứa Danh Mục Trình Tự mà được nộp theo hình thức điện tử dưới định dạng ASCII và được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả này chỉ để tham khảo. Bản sao ASCII này, được tạo ra vào ngày 11 tháng 1 năm 2018, có tên là 022548_WO011_SL.txt và nặng 30.458 byte.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được cải thiện mà liên kết đặc hiệu với TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3 người, chế phẩm bao gồm kháng thể này, phương pháp, và việc sử dụng kháng thể này kết hợp với chất điều biến miễn dịch khác chẳng hạn như kháng thể kháng-PD-1.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố sinh trưởng chuyển dạng beta (TGF- β) là xytokin mà kiểm soát nhiều chức năng tế bào then chốt bao gồm sự tăng sinh, sự biệt hóa, sự sống, sự di chuyển, và sự chuyển tiếp biểu mô trung mô. Nó điều hòa các quy trình sinh học đa dạng, chẳng hạn như sự tạo thành nền ngoại bào, sự làm lành vết thương, sự phát triển phôi, sự phát triển xương, sự tạo máu, đáp ứng miễn dịch và viêm, và sự biến đổi ác tính. Sự mất điều hòa TGF- β dẫn đến tình trạng bệnh lý, ví dụ như, khuyết tật bẩm sinh, ung thư, viêm mãn tính, và bệnh tự miễn và bệnh xơ hóa.

TGF- β có ba đồng phân đã biết – TGF- β 1, 2, và 3. Cả ba đồng phân này ban đầu được dịch mã dưới dạng tiền peptit. Sau khi phân cắt, đầu tận cùng C trưởng thành vẫn kết hợp với đầu tận cùng N (gọi là peptit kết hợp tiềm tàng hay LAP), tạo thành phức hợp tiềm tàng nhỏ (SLC), mà được tiết ra từ tế bào. Sự mất khả năng của SLC để liên kết với thụ thể TGF- β II (TGF β RII) ngăn chặn sự ăn khớp thụ thể. Sự hoạt hóa bằng cách phân ly các đầu tận cùng N

và C diễn ra theo một trong số một vài cơ chế, bao gồm sự phân cắt phân giải protein, độ pH axit, hoặc sự biến đổi cấu trúc integrin (Connolly et al., Int J Biol Sci (2012) 8(7):964-78).

TGF- β 1, 2, và 3 có nhiều hướng trong chức năng của chúng và được biểu hiện theo các kiểu khác nhau ở các loại tế bào và mô. Chúng có hoạt tính *in vitro* tương tự, nhưng có sự bất hoạt riêng lẻ ở các loại tế bào cụ thể gợi ý vai trò *in vivo* không giống nhau mặc dù chúng có chung khả năng để liên kết với cùng thụ thể (Akhurst et al., Nat Rev Drug Discov (2012) 11(10):790-811). Khi TGF- β liên kết với TGF β RII, hoạt tính kinaza cấu trúc của thụ thể làm phosphoryl hóa và hoạt hóa TGF β RI, mà làm phosphoryl hóa SMAD2/3, cho phép kết hợp với SMAD4, định vị vào nhân, và phiên mã gen đáp ứng TGF- β . *Id.* Ngoài luồng tín hiệu chính tắc này, con đường không chính tắc truyền tín hiệu thông qua các yếu tố khác bao gồm p38 MAPK, PI3K, AKT, JUN, JNK, và NF- κ B. Việc truyền tín hiệu TGF- β cũng được điều biến bằng các con đường khác, bao gồm WNT, Hedgehog, Notch, INF, TNF, và RAS. Do đó kết quả cuối cùng của việc truyền tín hiệu TGF- β là sự giao tiếp chéo của tất cả các con đường tín hiệu này mà hợp thành tình trạng và môi trường của tế bào. *Id.*

Căn cứ vào các chức năng đa dạng của TGF- β , cần có kháng thể trị liệu đặc hiệu với pan-TGF- β an toàn đối với người bệnh (Bedinger et al., mAbs. (2016) 8(2):389–404). Tuy nhiên, TGF- β được bảo toàn cao giữa các loài. Kết quả là, việc sản xuất kháng thể đối với TGF- β người ở động vật chẳng hạn như chuột nhất là nhiệm vụ có nhiều thách thức.

Cũng có nhu cầu y tế đối với bệnh nhân hiện không được điều trị hiệu quả. Ví dụ như, hơn 50% bệnh nhân u melanin tiến triển trong nghiên cứu Checkmate-067 Pha III được điều trị bằng đơn trị liệu kháng thể kháng-PD1 nivolumab không có đáp ứng hoàn toàn hoặc một phần với liệu pháp này (Larkin et al., N Engl J Med (2015) 373:23–34; Redman et al., BMC Med (2016) 14:20-30).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được cải thiện mà liên kết đặc hiệu với TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3 người (tức là, đặc hiệu pan-TGF- β). Các kháng thể này ít có xu hướng tạo thành kháng thể nửa (tức là, phức hợp dạng dime có một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ) trong quá trình sản xuất. Chúng cũng có biên dạng dược động học tốt hơn chẳng hạn như thời gian bán thải tăng và do đó có thể mang lại lợi ích lâm sàng được cải thiện cho bệnh nhân. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng sự ức chế TGF- β , chẳng hạn như sự ức chế gây ra bởi kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, làm giảm bớt vi môi trường

kìm hãm miễn dịch trong khối u và làm cho liệu pháp miễn dịch có hiệu quả chẳng hạn như liệu pháp nhắm đích protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1), phối tử PD-1 1 (PD-L1) và 2 (PD-L2).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập mà liên kết đặc hiệu với TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3 người, có chứa các vùng xác định tính bổ sung chuỗi nặng (CDR) 1-3 trong SEQ ID NO:1 và CDR1-3 chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO:2, trong đó kháng thể này có chứa vùng không đổi IgG₄ người có đột biến ở vị trí 228 (đánh số EU). Theo một số phương án, đột biến là đột biến serin-thành-prolin (S228P). Theo một số phương án, kháng thể có chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) tương ứng với các gốc 1-120 của SEQ ID NO:1 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) tương ứng với các gốc 1-108 của SEQ ID NO:2. Theo các phương án khác, kháng thể có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:1 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:2. Sáng chế còn đề cập đến mảnh liên kết kháng nguyên F(ab')₂ của kháng thể nêu trên.

Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể hoặc mảnh theo sáng chế có thời gian bán thải tăng, sự bộc lộ tăng, hoặc cả hai, khi so với fresolimumab. Ví dụ như, sự tăng lên là tăng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100% hoặc nhiều hơn. Sự bộc lộ của thuốc chẳng hạn như kháng thể hoặc mảnh theo sáng chế là hàm của nồng độ của thuốc trong cơ thể theo thời gian. Nồng độ của thuốc trong cơ thể thường được chỉ ra bởi hàm lượng của thuốc trong máu, huyết tương, hoặc huyết thanh. Thời gian bán thải và sự bộc lộ (sự bộc lộ sinh học) của thuốc có thể được đo bằng phương pháp đã biết rõ, như minh họa trong Ví dụ 7 dưới đây.

Sáng chế còn đề xuất hợp phần có chứa kháng thể theo sáng chế, trong đó hợp phần này có chứa nhỏ hơn 1% kháng thể nửa. Sự tạo thành kháng thể nửa có thể được xác định thông qua phân tích độ tinh sạch của chế phẩm kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng, ví dụ như, điện di mao quản SDS trong điều kiện không khử hoặc phân tích SDS-PAGE không khử, sau đó là đo tỉ trọng, hoặc RP-HPLC (Angal et al., Mol Immunol (1993) 30(1):105-8; Bloom et al., Protein Science (1997) 6:407-415; Schuurman et al., (2001) 38(1):1-8; và Solanos et al., Anal Chem (2006) 78:6583-94). Theo một số phương án, hợp phần này là được phẩm còn chứa tá dược được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự truyền tín hiệu TGF- β ở bệnh nhân (người) cần chúng, có chứa bước cho bệnh nhân dùng lượng có tác dụng điều trị của kháng thể hoặc mảnh theo sáng chế. Theo một số phương án, bệnh nhân mắc bệnh qua trung gian miễn dịch (ví dụ, xơ cứng bì), tình trạng bệnh xơ hóa (ví dụ, tình trạng bệnh xơ hóa thận chẳng hạn như xơ chai cầu thận khu trú từng vùng (FSGS), hoặc tình trạng bệnh xơ hóa phổi chẳng hạn như xơ phổi tự phát), hoặc khuyết tật bẩm sinh hoặc xương (ví dụ, bệnh xương thủy tinh). Theo một số phương án, bệnh nhân mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh dùng trong phương pháp ức chế sự biệt hóa của tế bào T CD4⁺ thành tế bào T điều hòa cảm ứng (iTreg). Kháng thể hoặc mảnh có thể làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch. Tác động này của kháng thể hoặc mảnh giúp hoạt hóa hệ miễn dịch và làm cho liệu pháp miễn dịch có hiệu quả. Hiệu quả của phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này có thể được chỉ ra bằng, ví dụ như, một hoặc nhiều dấu hiệu sau đây ở bệnh nhân (ví dụ, trong mô khối u của bệnh nhân): (1) sự tăng lên của hàm lượng MIP2 và/hoặc KC/GRO, (2) sự hoạt hóa hoặc sự thâm nhiễm vào mô khối u của tế bào T CD8⁺ chẳng hạn như tế bào T CD8⁺ INF- γ -dương, và (3) sự tăng lên của sự kết cụm của tế bào giết tự nhiên (NK).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị ung thư ở bệnh nhân (người), có chứa bước cho bệnh nhân dùng (1) lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể hoặc mảnh theo sáng chế, và (2) lượng hữu hiệu để điều trị của chất ức chế của protein điểm kiểm tra miễn dịch. Hai tác nhân này có thể được dùng theo một trong hai cách đồng thời (ví dụ, trong hợp phần đơn lẻ hoặc trong các hợp phần riêng rẽ), hoặc tuần tự. Hai tác nhân này có thể, ví dụ như, được dùng vào cùng ngày. Theo một số phương án, tác nhân trị liệu (1) được dùng cho bệnh nhân trước (ví dụ, một hoặc nhiều ngày trước) tác nhân trị liệu (2).

Theo một số phương án, protein điểm kiểm tra miễn dịch là PD-1, PD-L1, hoặc PD-L2. Theo các phương án khác, chất ức chế của protein điểm kiểm tra miễn dịch là kháng thể kháng-PD-1. Theo các phương án khác, kháng thể kháng-PD-1 có chứa (1) CDR1-3 chuỗi nặng trong SEQ ID NO:5 và CDR1-3 chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO:6, (2) trình tự axit amin V_H tương ứng với các gốc 1-117 của SEQ ID NO:5 và trình tự axit amin V_L tương ứng với các gốc 1-107 của SEQ ID NO:6, hoặc (3) trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:5 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một phương án cụ thể, phương pháp có chứa bước dùng cho bệnh nhân

ung thư kháng thể kháng-TGF- β có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:1 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:2, và kháng thể kháng-PD-1 có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:5 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một số phương án, bệnh nhân khó chữa bằng đơn trị liệu kháng thể kháng-PD-1. Bệnh nhân có thể mắc u melanin tiến triển hoặc di căn, hoặc ung thư biểu mô tế bào vảy da.

Trong một số chế độ điều trị, kháng thể kháng-TGF- β và kháng thể kháng-PD-1 được dùng 2 tuần một lần hoặc 3 tuần một lần cho bệnh nhân. Trong một số chế độ điều trị, hai chất này được dùng lần lượt ở liều lượng bằng 0,01-40 (ví dụ, 0,02-20, 0,05-15, hoặc 0,05-20) mg/kg khối lượng cơ thể.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân cần chúng, có chứa bước cho bệnh nhân dùng chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch và kháng thể hoặc mảnh theo sáng chế. Theo một số phương án, chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch là kháng thể kháng-PD-1, chẳng hạn như kháng thể có chứa (1) HCDR1-3 trong SEQ ID NO:5 và LCDR1-3 trong SEQ ID NO:6; (2) VH và VL lần lượt tương ứng với các gốc 1-117 trong SEQ ID NO:5 và các gốc 1-107 trong SEQ ID NO:6; hoặc (3) chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO:6.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị nhiều bệnh ung thư, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, u melanin (ví dụ, di căn hoặc tiến triển), ung thư phổi (ví dụ, ung thư phổi tế bào không nhỏ), ung thư biểu mô tế bào vảy da, ung thư kết trực tràng, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư ống dẫn trứng, ung thư tử cung, ung thư đầu và cổ (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ), ung thư gan (ví dụ, ung thư biểu mô gan), ung thư đường tiết niệu, và ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào thận). Theo một số phương án, bệnh nhân có khối u trung mô hoặc kiểu phụ trung mô của khối u rắn. Các ví dụ về khối u rắn này bao gồm các khối u rắn trong ruột kết (ví dụ, ung thư kết trực tràng), buồng trứng, đầu và cổ (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ), gan (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào gan), và hệ tiết niệu.

Theo một số phương án, ung thư, bao gồm khối u trung mô, có thể là đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều chất trong số ACTA2 (α 2 actin cơ trơn), VIM

(vimentin), MGP (Protein Gla Nền), ZWINT (Protein Tâm Động Tương Tác ZW10), và ZEB2 (Homeobox liên kết hộp E ngón tay kẽm 2). Mức độ biểu hiện của chỉ thị sinh học này có thể được xác định, ví dụ như, ở hàm lượng mRNA hoặc hàm lượng protein trong mẫu sinh học từ bệnh nhân, chẳng hạn như mẫu sinh thiết khối u hoặc tế bào khối u tuần hoàn.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, mảnh, hoặc hợp phần nêu trên để sử dụng trong việc điều trị tình trạng bệnh được mô tả trong bản mô tả này, cũng như là việc sử dụng kháng thể, mảnh, hoặc hợp phần nêu trên trong việc sản xuất thuốc để điều trị tình trạng bệnh được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế còn bao gồm vật truyền biểu hiện axit nucleic mã hóa cho chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, hoặc cả hai, của kháng thể theo sáng chế; tế bào chủ có chứa các trình tự mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể; và phương pháp tạo ra kháng thể bằng cách sử dụng tế bào chủ có chứa các bước nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường nuôi cấy thích hợp để cho phép biểu hiện gen kháng thể và sau đó thu hoạch kháng thể.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các HÌNH 1A-E là các biểu đồ thể hiện tác dụng của Ab1, fresolimumab, và 1D11 lên sự tăng sinh của tế bào phổi chồn vizon (Mv 1 Lu) được xử lý bằng 1 ng/ml TGF- β 1 người (A), TGF- β 2 người (B), TGF- β 3 người (C), TGF- β 1 chuột nhắt (D), hoặc TGF- β 2 chuột nhắt (E). Nồng độ kháng thể là theo μ g/ml.

HÌNH 2 là biểu đồ cột thể hiện tác dụng của 50 μ g/ml Ab1 lên sự biệt hóa tế bào T điều hòa cảm ứng (iTreg) người. Sự kích thích được cung cấp cho tế bào T là các kháng thể kháng-CD3 và kháng-CD28 cộng với IL-2.

HÌNH 3 là biểu đồ cột thể hiện tác dụng của Ab1 lên sự biệt hóa tế bào T điều hòa cảm ứng (iTreg) người trong môi trường nuôi cấy tế bào T CD4⁺ người được xử lý bằng 2 ng/ml TGF- β 1 người. Sự kích thích được cung cấp cho tế bào T là các kháng thể kháng-CD3 và kháng-CD28 cộng với IL-2.

HÌNH 4 là biểu đồ cột thể hiện tác dụng của Ab1 (30 μ g/ml) và TGF- β 1 người (18 ng/ml) lên sự biểu hiện luxiferaza gây ra bởi NFATc trên tế bào T Jurkat sau khi kích thích tế bào T và xử lý kháng-PD-1.

HÌNH 5 là biểu đồ thể hiện thể tích khối u trung vị với độ lệch chuẩn trung vị (MAD) trong nhóm điều trị được chỉ ra bằng cách sử dụng mô hình chuột nhắt ruột kết MC38

C57BL/6. Tá dược lỏng: PBS. "Kháng-PD-1": Mab x-kháng-mPD-1 (xem phần Mô Tả Chi Tiết Sáng Chế dưới đây). "Đối chứng isotyp của Ab1": hIgG4 kháng-HEL.

HÌNH 6 là biểu đồ điểm phân tán thể hiện sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở vào ngày 27 của việc điều trị được chỉ ra bằng cách sử dụng mô hình chuột nhất ruột kết MC38 C57BL/6. Đối chứng: PBS. "mIgG1 RPM114 kháng-PD-1": Mab x-kháng-mPD-1.

Các HÌNH 7A-F là các biểu đồ thể hiện thể tích khối u theo thời gian đối với mỗi nhóm điều trị được chỉ ra bằng cách sử dụng mô hình chuột nhất ruột kết MC38 C57BL/6. Mỗi đường trong các biểu đồ thể hiện một con vật. "mpk": mg/kg. "Đối chứng isotyp Ab1": hIgG4 kháng-HEL. α PD1: Mab x-kháng-mPD-1.

HÌNH 8 là biểu đồ thể hiện tác dụng của Ab1 lên nồng độ TGF- β 1 hoạt tính trong dịch dung giải khối u LoVo.

HÌNH 9A là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của Ab1 và fresolimumab theo thời gian trong năm nhóm chuột cống được cấp liều đơn lẻ của kháng thể ở 5 mg/kg. Các nhóm (Gr.) 1-3 được cấp ba mẻ khác nhau (B1, B2, và B3) của fresolimumab. Các nhóm 4 và 5 được cấp hai mẻ khác nhau (B1 và B2) của Ab1.

HÌNH 9B là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của Ab1 và fresolimumab theo thời gian ở khi được cấp liều đơn lẻ của kháng thể ở 1 mg/kg.

HÌNH 9C là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của Ab1 và fresolimumab theo thời gian ở khi được cấp năm liều mỗi tuần của Ab1 ở 1 mg/kg cho mỗi liều hoặc hai tuần một liều của fresolimumab ở 1 mg/kg cho mỗi liều trong khoảng thời gian được chỉ ra của các nghiên cứu.

HÌNH 9D là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của Ab1 và fresolimumab theo thời gian ở khi được cấp liều đơn lẻ của kháng thể ở 10 mg/kg.

HÌNH 9E là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của Ab1 và fresolimumab theo thời gian ở khi được cấp năm liều mỗi tuần của Ab1 ở 10 mg/kg cho mỗi liều hoặc hai tuần một liều của fresolimumab ở 10 mg/kg cho mỗi liều trong khoảng thời gian được chỉ ra của các nghiên cứu.

HÌNH 10A là biểu đồ thể hiện sự thay đổi của hàm lượng TGF- β 1 ở khối u MC38 sau khi điều trị bằng Ab1 (+/- kháng-PD1).

HÌNH 10B là biểu đồ thể hiện sự thay đổi của hàm lượng MIP-2 ở khối u MC38 sau khi điều trị bằng Ab1 (+/- kháng-PD1).

HÌNH 10C là biểu đồ thể hiện sự thay đổi của hàm lượng KC/GRO ở khối u MC38 sau khi điều trị bằng Ab1 (+/- kháng-PD1).

HÌNH 11A là các biểu đồ định lượng sự bắt màu CellTrace Violet và sự bắt màu IFN- γ của tế bào CD8^{dương}.

HÌNH 11B là biểu đồ thể hiện rằng Ab1 khôi phục cả sự tăng sinh và sự sản xuất IFN- γ ở tế bào T CD8⁺ được xử lý bằng TGF β .

HÌNH 12A là biểu đồ thể hiện độ nhiều tương đối của tế bào T CD8⁺ (được biến đổi log2) trong tập hợp của mô hình khối u chuột nhất đồng sinh đối với ung thư ruột kết, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, u lympho, ung thư vú, u melanin, ung thư trung biểu mô và ung thư thận.

HÌNH 12B là biểu đồ thể hiện sự hoạt hóa con đường TGF β trong tập hợp các mô hình khối u chuột nhất đồng sinh đối với ung thư ruột kết, bệnh bạch cầu, ung thư phổi, u lympho, ung thư vú, u melanin, ung thư trung biểu mô và ung thư thận.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng đặc hiệu pan-TGF- β được cải thiện mà ít có xu hướng tạo thành kháng thể nữa trong khi cũng có biên dạng được động học tốt hơn chẳng hạn như sự bộc lộ cao hơn trong cơ thể so với các kháng thể đã biết trước đây. Kháng thể này được gọi chung là "Ab1 và kháng thể liên quan" và có các đặc điểm cấu trúc chung là chúng có CDR chuỗi nặng (HCDR) 1-3 trong SEQ ID NO:1 và CDR chuỗi nhẹ (LCDR) 1-3 trong SEQ ID NO:2, và có vùng không đổi IgG4 người trong đó gốc 228 (đánh số EU) trong vùng bản lề đã được đột biến từ serin thành prolin. P228 được đóng khung và bôi đậm trong trình tự của SEQ ID NO: 1 được thể hiện dưới đây.

Kháng thể Ab1 có khối lượng phân tử ước tính là 144 KD khi chưa glycosyl hóa. Trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của nó lần lượt là các SEQ ID NO:1 và 2. Hai trình tự này được thể hiện dưới đây. Các miền biến đổi được in nghiêng. CDR được thể hiện trong khung. Vị trí glycosyl hóa trong miền không đổi của chuỗi nặng được in đậm (N297).

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG
VIPIVDIANY
AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW
 GQGTLVTVSS

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS

GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCP^PCP
APEFLGGPSV

FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTY

RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK

NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL
TVDKSRWQEG

NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:1)

*ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC*RASQSLG SSYLA*WYQQK PGQAPRLLIY*
GASSRAP*GIP*

*DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC*Q QYADSPIT*FG QGTRLEIKRT*
VAAPSVFIFP

PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYSLSTL

TLISKADYEKH KUYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO:2)

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế, chẳng hạn như kháng thể kháng-TGF- β , không có lysin ở đầu tận cùng C trong chuỗi nặng. Lysin ở đầu tận cùng C có thể được loại bỏ trong quá trình sản xuất hoặc bằng công nghệ tái tổ hợp (*tức là*, trình tự mã hóa của chuỗi nặng không bao gồm bộ ba mã hóa cho lysin ở đầu tận cùng C). Do đó sáng chế cũng dự tính rằng kháng thể có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO: 1 không có lysin ở đầu tận cùng C.

Ab1 và kháng thể liên quan liên kết đặc hiệu với TGF- β 1, - β 2, và - β 3 người. "Đặc hiệu" có nghĩa là sự liên kết có K_D nhỏ hơn 10^{-7} M, chẳng hạn như nhỏ hơn 10^{-8} M (ví dụ, 1-5 nM), như xác định bằng, ví dụ như, cộng hưởng plasmon bề mặt (xem, ví dụ như, Ví dụ 1 dưới đây), hoặc Bio-Layer Interferometry. Ab1 và kháng thể liên quan cũng có thể có hiệu lực trung hòa TGF- β mạnh khi thử nghiệm trong thử nghiệm tế bào biểu mô phổi chồn vizon (xem, ví dụ như, Ví dụ 2 dưới đây), hoặc EC50 nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 đến 1 μ g/ml

như xác định trong thử nghiệm cảm ứng IL-11 tế bào A549 (xem, ví dụ như, Ví dụ 6 trong Công Bố PCT WO 2006/086469, bản bộc lộ của nó được kết hợp để tham khảo trong bản mô tả này với toàn bộ nội dung của nó).

Các tính chất liên kết kháng nguyên và trung hòa của Ab1 và kháng thể liên quan có thể so sánh được với kháng thể kháng-TGF- β fresolimumab trước đây (kháng thể PET1073G12 IgG₄ dòng mầm được mô tả trong tài liệu WO 2006/086469). Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của fresolimumab, bao gồm các trình tự dẫn đầu, lần lượt được thể hiện trong các SEQ ID NO:3 và 4. Như thấy được trong SEQ ID NO:3, fresolimumab không có prolin ở vị trí 228 (đánh số EU, mà tương ứng với vị trí thực sự 247 trong SEQ ID NO:3). Ab1 và kháng thể liên quan có một vài đặc điểm được cải thiện so với fresolimumab.

Trong quá trình sản xuất, fresolimumab có thể tạo thành nhiều bằng 6-18% kháng thể nửa (tức là, đime có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chứ không phải là tetrame có hai chuỗi nặng được tạo phức với hai chuỗi nhẹ) trong điều kiện biến tính không khử. Ngược lại, hiệu suất Ab1 về cơ bản nhỏ hơn kháng thể nửa (<1%). Do đó, Ab1 và kháng thể liên quan mang lại sự tăng lên đối với sản phẩm thuốc tinh khiết hơn trong quá trình sản xuất.

Ngoài ra, Ab1 và kháng thể liên quan có thể có biên dạng dược động học (PK) được cải thiện so với fresolimumab. Chúng có thể có động thái PK tuyến tính với thời gian bán thải lâu hơn nhiều và tốc độ loại trừ thấp hơn so với fresolimumab, dẫn đến sự bộc lộ *in vivo* cao hơn khoảng 1,7 lần so với fresolimumab. Ví dụ như, ở chuột cống, Ab1 đã được thể hiện là có thời gian bán thải trung bình là 7,1 ngày, so với của fresolimumab là 4,3 ngày, và tốc độ loại trừ (CL) là 0,30 ml/giờ/kg, so với của fresolimumab là 0,51 ml/giờ/kg (Ví dụ 7, *dưới đây*). Ở khỉ cynomolgus, Ab1 đã được chứng minh là có thời gian bán thải trung bình là 13 ngày, so với của fresolimumab là 4,5 ngày, và tốc độ loại trừ (CL) là 0,40 ml/giờ/kg, so với của fresolimumab là 0,66 ml/giờ/kg. *Id.* Các tính chất PK được cải thiện này gợi ý rằng Ab1 và kháng thể liên quan có thể được cấp cho bệnh nhân ở liều lượng thấp hơn và/hoặc tần suất nhỏ hơn so với fresolimumab để đạt được cùng hiệu quả lâm sàng hoặc hiệu quả lâm sàng tốt hơn trong khi gây ra ít tác dụng phụ có hại hơn và ít phản ứng kháng thể kháng-thuốc hơn, do đó cho phép khoảng thời gian điều trị lâu hơn khi cần thiết.

Ngoài ra, trong các nghiên cứu độc học của fresolimumab ở động vật linh trưởng không phải là người, sự tương quan giữa sự bộc lộ thuốc và các sự kiện có hại chẳng hạn như thiếu máu được quan sát thấy. Tuy nhiên, không có sự kiện nào như vậy được quan sát thấy trong

các nghiên cứu tương tự được thực hiện với Ab1 ở sự bộc lộ tương đương hoặc thậm chí cao hơn.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, chúng tôi giả thiết rằng đột biến gốc 228 trong chuỗi nặng của Ab1 và kháng thể liên quan dẫn đến độ ổn định tăng lên cũng như là các biên dạng PK và độ độc được cải thiện.

Miễn không đổi của Ab1 và kháng thể liên quan có thể được cải biến thêm khi cần, ví dụ như, ở gốc Kabat L248 (ví dụ, bằng cách đưa vào đột biến L248E), để làm giảm chức năng tác động không mong muốn bất kỳ của phân tử.

Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" (Ab) hoặc "globulin miễn dịch" (Ig) dùng để chỉ protein dạng tetrame có chứa hai chuỗi nặng (H) (khoảng 50-70 kDa) và hai chuỗi nhẹ (L) (khoảng 25 kDa) nối với nhau bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng gồm có miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng không đổi chuỗi nặng (C_H). Mỗi chuỗi nhẹ gồm có miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) và vùng không đổi chuỗi nhẹ (C_L). Các miền V_H và V_L có thể được chia nhỏ thêm thành vùng siêu biến, được gọi là "vùng xác định tính bổ sung" (CDR), xen kẽ với các vùng mà được bảo toàn hơn, gọi là "vùng khung" (FR). Mỗi V_H hoặc V_L gồm có ba CDR và bốn FR, sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl theo thứ tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Sự chỉ định các axit amin vào mỗi vùng có thể là theo định nghĩa IMGT® (Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003); hoặc định nghĩa của Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 and 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); hoặc Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

Thuật ngữ "kháng thể người" dùng để chỉ kháng thể trong đó các trình tự miền biến đổi và vùng không đổi có nguồn gốc từ trình tự ở người. Thuật ngữ này bao hàm kháng thể với các trình tự có nguồn gốc từ gen người, nhưng các trình tự này đã được cải biến, ví dụ như, để làm giảm khả năng gây miễn dịch, làm tăng ái lực, và làm tăng độ ổn định. Thuật ngữ này bao hàm kháng thể được sản xuất theo cách tái tổ hợp ở tế bào không phải là tế bào người, mà có thể truyền sự glycosyl hóa không điển hình của tế bào người.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" dùng để chỉ kháng thể mà có chứa các trình tự từ hai loài động vật khác nhau. Ví dụ như, kháng thể khảm có thể chứa V_H và V_L của kháng thể chuột nhất (tức là, kháng thể được mã hóa bởi gen kháng thể chuột nhất chẳng hạn như kháng thể

thu được từ chuột nhất đã được gây miễn dịch bằng cách sử dụng công nghệ tế bào lai) liên kết với vùng không đổi của kháng thể từ loài khác (ví dụ, người, thỏ, hoặc chuột cống).

Thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể dùng để chỉ mảnh của kháng thể mà giữ lại khả năng để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế là mảnh $F(ab')_2$, mà là mảnh hóa trị hai có chứa hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu disulfua ở vùng bản lề (Fab là mảnh kháng thể hóa trị một gồm có các miền V_L , V_H , C_L và C_{H1}). Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế cũng có thể có chứa miền C_{H2} hoặc C_{H3} .

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này có thể được phân lập. Thuật ngữ "protein được phân lập", "polypeptit được phân lập" hoặc "kháng thể được phân lập" dùng để chỉ protein, polypeptit hoặc kháng thể mà tùy theo nguồn gốc hoặc nguồn tạo dẫn xuất của nó (1) không liên quan đến các thành phần đi kèm theo nó trong trạng thái tự nhiên của nó, (2) về cơ bản không có các protein khác từ cùng loài, (3) được biểu hiện bởi tế bào từ loài khác, hoặc (4) không có trong tự nhiên. Do đó, polypeptit mà được tổng hợp hóa học hoặc được tổng hợp trong hệ thống tế bào khác với tế bào mà nó bắt nguồn từ đó trong tự nhiên sẽ được "phân lập" khỏi các thành phần đi kèm trong tự nhiên của nó. Protein cũng có thể được hoàn trả về cơ bản không chứa các thành phần đi kèm với nó trong tự nhiên bằng cách phân lập, bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein đã biết trong lĩnh vực.

1. Sử Dụng Ab1 Và Kháng Thể Liên Quan

Thụ thể TGF- β được biểu hiện rộng rãi trên tế bào miễn dịch, dẫn đến tác dụng rộng của TGF- β ở cả hệ miễn dịch bẩm sinh và hệ miễn dịch tập nhiễm. TGF- β liên kết với nhiều tình trạng bệnh, ví dụ như, khuyết tật bẩm sinh, ung thư, viêm mãn tính, bệnh tự miễn, và bệnh xơ hóa. Lượng có tác dụng điều trị của Ab1 hoặc kháng thể liên quan có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh này. Lượng "hữu hiệu để điều trị" dùng để chỉ lượng của Ab1, kháng thể liên quan, hoặc tác nhân trị liệu khác được đề cập đến trong bản mô tả này, mà làm giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng của tình trạng bệnh được điều trị. Lượng này có thể thay đổi dựa trên tình trạng bệnh hoặc bệnh nhân được điều trị, và có thể được xác định bởi chuyên gia chăm sóc sức khỏe bằng cách sử dụng nguyên tắc đã được thiết lập rõ.

Theo một số phương án, Ab1 hoặc kháng thể liên quan có thể được dùng ở 40, 20, hoặc 15 mg/kg hoặc nhỏ hơn (chẳng hạn như 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 mg/kg). Theo một số phương án khác, liều lượng có thể là 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1,

0,2, 0,3, 0,4, hoặc 0,5 mg/kg. Tần suất dùng liều lượng có thể là, ví dụ như, hàng ngày, hai, ba, bốn, hoặc năm ngày một lần, hàng tuần, hai tuần một lần, hoặc ba tuần một lần, hàng tháng, hoặc hai tháng một lần. Kháng thể có thể được dùng trong tĩnh mạch (ví dụ, truyền trong tĩnh mạch trong thời gian 0,5-8 giờ), dưới da, tại chỗ, hoặc đường dùng khác bất kỳ mà thích hợp đối với tình trạng bệnh và chế phẩm thuốc.

Ab1 và kháng thể liên quan có nguồn gốc từ gen kháng thể người và do đó có khả năng gây miễn dịch thấp ở người. Nghiên cứu độc học của Ab1 được nêu chi tiết trong Ví dụ 8 dưới đây. Các tác dụng phụ nhất định ở tim và phổi được quan sát thấy ở chuột cống. Do đó, bệnh nhân có thể được theo dõi về các sự kiện có hại khi điều trị bệnh nhân bằng Ab1 hoặc kháng thể liên quan.

Theo một số phương án, hiệu quả của kháng thể theo sáng chế có thể được chỉ ra bằng một hoặc nhiều tác dụng sau đây ở bệnh nhân (ví dụ, ở mô bị ảnh hưởng chẳng hạn như mô khối u ở bệnh nhân): (1) sự giảm đi của hàm lượng hoặc hoạt tính của TGF- β , (2) sự tăng lên của hàm lượng MIP2 và/hoặc KC/GRO, (3) sự hoạt hóa hoặc sự thâm nhiễm vào mô khối u của tế bào T CD8⁺ chẳng hạn như tế bào T CD8⁺ INF- γ -dương, và (4) sự tăng lên của sự kết cụm của tế bào giết tự nhiên (NK).

A. Tình Trạng Bệnh Không Phải Là Ung Thư

Tình trạng bệnh mà có thể được điều trị bằng Ab1 và kháng thể liên quan có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khuyết tật xương (ví dụ, bệnh xương thủy tinh), viêm cuộn tiểu cầu thận, sẹo thần kinh hoặc da, xơ hóa phổi (ví dụ, xơ phổi tự phát), xơ hóa do phóng xạ gây ra, xơ hóa gan, xơ hóa tủy xương, xơ cứng bì, bệnh qua trung gian miễn dịch (bao gồm viêm khớp dạng thấp, đa xơ cứng, luput ban đỏ hệ thống, hội chứng Sjogren, bệnh Berger, và sự thải bỏ mảnh ghép), và bệnh co thắt Dupuytren.

Chúng cũng có thể hữu dụng để điều trị, ngăn ngừa và làm giảm nguy cơ xảy ra của chức năng thận không đủ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, xơ chai cầu thận khu trú từng vùng (FSGS), bệnh thận do tiểu đường (typ I và typ II), bệnh thận do phóng xạ, bệnh thận tắc nghẽn, xơ cứng bì hệ thống lan tỏa, bệnh thận di truyền (ví dụ, bệnh thận đa nang, bệnh xốp thận, thận móng ngựa), viêm cuộn tiểu cầu thận, xơ cứng thận, bệnh lắng đọng canxi ở thận, cao huyết áp toàn thân hoặc cầu thận, bệnh ống thận-mô kẽ, chứng nhiễm axit ống thận, lao thận, và nhồi máu thận. Cụ thể là, chúng hữu dụng khi được kết hợp với chất đối kháng của hệ thống renin-angiotensin- aldosteron bao gồm nhưng không giới hạn ở: chất ức chế renin,

chất ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE), chất đối kháng thụ thể Ang II (còn gọi là "chất phong bế thụ thể Ang II"), và chất đối kháng aldosteron. Xem, ví dụ như, WO 2004/098637, bản bộc lộ của nó được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Ab1 và kháng thể liên quan hữu dụng để điều trị bệnh và tình trạng bệnh kết hợp với sự lắng đọng của ECM, chẳng hạn như xơ cứng bì hệ thống, dính sau mổ, sẹo lồi và phì đại, bệnh lý dịch kính-võng mạc tăng sinh, phẫu thuật đặt van dẫn lưu trong glôcôm, tổn thương giác mạc, bệnh đục thủy tinh thể, bệnh Peyronie, hội chứng suy liệt hô hấp ở người trưởng thành, bệnh xơ gan, sẹo sau nhồi máu cơ tim, tái phát hẹp sau khi nong mạch, sẹo sau khi xuất huyết dưới màng nhện, xơ hóa sau khi phẫu thuật mở ống sống, xơ hóa sau khi sửa chữa gân và các sửa chữa khác, xơ gan mật (bao gồm viêm xơ chai đường mật), viêm màng ngoài tim, viêm màng phổi, phẫu thuật mở thông khí quản, chấn thương CNS xuyên thấu, hội chứng đau cơ tăng bạch cầu ura axit, bệnh tái phát hẹp mạch, bệnh tắc tĩnh mạch, viêm tụy và bệnh khớp vẩy nến.

Ab1 và kháng thể liên quan còn hữu dụng trong tình trạng bệnh trong đó sự thúc đẩy của sự tái tạo biểu mô là có lợi. Tình trạng bệnh này bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh của da, chẳng hạn như loét tĩnh mạch, loét do thiếu máu cục bộ (loét điểm tỳ), loét do tiểu đường, vị trí ghép, vị trí cho ghép, chỗ bị trầy da và bỏng, bệnh của biểu mô phế quản, chẳng hạn như bệnh hen, ARDS, bệnh của biểu mô ruột, chẳng hạn như viêm niêm mạc kết hợp với sự điều trị gây độc tế bào, loét thực quản (bệnh trào ngược), bệnh trào ngược dạ dày-thực quản, loét dạ dày, thương tổn ruột non và ruột già (bệnh viêm ruột).

Việc sử dụng khác nữa của Ab1 và kháng thể liên quan là ở tình trạng bệnh trong đó sự tăng sinh tế bào nội mô là điều mong muốn, ví dụ như, trong việc làm ổn định mảng xơ vữa động mạch, thúc đẩy việc làm lành vòng nối mạch, hoặc ở tình trạng bệnh trong đó sự ức chế của sự tăng sinh tế bào cơ trơn là điều mong muốn, chẳng hạn như trong bệnh động mạch, tái phát hẹp và bệnh hen.

Ab1 và kháng thể liên quan cũng hữu dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với sự lây nhiễm qua trung gian đại thực bào chẳng hạn như sự lây nhiễm bởi *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis* và *Mycobacterium leprae*, cũng như là động vật nguyên sinh *Toxoplasma gondii*, nấm *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*,

Candida parapsilosis, và *Cryptococcus neoformans*. Chúng cũng hữu dụng để làm giảm sự kìm hãm miễn dịch gây ra bởi, ví dụ như, khối u, AIDS hoặc bệnh tạo u hạt.

Ab1 và kháng thể liên quan cũng hữu dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị tình trạng bệnh về mắt chẳng hạn như glôcôm và sẹo sau khi cắt bẻ củng mạc.

B. Tình Trạng Bệnh Ung Thư

TGF- β điều hòa một vài quy trình sinh học, bao gồm sự tăng sinh tế bào, sự chuyển tiếp biểu mô-trung mô (EMT), tái mô hình chất nền, hình thành mạch, và chức năng miễn dịch. Mỗi quy trình này góp phần vào sự tiến triển khối u. Vai trò gây hại phổ biến của TGF- β ở bệnh nhân ung thư qua các dấu hiệu cũng được gợi ý bởi sự tăng lên của nó ở trong vi môi trường khối u cũng như là toàn thân. Xem, ví dụ như, Kadam et al., Mol. Biomark. Diagn. (2013) 4(3). Các nghiên cứu đã chứng minh rằng ở tình trạng ác tính, TGF- β có thể gây cảm ứng EMT và kiểu hình trung mô thu được dẫn đến sự di chuyển và sự xâm lấn tế bào tăng lên.

Ab1 và kháng thể liên quan hữu dụng trong điều trị bệnh tăng sinh, chẳng hạn như ung thư bao gồm nhưng không giới hạn ở ung thư da (ví dụ, u melanin, bao gồm u melanin không thể cắt bỏ được hoặc di căn, ung thư biểu mô tế bào vảy da, và u gai sừng), ung thư phổi (ví dụ, ung thư phổi tế bào không nhỏ), ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư kết trực tràng, ung thư tụy, ung thư gan (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào gan), ung thư phúc mạc nguyên phát, ung thư bàng quang, ung thư thận (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào thận), ung thư biểu mô đường tiết niệu, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư ống dẫn trứng, ung thư cổ tử cung, ung thư tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tinh hoàn, ung thư đầu và cổ (ví dụ, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ), ung thư não, u nguyên bào đệm, u thần kinh đệm, ung thư trung biểu mô, bệnh bạch cầu, và u lympho.

Theo một số phương án, Ab1 và kháng thể liên quan hữu dụng trong việc điều trị ung thư ở bệnh nhân mà trị liệu trước đó cho họ dựa trên tác nhân trị liệu kháng-PD-1, kháng-PD-L1 hoặc kháng-PD-L2 đã thất bại hoặc đoán trước là thất bại, tức là, bệnh nhân mà không đáp ứng hoặc đoán trước là không đáp ứng đối với trị liệu kháng-PD-1, kháng-PD-L1, hoặc kháng-PD-L2. Theo một số phương án, Ab1 và kháng thể liên quan hữu dụng trong điều trị ung thư ở bệnh nhân mà đã tái phát từ trị liệu kháng-PD-1, kháng-PD-L1, hoặc kháng-PD-L2 trước đó. Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đ đoán trước" có nghĩa là người có hiểu

biết trung bình trong lĩnh vực y tế có thể tiên liệu, mà không dùng liệu pháp, rằng bệnh nhân sẽ đáp ứng hay không đáp ứng và rằng việc trị liệu sẽ thất bại hoặc không hiệu quả, dựa trên hiểu biết y học chung của họ và tình trạng bệnh cụ thể của bệnh nhân.

Theo một số phương án, ung thư là các kiểu phụ trung mô của khối u rắn, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ung thư kết trực tràng trung mô, ung thư buồng trứng trung mô, ung thư phổi trung mô, ung thư đầu trung mô và ung thư cổ trung mô. Sự chuyển tiếp biểu mô trung mô (EMT) thúc đẩy các tính chất di chuyển và xâm lấn của tế bào bằng cách điều hòa giảm gen tế bào biểu mô và tăng cường sự biểu hiện gen trung mô. EMT là dấu xác nhận tiêu chuẩn của sự tiến triển và sự xâm lấn khối u. Lên đến một phần tư ung thư đại trực tràng và buồng trứng là trung mô. Do đó, bằng cách ức chế TGF- β và sự cảm ứng của nó của EMT, Ab1 hoặc kháng thể liên quan có thể được sử dụng để điều trị khối u rắn trung mô. Các kiểu phụ trung mô của khối u rắn có thể được xác định bằng một số lượng các chỉ thị di truyền và thử nghiệm bệnh lý. Các chỉ thị bao gồm ACTA2, VIM, MGP, ZEB2, và ZWINT, mà có thể được phát hiện bằng qRT-PCR hoặc hóa mô miễn dịch. Các chỉ thị này có thể được sử dụng để chọn lọc bệnh nhân cho đơn trị liệu kháng-TGF- β hoặc liệu pháp kết hợp theo sáng chế.

Theo một số phương án, Ab1 và kháng thể liên quan hữu dụng trong việc điều trị bệnh nhân có khối u rắn tiến triển.

Ab1 và kháng thể liên quan cũng có thể được dùng trong việc điều trị rối loạn hoặc bệnh ác tính tạo máu chẳng hạn như đa u tủy xương, hội chứng rối loạn sinh tủy (MDS), u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, và bệnh bạch cầu, cũng như là các ung thư mô liên kết khác nhau chẳng hạn như Ung thư mô liên kết Kaposi.

Ab1 và kháng thể liên quan cũng có thể hữu dụng để ức chế sự tiến triển bệnh ác tính hoặc ung thư qua trung gian cyclosporin (ví dụ, sự di căn).

Tất nhiên là hiểu rõ rằng trong ngữ cảnh của việc trị liệu ung thư, "điều trị" bao gồm sự can thiệp y học bất kỳ dẫn đến việc làm chậm sự phát triển ung thư, làm trễ sự tiến triển hoặc tái phát ung thư, hoặc làm giảm sự di căn ung thư, cũng như là làm thuyên giảm một phần của ung thư để kéo dài tuổi thọ trung bình của bệnh nhân.

C. Liệu Pháp Kết Hợp Trong Ung Thư

Đã quan sát thấy rằng mức độ của sự thâm nhiễm tế bào T gây độc tế bào trong ung thư tương quan với kết quả lâm sàng mong muốn (Fridman et al., Nat Rev Cancer (2012) 12(4):298–306; và Galon et al., Immunity (2013) 39(1):11–26). Ngoài ra, tế bào T trợ giúp

mà giúp đỡ tế bào T gây độc tế bào ($CD4^+$ T_H1) và xytokin chúng sản xuất (ví dụ, $IFN-\gamma$) thường cũng tương quan với kết quả tích cực ở bệnh nhân. Ngược lại, sự có mặt của tế bào Treg đã được chứng minh là tương quan với tiên lượng bệnh nhân kém (Fridman, *nêu trên*).

TGF- β kìm hãm gần như tất cả các khía cạnh của đáp ứng miễn dịch kháng-khối u. Xytokin này thúc đẩy sự biệt hóa iTreg và làm giảm sự tăng sinh và sự thâm nhiễm tế bào gây độc tế bào ($CD8^+$). Sự ức chế của TGF- β bằng Ab1 hoặc kháng thể liên quan sẽ làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch, như được mô tả ở trên, để mang lại kết quả tích cực cho bệnh nhân ung thư.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch, Ab1 và kháng thể liên quan có thể cho phép các chất điều biến điểm kiểm tra, chẳng hạn như kháng thể kháng-PD-1, để gây cảm ứng tốt hơn đối với đáp ứng miễn dịch. Kết quả là, nhiều bệnh nhân hơn có thể hưởng lợi từ liệu pháp miễn dịch chẳng hạn như việc điều trị kháng-PD-1, kháng-PD-L1, hoặc kháng-PD-L2.

Với hoặc không với tác nhân trị liệu nhắm đích phân tử điểm kiểm tra miễn dịch, Ab1 và kháng thể liên quan cũng có thể được dùng kết hợp với các trị liệu ung thư khác chẳng hạn như hóa trị liệu (ví dụ, trị liệu dựa trên platin hoặc taxoid), xạ trị, và các trị liệu mà nhắm đích vào kháng nguyên ung thư hoặc các phân tử có khả năng gây ung thư.

Ung thư mà có thể được điều trị bằng dạng kết hợp gồm có Ab1 hoặc kháng thể liên quan và chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch chẳng hạn như kháng thể kháng-PD-1 bao gồm các bệnh ung thư được liệt kê trong tiểu phần ở trên.

Theo một số phương án, ung thư khó chữa bằng trị liệu kháng-PD-1, kháng-PD-L1, hoặc kháng-PD-L2 trước đây, chẳng hạn như u melanin tiến triển hoặc di căn, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, và u lympho Hodgkin. Bệnh nhân khó chữa là bệnh nhân mà bệnh của họ tiến triển như được xác nhận, ví dụ như, bằng phóng xạ trong vòng 12 tuần từ khi bắt đầu điều trị mà không có bất kỳ bằng chứng nào của sự đáp ứng.

Theo một số phương án, Ab1 hoặc kháng thể liên quan có thể được sử dụng kết hợp với trị liệu ung thư khác chẳng hạn như trị liệu kháng-PD-1 để điều trị ung thư trung mô chẳng hạn như ung thư kết trực tràng, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư bàng quang, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô tế bào gan, và ung thư biểu mô tế bào vảy da. Cũng xem các bản bộc lộ nêu trên.

Các ví dụ về kháng thể kháng-PD-1 là nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, MEDI0608 (trước đây gọi là AMP-514; xem, ví dụ như, WO 2012/145493 và Bằng Sáng Chế Mỹ 9,205,148), PDR001 (xem, ví dụ như, WO 2015/112900), PF-06801591 (xem, ví dụ như, WO 2016/092419) và BGB-A317 (xem, ví dụ như, WO 2015/035606). Theo một số phương án, kháng thể kháng-PD-1 bao gồm các kháng thể kháng-PD-1 được bộc lộ trong WO 2015/112800 (chẳng hạn như các kháng thể kháng-PD-1 được gọi là H1M7789N, H1M7799N, H1M7800N, H2M7780N, H2M7788N, H2M7790N, H2M7791N, H2M7794N, H2M7795N, H2M7796N, H2M7798N, H4H9019P, H4xH9034P2, H4xH9035P2, H4xH9037P2, H4xH9045P2, H4xH9048P2, H4H9057P2, H4H9068P2, H4xH9119P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9135P2, H4xH9145P2, H4xH8992P, H4xH8999P và H4xH9008P trong Bảng 1 của công bố PCT, và các kháng thể kháng-PD-1 được gọi là H4H7798N, H4H7795N2, H4H9008P và H4H9048P2 trong Bảng 3 của công bố PCT). Bản bộc lộ của WO 2015/112800 được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Ví dụ như, kháng thể được bộc lộ trong WO 2015/112800 và kháng thể liên quan, bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên có các trình tự CDR, V_H và V_L, hoặc các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong công bố PCT đó, cũng như là kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với cùng epitop PD-1 như kháng thể được bộc lộ trong công bố PCT đó, có thể được sử dụng kết hợp với Ab1 hoặc kháng thể liên quan theo sáng chế để điều trị ung thư. Theo các phương án liên quan, kháng thể kháng-PD-1 hữu dụng có thể có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây lần lượt dưới dạng các SEQ ID NO:5 và 6; các trình tự V_H và V_L trong các SEQ ID NO:5 và 6 (được thể hiện bằng chữ in nghiêng); hoặc một hoặc nhiều (ví dụ, tất cả sáu) CDR trong các SEQ ID NO:5 và 6 (được thể hiện bằng cách đóng khung).

*EVQLLESGGV LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS**NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG*
*ISGGGRDT**YF* *ADSVKGRFTI* *SRDNSKNTLY* *LQMNSLKGED* *TAVYYC**VKWG*
*NIYFDY**WGQG* *TLVTVSSAST* *KGPSVFPLAP* *CSRSTSESTA* *ALGCLVKDYF*
PEPVTVSWNS *GALTSGVHTF* *PAVLQSSGLY* *SLSSVVTVPS* *SSLGTKTYTC*
NVDHKPSNTK *VDKRVESKYG* *PPCPPCAPE* *FLGGPSVFLF* *PPKPKDTLMI*
SRTPEVTCVV *VDVSQEDPEV* *QFNWYVDGVE* *VHNAKTKPRE* *EQFNSTYRVV*
SVLTVLHQDW *LNGKEYKCKV* *SNKGLPSSIE* *KTISKAKGQP* *REPQVYTLPP*

SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS
FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO:5)

DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWFYQQKP GKAPNLLIYA
ASSLHGGVPS RFSGSGSGTD FTLTIRTLP EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP
GTVVDFRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEN (SEQ ID NO:6)

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế, chẳng hạn như kháng thể kháng-PD-1, không có lysin ở đầu tận cùng C trong chuỗi nặng. Lysin ở đầu tận cùng C có thể được loại bỏ trong quá trình sản xuất hoặc bằng công nghệ tái tổ hợp (*tức là*, trình tự mã hóa của chuỗi nặng không bao gồm bộ ba mã hóa cho lysin ở đầu tận cùng C). Do đó sáng chế cũng dự tính rằng kháng thể có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5 không có lysin ở đầu tận cùng C.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-TGF- β hoặc mảnh theo sáng chế cũng có thể được dùng kết hợp với kháng thể chống lại kháng nguyên điều biến miễn dịch, chẳng hạn như PD-L1 và CTLA-4. Các kháng thể kháng-PD-L1 ví dụ là atezolizumab, avelumab, durvalumab, LY3300054 và BMS-936559. Các kháng thể kháng-CTLA-4 ví dụ là ipilimumab hoặc tremelimumab.

D. Các Chỉ Thị Sinh Học Của Hiệu Quả Điều Trị

Hiệu quả của Ab1 và kháng thể liên quan có thể được xác định bằng các chỉ thị sinh học hoặc sự chiếm giữ đích. Ví dụ như, trong mô khối u, sự chiếm giữ đích có thể được thử nghiệm bằng cách đánh giá hàm lượng của TGF- β hoạt tính trong mẫu sinh thiết bằng cách sử dụng thử nghiệm Meso Scale Discovery (MSD). Trong máu, sự ăn khớp đích có thể được thử nghiệm bằng cách đánh giá tác dụng của TGF- β tuần hoàn giảm đi trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi chẳng hạn như tế bào lympho (tế bào T, tế bào B, tế bào NK) và bạch cầu đơn nhân. Ví dụ như, sự tăng sinh tăng lên của tế bào T CD8⁺ tuần hoàn có thể được đánh giá bằng cách sử dụng CD45⁺RO⁺CCR7⁺CD28⁺ Ki67⁺ làm các chỉ thị trong đếm tế bào theo dòng. Sự hoạt hóa của tế bào NK tuần hoàn có thể được đánh giá bằng cách sử dụng CD3⁺CD56^{high/dim} CD16⁺ hoặc CD137⁺ làm các chỉ thị trong đếm tế bào theo dòng. Ngoài ra, Ki-67, PD-1, và ICOS có thể được sử dụng làm các chỉ thị PD kết hợp với sự hoạt hóa tế bào T.

Sự điều biến miễn dịch khi điều trị bằng Ab1 hoặc kháng thể liên quan có thể được thử nghiệm bằng cách đánh giá sự thay đổi của tế bào miễn dịch thâm nhiễm và các chỉ thị miễn dịch bằng các thử nghiệm hóa mô miễn dịch (IHC) đa thành phần bằng cách sử dụng, ví dụ như, nền tảng NeoGenomics. Cụ thể là, nhuộm màu MultiOmyx TIL Panel của NeoGenomic đối với bảng của các chỉ thị miễn dịch, cho phép xác định định lượng mật độ và sự định vị của các tế bào miễn dịch khác nhau. Các chỉ thị miễn dịch có thể chỉ ra sự biệt hóa của iTreg; sự thâm nhiễm và sự tăng sinh của tế bào T CD8⁺; và sự tạo ra IFN γ bằng tế bào T CD8⁺. Ab1 đã được chứng minh là ức chế sự biệt hóa của tế bào T CD4⁺ thành iTreg (xem, ví dụ như, Ví dụ 3, *dưới đây*), và làm tăng sự tăng sinh của tế bào T CD8⁺ và sự tạo ra IFN γ của chúng (như được thể hiện trong thử nghiệm phản ứng tế bào lympho hỗn hợp; dữ liệu không được thể hiện). Do đó, hiệu quả của việc điều trị bằng Ab1 hoặc kháng thể liên quan có thể được chỉ ra bằng sự ức chế của iTreg, sự cảm ứng của sự tăng sinh tế bào T CD8⁺ và sự thâm nhiễm vào khối u hoặc mô bệnh khác, sự sản xuất IFN γ tăng lên, và/hoặc tỉ lệ tăng lên của tế bào T CD8⁺ với tế bào Treg. Sự điều biến miễn dịch khi điều trị bằng Ab1 hoặc kháng thể liên quan cũng có thể được thử nghiệm trong máu ngoại vi bằng cách đếm tế bào miễn dịch định lượng dựa trên PCR methyl hóa của tế bào T CD8⁺, tế bào Treg, tế bào NK, và các tế bào miễn dịch khác. Hiệu quả điều trị có thể biểu thị về mặt lâm sàng dưới dạng sự trễ hoặc sự đảo ngược trong sự tiến triển bệnh chẳng hạn như sự tiến triển khối u.

II. Phương Pháp Tạo Ra Kháng Thể

Ab1 và kháng thể liên quan, cũng như là kháng thể nhắm đích các đồng mục tiêu khác chẳng hạn như PD-1, PD-L1 hoặc PD-L2, có thể được tạo ra bằng phương pháp đã được thiết lập rõ trong lĩnh vực. Các trình tự ADN mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được cài xen vào vật truyền biểu hiện sao cho các gen được liên kết có điều khiển với các trình tự điều khiển biểu hiện cần thiết chẳng hạn như các trình tự điều khiển phiên mã và dịch mã. Vật truyền biểu hiện bao gồm plasmit, retrovirus, adenovirus, virus kết hợp adeno (AAV), virus thực vật chẳng hạn như virus khảm súp lơ, virus khảm thuốc lá, cosmit, YAC, episom có nguồn gốc từ EBV, và dạng tương tự. Trình tự mã hóa cho chuỗi nhẹ kháng thể và trình tự mã hóa cho chuỗi nặng kháng thể có thể được cài xen vào các vật truyền riêng rẽ, và có thể được liên kết có điều khiển với các trình tự điều khiển biểu hiện (ví dụ, vùng khởi động) giống nhau hoặc khác nhau. Theo một phương án, cả hai trình tự mã hóa được cài xen vào cùng vật truyền biểu hiện và có thể được liên kết có điều khiển với cùng trình tự điều

khởi động (ví dụ, vùng khởi động thông dụng), với các trình tự điều khiển biểu hiện (ví dụ, vùng khởi động) giống nhau riêng rẽ, hoặc với các trình tự điều khiển biểu hiện (ví dụ, vùng khởi động) khác nhau. Các trình tự mã hóa cho kháng thể có thể được cài xen vào vật truyền biểu hiện bằng phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, nối các vị trí giới hạn bổ sung trên mảnh gen kháng thể và vật truyền, hoặc nối đầu cụt nếu không có các vị trí giới hạn).

Ngoài các gen chuỗi kháng thể, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp có thể mang các trình tự điều hòa mà điều khiển sự biểu hiện của các gen chuỗi kháng thể trong tế bào chủ. Các ví dụ về các trình tự điều hòa để biểu hiện ở tế bào chủ động vật có vú bao gồm các yếu tố virus mà dẫn đến mức độ biểu hiện protein cao trong tế bào động vật có vú, chẳng hạn như vùng khởi động và/hoặc vùng tăng cường có nguồn gốc từ LTRretrovirus, cytomegalovirus (CMV) (chẳng hạn như vùng khởi động/vùng tăng cường CMV), Virus Khi 40 (SV40) (chẳng hạn như vùng khởi động/vùng tăng cường SV40), adenovirus, (ví dụ, vùng khởi động muộn chính adenovirus (AdMLP)), vùng khởi động polyoma và động vật có vú mạnh chẳng hạn như globulin miễn dịch âm tính và vùng khởi động actin.

Ngoài các gen chuỗi kháng thể và trình tự điều hòa, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang các trình tự khác, chẳng hạn như các trình tự mà điều hòa sự sao chép của vật truyền ở tế bào chủ (ví dụ, điểm mở đầu sao chép) và các gen đánh dấu có tính chọn lọc. Ví dụ, gen đánh dấu có tính chọn lọc mang tính kháng đối với thuốc, chẳng hạn như G418, hygromycin hoặc methotrexat, trên tế bào chủ mà vật truyền đã được đưa vào. Gen đánh dấu có tính chọn lọc có thể bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) (để sử dụng trong tế bào chủ dhfr với sự chọn lọc/sự khuếch đại methotrexat), gen neo (để chọn lọc G418), và gen glutamat synthetaza.

Vật truyền biểu hiện mã hóa cho kháng thể theo sáng chế được đưa vào tế bào chủ để biểu hiện. Tế bào chủ được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, mà sau đó được thu hoạch và được phân lập. Tế bào chủ bao gồm tế bào chủ động vật có vú, thực vật, vi khuẩn hoặc nấm men. Dòng tế bào động vật có vú có sẵn để làm vật chủ để biểu hiện đã được biết rõ trong lĩnh vực và bao gồm nhiều dòng tế bào bất tử của Bảo Tàng Giống Chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC). Chúng bao gồm, *không kể những cái khác*, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào NS0, tế bào SP2, tế bào HEK-293T, tế bào 293 Freestyle (Invitrogen), tế bào NIH-3T3, tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng con (BHK), tế bào thận khỉ xanh Châu Phi (COS), tế bào ung thư biểu mô tế bào gan

người (ví dụ, Hep G2), tế bào A549, và nhiều dòng tế bào khác. Các dòng tế bào có thể được chọn dựa trên mức độ biểu hiện của chúng. Các dòng tế bào khác mà có thể được sử dụng là dòng tế bào côn trùng, chẳng hạn như tế bào Sf9 hoặc Sf21.

Ngoài ra, sự biểu hiện của kháng thể có thể được tăng cường bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết. Ví dụ như, hệ thống biểu hiện gen glutamin synthetaza (hệ thống GS) là phương pháp phổ biến để tăng cường sự biểu hiện trong điều kiện nhất định.

Môi trường nuôi cấy mô đối với tế bào chủ có thể bao gồm, hoặc không chứa, thành phần có nguồn gốc động vật (ADC), chẳng hạn như albumin huyết thanh bò. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy không chứa ADC được ưu tiên vì sự an toàn đối với người. Nuôi cấy mô có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng, phương pháp truyền liên tục, hoặc phương pháp khác bất kỳ thích hợp đối với tế bào chủ và có hiệu suất mong muốn.

III. Dược Phẩm

Kháng thể theo sáng chế có thể được tạo chế phẩm để có độ ổn định lưu trữ thích hợp. Ví dụ như, kháng thể có thể được làm đông khô hoặc được lưu trữ hoặc được hoàn nguyên để sử dụng bằng cách sử dụng tá dược được dụng. Đối với liệu pháp kết hợp, hai hoặc hơn hai tác nhân trị liệu chẳng hạn như kháng thể có thể được đồng tạo chế phẩm, ví dụ như, được trộn và được cung cấp trong hợp phần đơn lẻ.

Thuật ngữ "tá dược" hoặc "chất mang" được dùng trong bản mô tả này để mô tả thành phần bất kỳ không phải là (các) hợp chất theo sáng chế. Việc lựa chọn (các) tá dược phụ thuộc ở mức độ lớn vào các yếu tố chẳng hạn như phương thức dùng cụ thể, ảnh hưởng của tá dược lên độ hòa tan và độ ổn định, và bản chất của dạng liều lượng. "Tá dược được dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Một số ví dụ về tá dược được dụng là nước, nước muối, nước muối đậm photphat, dextroza, glyxerol, etanol và các chất tương tự, cũng như dạng kết hợp của chúng. Trong một số trường hợp, chất đẳng trương, ví dụ như đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua được bao gồm trong dược phẩm. Các ví dụ khác về chất được dụng là chất làm ướt hoặc lượng nhỏ của các chất phụ trợ như chất làm ướt hoặc chất nhũ hoá, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà làm tăng thời hạn sử dụng hoặc hiệu quả của kháng thể.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được điều chế, được đóng gói, hoặc được bán theo khối, dưới dạng liều đơn vị đơn lẻ, hoặc dưới dạng nhiều liều đơn vị đơn lẻ. Như dùng trong bản mô tả này, "liều đơn vị" là lượng rời rạc của dược phẩm có chứa lượng định trước của thành phần hoạt tính. Lượng của thành phần hoạt tính thường bằng liều lượng của thành phần hoạt tính mà sẽ được dùng cho đối tượng hoặc tỉ lệ thuận tiện của liều lượng này chẳng hạn như, ví dụ như, một nửa hoặc một phần ba của liều lượng này.

Dược phẩm theo sáng chế thường thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa. Như dùng trong bản mô tả này, việc "dùng ngoài đường tiêu hóa" của dược phẩm bao gồm đường dùng bất kỳ đặc trưng bởi sự đến được mô về mặt vật lý của đối tượng và việc dùng dược phẩm thông qua sự đến được mô, do đó thường dẫn đến việc dùng trực tiếp vào dòng máu, vào cơ, hoặc vào cơ quan bên trong. Do đó việc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc dùng dược phẩm bằng cách tiêm hợp phần, bằng cách dùng hợp phần thông qua vết rạch phẫu thuật, bằng cách dùng hợp phần thông qua vết thương không phải bằng phẫu thuật xuyên vào mô, và dạng tương tự. Cụ thể là, việc dùng ngoài đường tiêu hóa được dự tính là bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm hoặc truyền dưới da, trong màng bụng, trong cơ, trong xương ức, trong tĩnh mạch, trong động mạch, nội tủy mạch, trong tâm thất, trong niệu đạo, trong sọ, trong khối u, và trong bao hoạt dịch; và các kỹ thuật truyền thẩm tách thận. Việc truyền khu vực cũng được dự tính. Các phương án được ưu tiên có thể bao gồm các đường trong tĩnh mạch và dưới da.

Chế phẩm của dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa thường có chứa thành phần hoạt tính được kết hợp với chất mang dược dụng, chẳng hạn như nước tiệt trùng hoặc nước muối đẳng trương tiệt trùng. Chế phẩm này có thể được điều chế, được đóng gói, hoặc được bán ở dạng thích hợp để dùng dạng bolus hoặc để dùng liên tục. Chế phẩm tiêm có thể được điều chế, được đóng gói, hoặc được bán ở dạng liều đơn vị, chẳng hạn như trong ampun hoặc trong vật chứa đa liều chứa chất bảo quản. Chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, huyền phù, dung dịch, nhũ tương trong tá dược lỏng trong dầu hoặc trong nước, bột nhão, và dạng tương tự. Chế phẩm này có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất tạo huyền phù, chất làm ổn định, hoặc chất làm phân tán. Theo một phương án của chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa, thành phần hoạt tính được cung cấp ở dạng khô (tức là, bột hoặc hạt) để hoàn nguyên bằng tá dược lỏng thích hợp (ví dụ, nước không chứa chất gây sốt tiệt trùng) trước khi dùng

ngoài đường tiêu hóa hợp phần được hoàn nguyên. Chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa cũng bao gồm dung dịch trong nước mà có thể chứa tá dược chẳng hạn như muối, carbohydrat và chất đệm (ví dụ, có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9), nhưng, đối với một số ứng dụng, chúng có thể thích hợp hơn khi được tạo chế phẩm dưới dạng dung dịch không trong nước tiệt trùng hoặc dưới dạng được làm khô để được sử dụng kết hợp với tá dược lỏng thích hợp chẳng hạn như nước không chứa chất gây sốt, tiệt trùng. Các dạng để dùng ngoài đường tiêu hóa ví dụ bao gồm dung dịch hoặc huyền phù trong dung dịch trong nước tiệt trùng, ví dụ như, dung dịch propylen glycol hoặc dextroza trong nước. Các dạng liều lượng này có thể được đệm thích hợp, nếu muốn. Chế phẩm có thể dùng ngoài đường tiêu hóa khác mà hữu dụng bao gồm các chế phẩm mà có chứa thành phần hoạt tính ở dạng vi tinh thể, hoặc trong chế phẩm liposom. Chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được tạo chế phẩm để giải phóng tức thì và/hoặc thay đổi. Chế phẩm giải phóng thay đổi bao gồm sự giải phóng trễ, duy trì, theo xung, có kiểm soát, nhắm đích, và theo chương trình.

IV. Các Phương Án Ví Dụ

Các phương án cụ thể hơn của sáng chế được mô tả dưới đây.

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập mà liên kết đặc hiệu với TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3 người, có chứa các vùng xác định tính bổ sung chuỗi nặng (CDR) 1-3 trong SEQ ID NO:1 và CDR1-3 chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO:2, trong đó kháng thể này có chứa vùng không đổi IgG4 người có prolin ở vị trí 228 (đánh số EU).
2. Kháng thể theo phương án 1, trong đó kháng thể này có chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) tương ứng với các gốc 1-120 của SEQ ID NO:1 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) tương ứng với các gốc 1-108 của SEQ ID NO:2.
3. Kháng thể theo phương án 2, trong đó kháng thể này có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:1 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:2.
4. Mạch liên kết kháng nguyên của kháng thể theo phương án 3, trong đó mạch này là F(ab')₂.
5. Kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh này có thời gian bán thải tăng hoặc sự bộc lộ tăng khi so với fresolimumab.

6. Kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh có một hoặc nhiều tính chất sau đây:

- a) ức chế sự biệt hóa của tế bào T CD4⁺ thành tế bào T điều hòa cảm ứng (iTreg);
- b) làm tăng sự tăng sinh tế bào T CD8⁺;
- c) làm tăng sự kết cụm của tế bào giết tự nhiên (NK);
- d) làm tăng hàm lượng của MIP-2; và
- e) làm tăng hàm lượng của KC/GRO.

7. Hợp phần có chứa kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó hợp phần này có chứa nhỏ hơn 1% kháng thể nửa.

8. Kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6 để làm thuốc.

9. Phương pháp ức chế sự truyền tín hiệu TGF- β ở bệnh nhân cần chúng, có chứa bước cho bệnh nhân dùng lượng có tác dụng điều trị của kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6.

10. Phương pháp theo phương án 9, trong đó bệnh nhân mắc bệnh ung thư.

11. Phương pháp theo phương án 10, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có u melanin, ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào vảy da, ung thư kết trực tràng, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư đường tiết niệu, và ung thư biểu mô tế bào thận.

12. Phương pháp theo phương án 10 hoặc 11, trong đó bệnh ung thư đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều chất trong số ACTA2, VIM, MGP, và ZWINT.

13. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 10 đến 12, trong đó bệnh ung thư là khối u trung mô.

14. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 10 đến 13, trong đó kháng thể hoặc mảnh làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch.

15. Phương pháp điều trị ung thư ở bệnh nhân, có chứa bước cho bệnh nhân dùng (1) kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, và (2) chất ức chế của protein điểm kiểm tra miễn dịch.

16. Phương pháp theo phương án 15, trong đó protein điểm kiểm tra miễn dịch là PD-1, PD-L1, hoặc PD-L2.

17. Phương pháp theo phương án 16, trong đó chất ức chế của protein điểm kiểm tra miễn dịch là kháng thể kháng-PD-1.

18. Phương pháp theo phương án 17, trong đó kháng thể kháng-PD-1 có chứa CDR1-3 chuỗi nặng trong SEQ ID NO:5 và CDR1-3 chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO:6.

19. Phương pháp theo phương án 17, trong đó kháng thể kháng-PD-1 có chứa trình tự axit amin V_H tương ứng với các gốc 1-117 của SEQ ID NO:5 và trình tự axit amin V_L tương ứng với các gốc 1-107 của SEQ ID NO:6.

20. Phương pháp theo phương án 17, trong đó kháng thể kháng-PD-1 có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:5 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:6.

21. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 20, trong đó kháng thể kháng-TGF- β có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:1 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:2.

22. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 21, trong đó bệnh ung thư khó chữa bằng cách điều trị bằng kháng thể kháng-PD-1.

23. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 22, trong đó bệnh ung thư là u melanin tiến triển hoặc di căn, hoặc ung thư biểu mô tế bào vảy da.

24. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 23, trong đó bệnh ung thư là kiểu phụ trung mô của khối u rắn.

25. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 24, trong đó bệnh ung thư đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều chất trong số ACTA2, VIM, MGP, và ZWINT.

26. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 25, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có u melanin, ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào vảy da, ung thư kết trực tràng, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư đường tiết niệu, và ung thư biểu mô tế bào thận.

27. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 26, trong đó kháng thể hoặc mảnh làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch.

28. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 27, trong đó kháng thể kháng-TGF- β và kháng thể kháng-PD-1 được dùng vào cùng ngày cho bệnh nhân.

29. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 28, trong đó kháng thể kháng-TGF- β và kháng thể kháng-PD-1 được dùng hai tuần một lần cho bệnh nhân.

30. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 29, trong đó kháng thể kháng-TGF- β và kháng thể kháng-PD-1 được dùng lần lượt ở liều lượng bằng 0,05-20 mg/kg khối lượng cơ thể.

31. Phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân cần chúng, có chứa bước cho bệnh nhân dùng chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch và kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6.

32. Phương pháp theo phương án 31, trong đó chất ức chế điểm kiểm tra là kháng thể kháng-PD-1.

33. Phương pháp theo phương án 32, trong đó kháng thể kháng-PD-1 có chứa:

- a) HCDR1-3 trong SEQ ID NO:5 và LCDR1-3 trong SEQ ID NO:6;
- b) V_H và V_L lần lượt tương ứng với các gốc 1-117 trong SEQ ID NO:5 và các gốc 1-107 trong SEQ ID NO:6; hoặc
- c) chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

34. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 33, trong đó kháng thể kháng-TGF- β có chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:1 (có hoặc không có lysin ở đầu tận cùng C) và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:2.

35. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 34, trong đó bệnh nhân mắc bệnh ung thư.

36. Phương pháp theo phương án 35, trong đó bệnh nhân khó chữa bằng cách điều trị trước đây bằng chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch, và/hoặc có kiểu phụ trung mô của khối u rắn.

37. Phương pháp theo phương án 35 hoặc 36, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có u melanin, ung thư phổi, ung thư biểu mô tế bào vảy da, ung thư kết trực tràng,

ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư đầu và cổ, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư đường tiết niệu, và ung thư biểu mô tế bào thận.

38. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 35 đến 37, trong đó bệnh ung thư đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức của một hoặc nhiều chất trong số ACTA2, VIM, MGP, và ZWINT.

39. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 35 đến 38, trong đó kháng thể hoặc mảnh làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch.

40. Kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6 để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhân trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên.

41. Sử dụng kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6 để sản xuất thuốc để điều trị cho bệnh nhân trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên.

42. Phân tử axit nucleic được phân lập, có chứa trình tự nucleotit mã hóa cho chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, hoặc cả hai, của kháng thể hoặc mảnh theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6.

43. Vật truyền biểu hiện có chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo phương án 42.

44. Tế bào chủ có chứa vật truyền biểu hiện theo phương án 43.

45. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, phương pháp này có chứa bước:

cung cấp tế bào chủ có chứa các trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai lần lượt mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên,

nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện cho phép sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, và

thu hồi kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên.

46. Phương pháp sản xuất dược phẩm, có chứa bước:

cung cấp kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, và

trộn lẫn kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên với tá dược dược dụng.

47. Vật phẩm sản xuất hoặc bộ kit có chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6 và tác nhân trị liệu khác.

48. Vật phẩm sản xuất hoặc bộ kit theo phương án 47, trong đó tác nhân trị liệu khác là chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm trong các ví dụ sau đây, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế mà được mô tả trong yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Để hiểu rõ hơn về sáng chế, các ví dụ sau đây được đưa ra. Các ví dụ này chỉ để minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Tính Chất Liên Kết TGF- β của Ab1

Ái lực của Ab1 đối với tất cả các đồng phân TGF- β người và chuột nhất được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt trên thiết bị Biacore T200 Biosensor (GE Healthcare) bằng cách sử dụng chip loạt S được carboxy-metyl hóa (CM5) được phủ dextran. Ab1 ở dãy nồng độ (1, 11, 33, 10, và 30 nM) được phun lên TGF- β tái tổ hợp đã được cố định để đo sự tương tác liên kết trong thời gian thực. Homodimer TGF- β được cố định ở mật độ thấp để làm giảm hiệu quả ái lực. Thực hiện việc phun trong ba bản sao và lặp lại thử nghiệm liên kết ba lần. Xử lý dữ liệu từ các thí nghiệm động học bằng cách sử dụng phần mềm Biacore T200 BIAevaluation v2.0. Các biểu đồ cảm biến thu được được đưa về điểm không, được sắp xếp thẳng hàng, được tham chiếu kép, và được cắt cho phân tích làm khớp đường cong bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1 để xác định hằng số tốc độ kết hợp (k_a), hằng số tốc độ phân ly (k_d), và hằng số phân ly cân bằng (K_D).

Protein tái tổ hợp được sản xuất nội bộ (TGF- β 1, 2 và 3 người) hoặc thu được từ R&D Systems (TGF- β 1 và 2 ở chuột nhất). Bảng 1 dưới đây thể hiện độ tương đồng trình tự axit amin của ba đồng phân TGF- β hoạt tính giữa khỉ rhesus, chuột nhất, hoặc chuột cống và người (độ tương đồng được báo cáo dưới dạng phần trăm của các axit amin được bảo toàn trong tổng số axit amin).

Bảng 1 Độ Tương Đồng Của Các Đồng Phân Hoạt Tính TGF- β Với Người

Phần Trăm Độ Tương Đồng			
	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Khí Rh.	100% (112/112)	100% (112/112)	100% (112/112)
Chuột nhất	99,1% (111/112)*	97% (109/112)*	100% (112/112)
Chuột công	99,1% (111/112)*	97% (109/112)*	99,1% (111/112)

*TGF β 1 chuột công và chuột nhất tương đồng 100% với nhau, và TGF β 2 chuột công và chuột nhất tương đồng 100% với nhau

Vì TGF- β 3 người và TGF- β 3 chuột nhất giống nhau ở trình tự axit amin, các số đo ái lực riêng rẽ không được tính đối với hai protein này. Tương tự, TGF- β 1 và 2 chuột nhất và chuột công giống nhau ở trình tự axit amin và các số đo ái lực riêng rẽ cũng không được tính.

Các giá trị k_a , k_d , và K_D của Ab1 như xác định bằng phương pháp nêu trên được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Các giá trị K_D của Ab1 đối với TGF- β 1, 2, và 3 người được xác định lần lượt là 1,48, 3,00, và 1,65 nM. Các giá trị K_D của Ab1 đối với TGF- β 1 và 2 chuột nhất/chuột công được xác định lần lượt là 2,80 và 1,88 nM. Các tính chất liên kết này tương tự với các tính chất liên kết của fresolimumab.

Bảng 2 Hằng Số Cân Bằng Và Ái Lực Của Ab1 Đối Với TGF- β

	Người		Chuột nhất và Chuột công		Người và Chuột nhất
	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
k_a ($\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$3,11 \pm 0,3$	$2,86 \pm 0,3$	$2,98 \pm 0,07$	$3,48 \pm 0,24$	$2,23 \pm 0,6$
k_d ($\times 10^{-4} \text{s}^{-1}$)	$3,43 \pm 2,9$	$8,23 \pm 5,0$	$8,35 \pm 0,38$	$6,45 \pm 1,44$	$3,72 \pm 2,3$
K_D (nM)	$1,48 \pm 1,1$	$3,00 \pm 2,0$	$2,80 \pm 0,08$	$1,88 \pm 0,56$	$1,65 \pm 1,1$

Dữ liệu nêu trên chứng tỏ rằng Ab1 là chất ức chế pan-TGF- β hiệu nghiệm và chọn lọc. Các phép đo sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt chứng tỏ rằng Ab1 có ái lực nằm trong khoảng từ 1 đến 5 nM đối với tất cả các đồng phân TGF- β người và chuột nhất. Mức độ đặc

hiệu cao được xác nhận bằng nghiên cứu khả năng phản ứng chéo mô hóa mô miễn dịch (IHC) GLP bằng cách sử dụng mô chuột cống, khỉ cynomolgus và người bình thường.

Ví dụ 2: Hiệu Lực Trung Hòa TGF- β -Của Ab1

Hiệu lực *in vitro* của Ab1 trong việc trung hòa TGF- β hoạt tính được đo trong thử nghiệm dựa trên tế bào. Thử nghiệm này đo được khả năng của TGF- β để ức chế sự tăng sinh của tế bào biểu mô phổi chồn vizon (tế bào Mv 1 Lu) không được biến nạp. Xem, ví dụ như, WO 2006/086469 và Mazzieri, et al., Eds, "Methods in Molecular Biology," Vol. 142, "Transforming Growth Factor- β Protocols." Khả năng của Ab1, fresolimumab, và 1D11 (kháng thể kháng-TGF- β chuột nhắt, mà các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của nó được bộc lộ trong bản mô tả này dưới dạng các SEQ ID NO:9 và 10) để làm trung hòa TGF- β 1, 2, 3 ở người và TGF- β 1 và 2 chuột nhắt được đánh giá. Protein TGF- β tái tổ hợp được sản xuất nội bộ (TGF- β 1, 2 và 3 người) hoặc thu được từ R&D Systems (TGF- β 1 và 2 chuột nhắt).

Tất cả các đồng phân TGF- β người và chuột nhắt ức chế sự tăng sinh của tế bào phổi chồn vizon theo phương thức phụ thuộc liều lượng trong khoảng từ 0,02 pg/ml đến 10 ng/ml. Để định lượng hiệu lực của Ab1, fresolimumab, và 1D11, 1 ng/ml của TGF- β được chỉ ra và kháng thể đã được pha loãng theo dãy được ủ với tế bào phổi chồn vizon. Sau ba ngày ủ, sự tăng sinh của tế bào được định lượng bằng thuốc nhuộm CyQUANT mà phát huỳnh quang khi liên kết với ADN (các HÌNH 1A-E). Dữ liệu cho thấy rằng Ab1, fresolimumab, và 1D11 thay thế ở chuột nhắt của chúng ức chế tất cả các đồng phân TGF- β người và chuột nhắt đến mức độ tương tự.

Ví dụ 3: Sự Ức Chế Của Sự Biệt Hóa Tế Bào Điều Hòa T Cảm Ứng Bằng Ab1

Tế bào T điều hòa (Treg) kìm hãm miễn dịch và tương quan với kết quả âm tính ở bệnh nhân ung thư. Trong nghiên cứu được mô tả dưới đây, chúng tôi nghiên cứu liệu Ab1 có ức chế sự biệt hóa được cảm ứng bởi TGF- β của tế bào T CD4⁺ người thành tế bào T điều hòa cảm ứng (iTreg) hay không. Tế bào T CD4⁺ người sơ cấp được phân lập từ người cho bình thường khỏe mạnh. TGF- β 1 người được mua từ R&D Systems.

Để nghiên cứu hoạt tính đối kháng của Ab1 đối với TGF- β được tạo ra nội sinh bởi tế bào được nuôi cấy, tổng số tế bào T CD4⁺ mà không có TGF- β ngoại sinh bổ sung được xử lý bằng 50 μ g/ml đối chứng isotyp (IgG4 ở người, kháng thể kháng-lysozym trứng gà (HEL) kappa, Crown Bioscience), Ab1 hoặc fresolimumab trong sự có mặt hoặc không có mặt của sự kích thích (kháng-CD3, kháng-CD28, và IL-2) trong thời gian 6 ngày sau đó là phân tích đếm

tế bào theo dòng. Phần trăm trung bình và độ lệch chuẩn của quần thể CD25⁺FOXP3⁺ được tính từ quần thể ban đầu (tế bào lympho/sống/tế bào đơn lẻ/CD4⁺CD127⁻) trong ba bản sao. Sự kích thích của toàn bộ tế bào T CD4⁺ người bằng kháng-CD3, kháng-CD28, và IL-2 làm tăng tỉ lệ phần trăm của FOXP3⁺CD25⁺ (iTreg) trong môi trường nuôi cấy từ 0% lên 15%. Việc xử lý bằng 50 µg/ml Ab1 hoặc 50 µg/ml fresolimumab làm giảm tỉ lệ phần trăm của iTreg đến mức độ tương tự (lần lượt là 8% và 7%; HÌNH 2). Ngược lại, việc xử lý bằng đối chứng isotyp IgG₄ người (hIgG₄) có tác dụng nhỏ nhất lên sự biệt hóa iTreg (20% iTreg) (HÌNH 2). Tế bào T CD4⁺ được phân lập từ tình nguyện viên bình thường khỏe mạnh thứ hai cho kết quả tương tự.

Để nghiên cứu hoạt tính đối kháng của Ab1 đối với TGF-β ngoại sinh, toàn bộ tế bào T CD4⁺ ủ với 2 ng/ml TGF-β1 người được xử lý bằng đối chứng isotyp, Ab1, hoặc fresolimumab ở các nồng độ kháng thể khác nhau trong sự có mặt hoặc không có mặt của sự kích thích (kháng-CD3, kháng-CD28, và IL-2) trong thời gian 6 ngày sau đó là phân tích đếm tế bào theo dòng. Phần trăm trung bình và độ lệch chuẩn của quần thể CD25⁺FOXP3⁺ được tính từ quần thể ban đầu (tế bào lympho/sống/tế bào đơn lẻ/CD4⁺CD127⁻) trong ba bản sao trừ khi được lưu ý. Việc bổ sung TGF-β1 ngoại sinh (2 ng/ml) vào toàn bộ tế bào T CD4⁺ người đã được kích thích làm tăng tỉ lệ phần trăm của iTreg trong môi trường nuôi cấy từ 15% lên 55%. Việc xử lý bằng nồng độ tăng lên của Ab1 làm giảm tỉ lệ phần trăm của iTreg theo phương thức đồng thời từ 55% xuống 15% ở 200 µg/ml và 43% ở 6,25 µg/ml. Việc xử lý bằng fresolimumab làm giảm tỉ lệ phần trăm của iTreg đến mức độ tương tự như Ab1 (từ 55% xuống 16% ở 200 µg/ml và 32% ở 6,25 µg/ml). Việc xử lý bằng nồng độ thay đổi của kháng thể đối chứng isotyp không ảnh hưởng đến tỉ lệ phần trăm của iTreg với 60% ở 200 µg/ml và 6,25 µg/ml. Xem HÌNH 3. Tế bào T CD4⁺ được phân lập từ tình nguyện viên bình thường khỏe mạnh thứ hai cho kết quả tương tự.

Nghiên cứu này chứng tỏ rằng Ab1 ức chế sự biệt hóa iTreg được cảm ứng bởi TGF-β và do đó có thể mang lại lợi ích lâm sàng bằng cách làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch.

Ví dụ 4: Tác Dụng Của Dạng Kết Hợp Ab1 Và Kháng Thể Kháng-PD-1 In Vitro

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu liệu TGF-β có ngăn ngừa sự kích thích tối đa của tế bào T *in vitro* sau khi xử lý kháng-PD-1 hay không, và nếu vậy, liệu Ab1 có chống lại sự ngăn ngừa này hay không. Sự biểu hiện luxiferaza từ cấu trúc biểu hiện dưới sự

kiểm soát phiên mã của các trình tự điều hòa NFATc (yếu tố nhân của tế bào T đã được hoạt hóa, tế bào chất 1) được sử dụng để đo mức độ hoạt hóa tế bào T.

Chúng tôi sử dụng hệ thống thử nghiệm tế bào mua của hãng Promega cho nghiên cứu này. Hệ thống này có chứa hai loại tế bào: 1) tế bào T Jurkat biểu hiện PD-1 ở người và tế bào báo cáo luxiferaza được điều khiển bằng yếu tố đáp ứng NFAT, và 2) tế bào CHO-K1 biểu hiện PD-L1 ở người và protein bề mặt tế bào đã được thiết kế được thiết kế để hoạt hóa thụ thể tế bào T cùng nguồn theo phương thức không phụ thuộc kháng nguyên. Khi đồng nuôi cấy tế bào T Jurkat tương tác với tế bào CHO-K1, gây ra sự kích thích thụ thể tế bào T và sự chuyển vị NFATc vào trong nhân trong đó nó gây ra sự biểu hiện luxiferaza. Tuy nhiên, sự ăn khớp của PD-1/PD-L1 tuyển mộ không phải thụ thể tyrosin-protein phosphatase 11 (SHP2) cho phức hợp thụ thể tế bào T, ức chế sự chuyển vị nhân NFATc và sự biểu hiện luxiferaza sau đó. Sự phong bế của sự truyền tín hiệu PD-1 làm giảm bớt sự kìm hãm phụ thuộc SHP2 và do đó cho phép sự biểu hiện luxiferaza tối đa. Do đó hệ thống này cung cấp phương pháp chức năng để xác định tác dụng của TGF- β lên sự truyền tín hiệu tế bào T và ảnh hưởng của Ab1 lên việc xử lý kháng-PD-1 của tế bào T.

Do động học chậm kết hợp với tác dụng phụ thuộc TGF- β , tế bào T Jurkat được xử lý sơ bộ bằng TGF- β trước khi kích thích thụ thể tế bào T. TGF- β 1 người được mua từ R&D Systems. Kháng thể đối chứng isotyp đối với Ab1 (hIgG₄ kháng-HEL) được mua từ Crown Bioscience (Cat#C0004-5). IgG kháng-hPD-1 chuột nhắt và kháng thể đối chứng isotyp của nó được mua của hãng BioLegend (Cat#329912). Mười bốn bản sao được phân tích đối với mỗi mẫu.

Kết quả cho thấy rằng việc bổ sung của kháng thể kháng-hPD-1 vào tế bào T Jurkat được đồng nuôi cấy với tế bào CHO-K1 trong thời gian 24 giờ gây cảm ứng hoạt tính luxiferaza (865794 đơn vị phát quang tương đối [RLU]) đến mức độ lớn hơn so với việc bổ sung đối chứng isotyp (234963 RLU, số lần thay đổi = 3,685, giá trị $p < 0,0001$) hoặc chỉ khi không có mặt kháng thể (206043 RLU, số lần thay đổi = 4,202, giá trị $p < 0,0001$). Việc xử lý sơ bộ của tế bào T Jurkat bằng 18 ng/ml TGF- β 1 trong thời gian 12 ngày gây cảm ứng hoạt tính luxiferaza nhỏ hơn (638866 RLU) trong tế bào CHO-K1 đồng nuôi cấy trong sự có mặt của kháng thể kháng-hPD-1, khi so với tế bào T Jurkat không được xử lý bằng TGF- β 1 (865794 RLU, số lần thay đổi = -1,355, giá trị $p < 0,0001$) (HÌNH 4).

Để đánh giá hiệu lực đối kháng của Ab1, tế bào T Jurkat được xử lý sơ bộ bằng 18 ng/ml TGF- β 1 trong sự có mặt của Ab1, đối chứng isotyp Ab, hoặc không có Ab trong thời gian 12 ngày và sau đó được đồng nuôi cấy với tế bào CHO-K1 trong sự có mặt của kháng-PD-1 trong thời gian 24 giờ. Sự có mặt của Ab1 (924186 RLU) làm giảm bớt sự kìm hãm phụ thuộc TGF- β của hoạt tính luxiferaza khi so với Ab đối chứng isotyp (639440 RLU, số lần thay đổi=1,445, giá trị $p<0,0001$) và đối chứng không có Ab (638866 RLU, số lần thay đổi=1,447, giá trị $p<0,0001$). Nhóm đối chứng với Ab1 (975654 RLU) hoặc đối chứng isotyp (955717 RLU) được bổ sung vào tế bào T Jurkat không được xử lý sơ bộ bằng TGF- β 1 và được đồng nuôi cấy với tế bào CHO-K1 đồng nuôi cấy trong sự có mặt của Ab kháng-PD-1 đã làm tăng có ý nghĩa thống kê hoạt tính luxiferaza so với đối chứng không có Ab, nhưng có số lần thay đổi nhỏ nhất (865794 RLU, lần lượt số lần thay đổi=1,127 và 1,104, giá trị $p=0,0023$ và 0,001284) (HÌNH 4). Giá trị RLU cũng được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3 Đơn Vị Phát Quang Tương Đối Trong Thử Nghiệm Hoạt Hóa Tế Bào T

	Ab Kháng-PD-1		Đối Chứng Isotyp	Tá dược lỏng
	Không xử lý sơ bộ TGF- β 1	Xử lý sơ bộ TGF- β 1	Ab Kháng-PD-1	(PBS)
Không Ab1	865794	638866	234963	206043
Ab1	975654	924186	-	-
hIgG4 kháng-HEL	955717	639440	-	-

Để loại trừ khả năng mà việc xử lý sơ bộ TGF- β 1 của tế bào T Jurkat có thể dẫn đến sự tăng sinh hoặc khả năng sống sót giảm đi và do vậy dẫn đến hoạt tính luxiferaza giảm đi trong thời gian 24 giờ đồng nuôi cấy với tế bào CHO-K1, chúng tôi ủ tế bào T Jurkat với 18 ng/ml TGF- β 1 hoặc PBS trong sự có mặt của Ab1, hIgG4 kháng-HEL, hoặc không có kháng thể (tá dược lỏng) trong thời gian 7 ngày. Cứ từ 2 đến 3 ngày thể tích bằng nhau của mỗi nhóm được sử dụng để cấy bình thót cổ mới vào lúc đó cả TGF- β 1 và kháng thể đều được làm mới (tổng cộng hai sự kiện cấy lại diễn ra). Việc đánh giá môi trường nuôi cấy cuối cùng chứng minh rằng khả năng sống sót của tất cả các nhóm điều trị đều không đổi (nằm trong khoảng từ 94% đến 96%). Ngoài ra, tổng số tế bào T Jurkat trong môi trường nuôi cấy cuối cùng của mỗi nhóm điều trị rất tương tự nhau (nằm trong khoảng từ 25 đến 29 triệu).

Nghiên cứu trên chứng tỏ rằng sự tăng lên trong việc truyền tín hiệu xuôi chiều của thụ thể tế bào T sau khi xử lý kháng-PD-1 bị kìm hãm bởi TGF- β , dẫn đến sự kích thích tế bào T dưới mức tối ưu. Dữ liệu của chúng tôi gợi ý rằng sự ức chế của TGF- β làm giảm bớt vi môi trường khối u kìm hãm miễn dịch và cho phép các chất điều biến điểm kiểm tra, chẳng hạn như tác nhân kháng-PD-1, gây cảm ứng tốt hơn đối với đáp ứng miễn dịch và do đó làm tăng tỉ lệ của bệnh nhân hưởng lợi từ việc điều trị ung thư miễn dịch.

Ví dụ 5: Tác Dụng Của Dạng Kết Hợp Ab1 Và Kháng Thể Kháng-PD1 In Vivo

Tiếp theo chúng tôi nghiên cứu tác dụng của việc điều trị kháng-TGF- β và kháng-PD-1 kết hợp trong mô hình ung thư chuột nhắt C57BL/6.

Khả Năng Dung Chịu/Độ An Toàn Sơ Bộ

Nguyên Liệu Và Phương Pháp

Khả năng dung chịu của Ab1 và kháng thể đơn dòng (mAb) kháng-PD-1 chuột nhắt (mPD-1) dưới dạng các tác nhân đơn lẻ và ở dạng kết hợp được đánh giá ở chuột nhắt cái C57BL/6. Ab1 (10, 20, và 50 mg/kg) hoặc Ab đối chứng isotyp (hIgG4 kháng-HEL mua của hãng Crown Bioscience; được sử dụng ở 10 và 20 mg/kg) được dùng IV ba ngày một lần (Q3D) dưới dạng các tác nhân đơn lẻ hoặc kết hợp với Mab kháng-PD1 ở 5 mg/kg IV hai lần mỗi tuần. Ab kháng-PD1 dùng trong nghiên cứu này là, được ký hiệu là "antimPD1_hyb_RMP114_mIgG1LCfullrat" (hoặc Mab x-kháng-mPD-1). Nó là kháng thể kháng-mPD-1 chuột cống khảm được tạo ra bằng cách thay thế vùng Fc chuột cống của dòng IgG_{2a} chuột cống RMP1-14 (BioXcell, Cat. #BE0146) bằng vùng Fc IgG₁ chuột nhắt. Các trình tự amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể khảm này được thể hiện trong các SEQ ID NO:7 và 8. Khả năng dung chịu được đánh giá bằng cách đo khối lượng cơ thể con vật và quan sát lâm sàng. Khi kết thúc ba tuần điều trị, bốn giờ sau lần điều trị cuối cùng, thực hiện lần lấy mẫu cuối cùng và cố định mô (tim, thận, gan, phổi, và lách) trong formaldehyt và gửi đi phân tích mô bệnh học.

Liều lượng được coi là quá độc nếu nó gây ra sự giảm 15% khối lượng cơ thể trong ba ngày liên tiếp ở con chuột nhắt cụ thể, sự giảm 20% khối lượng cơ thể trong một ngày, hoặc 10% hoặc lớn hơn của ca chết liên quan đến thuốc, trừ khi chứng suy mòn do khối u gây ra dẫn đến sự giảm khối lượng cơ thể được quan sát thấy trong nhóm được điều trị bằng tá được lỏng đối chứng. Khối lượng cơ thể con vật bao gồm khối lượng khối u.

Kết Quả Độ Độc/Độ An Toàn

Nghiên cứu khả năng dung chịu ở các con chuột nhắt C57BL/6 cho thấy rằng tất cả các mức liều lượng được thử nghiệm của các chất đơn lẻ và dạng kết hợp của Ab1 và Mab x-kháng-mPD-1 đều được dung chịu tốt. Không có sự thay đổi lớn của khối lượng cơ thể được quan sát thấy ở nhóm điều trị bất kỳ ở tất cả các liều được thử nghiệm. Không có quan sát lâm sàng nghiêm trọng hoặc cơ bản nào được quan sát thấy trong quá trình nghiên cứu. Phân tích mô bệnh học xác định được số lượng tăng lên của tế bào lympho ở lách (tủy trắng) của tất cả các nhóm được điều trị bao gồm nhóm được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, bất kể dạng kết hợp nào và không có mối quan hệ liều lượng bất kỳ. Không có phát hiện bằng kính hiển vi đáng kể khác được quan sát thấy. Hai con chuột nhắt từ nhóm kết hợp, Ab đối chứng isotyp (10 mg/kg) và Mab kháng-PD-1 (5 mg/kg), được phát hiện chết sau lần dùng cuối cùng vào ngày cuối cùng của nghiên cứu. Phân tích mô bệnh học không phát hiện ra nguyên nhân chết liên quan đến thuốc bất kỳ.

Nghiên Cứu Tính Hiệu Quả

Tác dụng của việc kết hợp điều trị kháng-TGF- β và kháng-PD-1 ở các con chuột nhắt C57BL/6 mang khối u ruột kết đồng sinh MC38 dưới da được đánh giá. Các con chuột được cấp Ab1 ở 25 mg/kg, Mab x-kháng-mPD-1 ở 5 mg/kg, hoặc cả hai, Q3D trong thời gian ba tuần. Nghiên cứu này chứng tỏ rằng dạng kết hợp Ab1 và Mab kháng-mPD-1 có hoạt tính kháng khối u lớn hơn đáng kể so với các chất đơn lẻ một mình. Nguyên liệu và phương pháp và dữ liệu của nghiên cứu này được mô tả chi tiết dưới đây.

Nguyên Liệu Và Phương Pháp

Động vật

Các con chuột nhắt C57BL/6 cái được thu lấy từ Charles River Labs (Wilmington, MA, Mỹ). Các con vật được để cho thích nghi trong ít nhất là ba ngày trước tham gia vào nghiên cứu. Các con chuột 11 tuần tuổi và có khối lượng từ 17,0 đến 20,9 g lúc bắt đầu nghiên cứu. Chúng tiếp cận tự do đến thức ăn (khẩu phần ăn cho động vật gặm nhấm Harlan 2916, Massachusetts, Mỹ) và nước tiệt trùng, và được nhốt với chu kỳ 12 giờ sáng/tối.

Tế Bào Khối U

MC38 là dòng tế bào ung thư tuyến ruột kết. Tế bào được thu lấy từ Viện Ung thư Quốc gia (Bethesda, MD, Mỹ) và được nuôi cấy trong CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C trong môi trường hoàn chỉnh (CM), mà bao gồm môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 với L-glutamin (Gibco, Cat#11875), có bổ sung huyết thanh thai bò đã được bất hoạt

bằng nhiệt (HI FBS) 10% (Gibco, Cat# 10438026). Tế bào được thu hoạch và tái tạo huyền phù trong nước muối đệm photphat Dulbecco (DPBS) (Gibco, Cat#14190), và 1×10^6 tế bào/200 μ l cho mỗi con chuột nhất được cấy dưới da (SC) vào sườn phải của con chuột nhất C57BL/6 cái.

Hợp Chất

Ab1 được dùng cho các con vật trong dung dịch trong nước. Nó được lọc 0,22 μ m qua PES và được lưu trữ trong các phần phân ước tiệt trùng ở nhiệt độ từ 2 đến 10°C. Kháng thể được cấp cho các con vật ở 10 ml/kg trong màng bụng (IP), 25 mg/kg.

hIgG₄ kháng-HEL (Crown Bioscience) được sử dụng làm đối chứng isotyp đối với Ab1. Kháng thể này được cấp cho các con vật đối chứng bằng IP ở 10 ml/kg bằng IP, 25 mg/kg.

Mab x-kháng-mPD-1 (*ở trên*) được cung cấp trong DPBS (Gibco, Cat#14190-094) và được cấp cho các con vật bằng IP ở 10 ml/kg, 5 mg/kg.

Thiết Kế Nghiên Cứu

Vào ngày 0, 60 con vật được cấy bằng tế bào khối u MC38. Vào ngày 8 sau khi cấy, các con chuột nhất, mà có kích thước khối u trung bình bằng 50-75 mm³, được gom lại và được phân ngẫu nhiên vào nhóm đối chứng và nhóm điều trị (mười con chuột nhất cho mỗi nhóm). Việc điều trị bằng tá dược lỏng (PBS, độ pH 7,2), hIgG₄ kháng-HEL, Ab1, và Mab kháng-mPD-1 ở liều được mô tả ở trên được bắt đầu vào ngày 9 và được nhắc lại vào ngày 12, 15, 18, 21, và 27. Các con vật được điều trị bằng tá dược lỏng và hIgG₄ kháng-HEL được sử dụng làm đối chứng. Các con chuột nhất được kiểm tra hàng ngày và phản ứng lâm sàng có hại được ghi lại. Các con chuột nhất riêng lẻ được cân từ ba đến bốn lần một tuần đến khi kết thúc thí nghiệm.

Các con chuột nhất bị giết chết êm ái khi trạng thái bệnh hoặc sự giảm khối lượng $\geq 20\%$ được quan sát thấy. Khối u được đo bằng thước kẹp hai lần mỗi tuần cho đến khi bị giết chết cuối cùng. Khi kích thước khối u đạt xấp xỉ 2000 mm³ hoặc có các vấn đề về sức khỏe của con vật (20% diện tích khối u bị loét), các con vật bị giết chết êm ái và ngày chết được ghi lại. Thể tích khối u rắn được ước tính từ hai số đo kích thước khối u và được tính theo phương trình sau đây:

$$\text{Thể tích khối u (mm}^3\text{)} = [\text{chiều dài (mm)} \times \text{chiều rộng}^2 \text{ (mm}^2\text{)}] / 2$$

Sau đó thu được phần trăm thoái biến khối u trung vị đối với nhóm vào ngày nhất định bằng cách lấy trung vị của phần trăm thoái biến khối u cụ thể được tính đối với mỗi con vật của nhóm vào ngày này. Ngày tính được xác định vào ngày khi $\Delta T/\Delta C$ (tức là, tỉ lệ của các trung vị của sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở giữa nhóm được điều trị và nhóm đối chứng) được tính, ngoại trừ khi phần trăm thoái biến khối u trung vị không đại diện cho hoạt tính của nhóm. Trong trường hợp đó, ngày được xác định là ngày đầu tiên khi phần trăm thoái biến khối u trung vị là lớn nhất. Thoái biến khối u được xác định là một phần (PR) nếu thể tích khối u giảm xuống 50% thể tích khối u khi bắt đầu điều trị. Thoái biến khối u hoàn toàn (CR) được coi là đạt được khi thể tích khối u dưới 14 mm^3 hoặc không được ghi nhận.

Hiệu Quả

Điểm kết thúc hiệu quả sơ bộ là sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở như được chỉ ra bằng $\Delta T/\Delta C$, phần trăm thoái biến khối u trung vị, thoái biến khối u một phần, và thoái biến khối u hoàn toàn. Sự thay đổi trong thể tích khối u đối với mỗi nhóm được điều trị (T) và nhóm đối chứng (C) được tính đối với mỗi con vật mỗi ngày bằng cách lấy thể tích khối u vào ngày quan sát nhất định trừ đi thể tích khối u vào ngày điều trị đầu tiên (ngày bắt đầu). ΔT trung vị được tính đối với nhóm được điều trị và ΔC trung vị được tính đối với nhóm đối chứng. Tỉ lệ $\Delta T/\Delta C$ được tính và được biểu diễn dưới dạng tỉ lệ phần trăm:

$$\Delta T / \Delta C = (\text{deltaT trung vị} / \text{deltaC trung vị}) \times 100$$

Tỉ lệ $\Delta T/\Delta C \leq 40\%$ được coi là có hoạt tính trị liệu. Tỉ lệ $\Delta T/\Delta C 0\%$ được coi là ngưng trệ khối u. Tỉ lệ $\Delta T/\Delta C < 0\%$ được coi là thoái biến khối u.

Phần trăm thoái biến khối u được xác định dưới dạng tỉ lệ phần trăm của thể tích khối u giảm đi trong nhóm được điều trị vào ngày quan sát nhất định so với thể tích khối u lúc bắt đầu nghiên cứu (t_0). Vào thời điểm cụ thể (t) và đối với mỗi con vật, phần trăm thoái biến khối u được tính bằng cách sử dụng công thức sau đây:

$$\% \text{ thoái biến khối u (ở } t) = [(\text{thể tích}_{t_0} - \text{thể tích}_t) / \text{thể tích}_{t_0}] \times 100$$

Sau đó phần trăm thoái biến khối u trung vị đối với nhóm vào ngày nhất định được tính bằng cách lấy trung vị của các giá trị % thoái biến khối u cụ thể được tính đối với mỗi con vật trong nhóm. Ngày tính được xác định là ngày khi $\Delta T/\Delta C$ được tính, ngoại trừ khi phần trăm thoái biến khối u trung vị không đại diện cho hoạt tính của nhóm. Trong trường hợp đó, ngày được xác định là ngày đầu tiên khi phần trăm thoái biến khối u trung vị là lớn nhất.

Phân Tích Thống Kê

Kiểu ANOVA hai chiều với các yếu tố điều trị và ngày (lặp lại) được thực hiện trên sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở. Trong trường hợp mà sự tương tác điều trị*ngày hoặc hiệu quả điều trị đáng kể, thì sau đó thực hiện phân tích tương phản với sự hiệu chỉnh Bonferroni-Holm đối với bội số để so sánh tất cả nhóm được điều trị với nhóm đối chứng vào mỗi ngày từ ngày 8 đến 27. Sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở được tính đối với mỗi con vật và mỗi ngày bằng cách lấy thể tích khối u vào ngày quan sát nhất định trừ đi thể tích khối u vào ngày điều trị đầu tiên (ngày 8).

Vì tính không đồng nhất của các biến đổi được quan sát thấy giữa các nhóm, cấu trúc hiệp biến đối xứng hợp chất (CS) với nhóm = lựa chọn được chọn cho mô hình kiểu ANOVA (SAS Institute Inc. (2008) SAS/STAT 9.2 Hướng Dẫn Sử Dụng bởi Cary NC). Trên các hình vẽ HÌNH 5 và HÌNH 6, các trung vị và Độ Lệch Chuẩn Trung Vị (MAD) của mỗi nhóm được thể hiện đối với mỗi ngày đo. Trong Bảng 4-6 dưới đây, các trung vị và MAD Được Chuẩn Hóa ($nMAD = 1,4826 * MAD$) của mỗi nhóm được báo cáo đối với mỗi ngày đo. Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm SAS phiên bản v9.2. Xác suất nhỏ hơn 5% ($p < 0,05$) được coi là có ý nghĩa.

Kết Quả Về Hiệu Quả

Việc điều trị các con chuột nhắt C57BL/6 mang khối u bằng Ab1, Mab kháng-PD-1, hoặc dạng kết hợp của hai chất này cũng được dung chịu tốt và không độc như được chỉ ra bằng tình trạng sức khỏe chung và hoạt động của các con vật và không có sự thay đổi đáng kể của khối lượng cơ thể. Dưới dạng các chất đơn lẻ, Ab1 ở 25 mg/kg Q3D và Mab kháng-PD-1 ở 5 mg/kg Q3D gây ra giá trị giảm khối lượng cơ thể ở điểm đáy lần lượt chỉ bằng 3,4% (ngày 9) và 2,1% (ngày 9). Dạng kết hợp của Ab1 (25mg/kg Q3D) và Mab kháng-PD-1 (5 mg/kg Q3D) cũng được dung chịu tốt, cho thấy giá trị giảm khối lượng cơ thể ở điểm đáy bằng 1,3% (ngày 9) (Bảng 4).

Dưới dạng các chất đơn lẻ, Ab1 (25 mg/kg Q3D) và Mab kháng-PD-1 (5 mg/kg Q3D) cho thấy không có sự nhiễu loạn ở sự phát triển khi so với con vật được điều trị bằng đối chứng isotyp Ab1 (hIgG4 kháng-HEL). Tỷ lệ $\Delta T/\Delta C$ vào ngày 27 của việc điều trị lần lượt là 93% và 109% (Bảng 4). Dạng kết hợp của Mab kháng-PD-1 và hIgG4 kháng-HEL chứng tỏ hoạt tính kháng-khối u nhỏ nhất với $\Delta T/\Delta C$ bằng 31% vào ngày 27 của việc điều trị (không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng) và thoái biến khối u hoàn toàn quan

sát được chỉ ở 2 trong số 10 con chuột nhất. Tuy nhiên, dạng kết hợp của Mab kháng-PD-1 và Ab1 chứng tỏ hoạt tính kháng-khối u tốt hơn từ ngày 15 đến ngày 27, với $-1 \Delta T/\Delta C$ vào ngày 27 của việc điều trị (khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng) và thoái biến khối u hoàn toàn quan sát được ở 6 trong số 10 con chuột nhất (Bảng 4).

Bảng 4 Hoạt Tính Của Ab1 và Mab x-kháng-mPD-1 Ở Mô Hình Ung Thư MC38 C57BL/6

Chất	ΔW^* (ngày của điểm đáy)	$\Delta T/\Delta C\%$ (Ngày 27)	Trung vị % thoái biến khối u (Ngày 27)	giá trị p** (Ngày 27)	Thoái biến khối u (Ngày 27)	
					PR	CR
Tá dược lỏng	-1,8 (D9)	100	-	-	0/10	0/10
hIgG ₄ kháng-HEL (25 mg/kg)	-	104	-	0,7914	1/10	1/10
Ab1 (25 mg/kg)	-3,4 (D9)	93	-	0,9953	0/10	0/10
x-kháng-mPD-1 (5 mg/kg)	-2,1 (D9)	109	-	0,5435	2/10	1/10
Ab1 (25 mg/kg) + x-kháng-mPD- 1 (5 mg/kg)	-1,3 (D9)	-1	24,5	<0,0001	6/10	6/10
hIgG ₄ kháng-HEL (25 mg/kg) + x- kháng-mPD-1 (5 mg/kg)	-3,0 (D9)	31	-	0,4020	2/10	2/10

* ΔW chỉ sự thay đổi khối lượng cơ thể trung bình theo % cho mỗi nhóm ở điểm đáy.

** Giá trị p thu được bằng phân tích tương phản để so sánh mỗi nhóm được điều trị với đối chứng bằng cách sử dụng sự điều chỉnh Bonferroni-Holm đối với bội số sau Kiểu ANOVA hai chiều với các phép đo lặp lại về sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở. Xác suất nhỏ hơn 5% ($p < 0,05$) được coi là có ý nghĩa.

Bảng 5 và Bảng 6 và các hình vẽ HÌNH 5-7 thể hiện dữ liệu bổ sung cho thấy hoạt tính của các kháng thể một mình hoặc ở dạng kết hợp trên thể tích khối u trong mô hình chuột nhắt.

Bảng 5 So Sánh Các Nhóm Được Điều Trị Với Nhóm Đối Chứng

Sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở mm ³ : Trung vị (nMAD), n, và giá trị p*						
Nhóm Điều Trị	Toàn bộ	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 19	Ngày 23	Ngày 27
Tá dược lỏng	-	26,0 (20,02) n=10	71,5 (53,37) n=10	220,5 (117,87) n=10	528,0 (157,16) n=10	1610,0 (413,65) n=9
hIgG ₄ kháng-HEL (25mg/kg)	- 0,9629	17,0 (17,79) n=10 0,5197	65,5 (51,89) n=10 1,0000	182,5 (113,42) n=10 0,8858	491,5 (358,05) n=10 1,0000	1675,0 (621,21) n=9 0,7914
Ab1 (25 mg/kg)	- 0,9629	17,0 (15,57) n=10 0,4754	79,0 (43,74) n=10 1,0000	218,0 (83,03) n=10 0,8858	567,0 (344,70) n=10 1,0000	1496,5 (472,21) n=8 0,9953
Mab x-kháng- mPD1 (5 mg/kg)	- 0,2439	-2,0 (21,50) n=10 0,0224	38,5 (68,20) n=10 0,1235	147,5 (149,74) n=10 0,2259	458,0 (280,21) n=10 0,2228	1748,0 (851,01) n=9 0,5435
Ab1 (25 mg/kg) + Mab x-kháng- mPD-1 (5 mg/kg)	- 0,0007	-3,5 (10,38) n=10 0,0743	20,0 (20,02) n=10 0,0121	-0,5 (69,68) n=10 <.0001	-17,0 (51,15) n=10 <.0001	-9,0 (86,73) n=10 <.0001
hIgG ₄ kháng-HEL (25mg/kg) + x-kháng-m-PD-1 (5 mg/kg)	- 0,2531	19,0 (37,81) n=10 0,5197	61,5 (65,98) n=10 0,2848	145,0 (160,12) n=10 0,2259	266,0 (398,82) n=10 0,1979	503,0 (841,38) n=8 0,4020

*Giá trị p thu được bằng phân tích tương phản so với đối chứng vào mỗi ngày với sự điều chỉnh Bonferroni-Holm đối với bội số sau Kiểu ANOVA hai chiều về sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở.

Bảng 6 Ab1 và Mab x-kháng-mPD-1 dưới dạng các tác nhân đơn lẻ so với dạng kết hợp

Sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở mm ³ : Trung vị (nMAD), n và giá trị p*						
Nhóm điều trị	Toàn bộ	Ngày 12	Ngày 15	Ngày 19	Ngày 23	Ngày 27
Ab1 (25 mg/kg) + Mab x-kháng- mPD-1 (5 mg/kg)	-	-3,5 (10,38) n=10	20,0 (20,02) n=10	-0,5 (69,68) n=10	-17,0 (51,15) n=10	-9,0 (86,73) n=10
X-kháng-mPD-1 (5 mg/kg)	- 0,0405	-2,0 (21,50) n=10 1,0000	38,5 (68,20) n=10 0,7631	147,5 (149,74) n=1 0,0276	458,0 (280,21) n=10 0,0004	1748,0 (851,01) n=9 0,0024
Ab1 (25 mg/kg)	- 0,0017	17,0 (15,57) n=10 1,0000	79,0 (43,74) n=10 0,0694	218,0 (83,03) n=10 0,0007	567,0 (344,70) n=10 <.0001	1496,5 (472,21) n=8 <.0001
hIgG ₄ kháng-HEL (25mg/kg) + Mab x-kháng- mPD-1 (5 mg/kg)	-	19,0 (37,81) n=10	61,5 (65,98) n=10	145,0 (160,12) n=10	266,0 (398,82) n=10	503,0 (841,38) n=8
Mab x-kháng- mPD-1 (5 mg/kg)	- 0,8680	-2,0 (21,50) n=10 0,2024	38,5 (68,20) n=10 0,7631	147,5 (149,74) n=10 0,9476	458,0 (280,21) n=10 0,8576	1748,0 (851,01) n=9 0,8491
hIgG ₄ kháng-HEL (25mg/kg)	- 0,5691	17,0 (17,79) n=10 1,0000	65,5 (51,89) n=10 0,5743	182,5 (113,42) n=10 0,4761	491,5 (358,05) n=10 0,2357	1675,0 (621,21) n=9 0,8491

*Giá trị p thu được bằng phân tích tương phản để so sánh dạng kết hợp của Ab1, hIgG4 kháng-HEL và x-kháng-mPD-1 so với mỗi chất đơn lẻ ở liều lượng ở trong dạng kết hợp vào mỗi ngày với sự điều chỉnh Bonferroni-Holm đối với bội số sau Kiểu ANOVA hai chiều về sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở.

Dữ liệu trong các bảng và các hình vẽ cho thấy rằng dạng kết hợp của Ab1 ở 25 mg/kg Q3D và Mab x-kháng-mPD-1 ở 5 mg/kg Q3D có hiệu quả kháng khối u lớn hơn so với một trong hai kháng thể ở các liều lượng này. Sự khác biệt này là đáng kể về mặt thống kê, với các giá trị p vào ngày 19, 23, và 27 lần lượt là 0,0007, <0,0001, và <0,0001, khi so sánh dạng kết hợp với Ab1 dưới dạng chất đơn lẻ. Sự khác biệt này cũng đáng kể về mặt thống kê, với các giá trị p vào ngày 19, 23, và 27 là 0,0276, 0,0004, và 0,0024 khi so sánh dạng kết hợp với Mab x-kháng-mPD-1 dưới dạng chất đơn lẻ (Bảng 6). Đối với nhóm kết hợp của hIgG4 kháng-HEL ở 25 mg/kg Q3D và Mab x-kháng-mPD-1 ở 5 mg/kg Q3D, hiệu quả điều trị trên sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở không khác biệt đáng kể so với hiệu quả của một trong hai chất một mình vào ngày đo bất kỳ.

Tóm lại, dạng kết hợp của Ab1 ở 25 mg/kg Q3D và Mab kháng-mPD-1 ở 5 mg/kg Q3D có hiệu quả kháng khối u lớn hơn đáng kể so với một trong hai chất được sử dụng một mình từ ngày 15 đến ngày 27.

Trong nghiên cứu khác, chúng tôi đánh giá hoạt tính kháng khối u của dạng kết hợp của Ab1 ở liều lượng bằng 1, 10, hoặc 25 mg/kg và kháng thể PD-1 chuột nhắt ở liều lượng bằng 5 mg/kg chống lại mô hình ung thư ruột kết chuột nhắt MC38 dưới da ở các con chuột nhắt C57BL/6J. Tế bào ung thư tuyến ruột kết MC38 phát triển theo hàm mũ (NCI, Frederick, MD) được nuôi cấy trong RPMI-1640 có bổ sung FBS 10% trong thiết bị ủ CO₂ 5% đã được làm ẩm và sau đó được cấy dưới da (1×10^6 tế bào) vào sườn của các con chuột nhắt C57/Bl6J cái (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Ngay khi khối u đạt kích thước trung bình bằng 50-75 mm³, các con chuột nhắt được gom lại và được phân ngẫu nhiên vào nhóm đối chứng và nhóm điều trị (10 con chuột nhắt cho mỗi nhóm). Sau đó các con chuột nhắt mang khối u được điều trị trong màng bụng bằng PBS, kháng thể đối chứng isotyp IgG4 (25 mg/kg) hoặc Ab1 (1, 10, và 25mg/kg) ba lần cho mỗi tuần đến khi mỗi con vật nhận tổng số từ 6 đến 7 liều lượng. Khối u được đo bằng thước kẹp số 2 lần cho mỗi tuần và thể tích khối u được tính (mm³ = L x W x H) và được vẽ biểu đồ bằng cách sử dụng GraphPad Prism. Các con chuột

nhất bị giết chết êm ái bằng CO₂ khi kết thúc nghiên cứu, nếu khối u phát triển đến >2000mm³, hoặc nếu khối u thể hiện sự loét > 20% bề mặt khối u.

Dưới dạng các chất đơn lẻ, Ab1 ở liều lượng bằng 25 mg/kg Q3D và kháng thể α -PD-1 chuột nhắt ở liều lượng bằng 5 mg/kg chứng tỏ hoạt tính một phần lần lượt với 2/8 và 4/8 thoái biến khối u hoàn toàn, ở các con chuột nhắt mang khối u MC38. Dạng kết hợp của Ab1 ở 1, 10, hoặc 25 mg/kg Q3D và kháng thể α -PD-1 chuột nhắt ở 5 mg/kg Q3D có hoạt tính trị liệu. Vào ngày 24 sau khi cấy, khi so sánh sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở, hiệu quả của dạng kết hợp của Ab1 ở tất cả các liều lượng được thử nghiệm và kháng thể α -PD-1 chuột nhắt ở 5 mg/kg Q3D lớn hơn so với tác dụng của mỗi chất đơn lẻ với 5/8, 6/8 và 7/8 thoái biến khối u hoàn toàn lần lượt đối với 1, 10, và 25 mg/kg của Ab1. Bảng 6A trình bày tóm tắt kết quả.

Bảng 6A Hiệu Quả Kháng Khối U Của Dạng Kết Hợp Ab1+ Mab Kháng-mPD-1

Nhóm	Điều Trị	Tổng Số Lượng Chuột Nhắt	Số Lượng Của Đáp Ứng/Thoái Biến Khối U Hoàn Toàn (Tỷ Lệ Đáp Ứng/Thoái Biến Khối U Hoàn Toàn)
1.	PBS	8	0 (0%)
2.	25 mg/kg kháng thể đối chứng isotyp đối với Ab1 + 5 mg/kg kháng thể đối chứng isotyp đối với Mab kháng-mPD-1	8	0 (0%)
3.	25 mg/kg Ab1 +	8	2 (25%)

Nhóm	Điều Trị	Tổng Số Lượng Chuột Nhất	Số Lượng Của Đáp Ứng/Thoái Biến Khối U Hoàn Toàn (Tỷ Lệ Đáp Ứng/Thoái Biến Khối U Hoàn Toàn)
	5 mg/kg kháng thể đối chứng isotyp đối với Mab kháng-mPD-1		
4.	25 mg/kg kháng thể đối chứng isotyp đối với Ab1 + 5 mg/kg Mab x-kháng-mPD-1	8	4 (50%)
5.	1 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg Mab x-kháng-mPD-1	8	5 (62,5%)
6.	10 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg Mab x-kháng-mPD-1	8	6 (75%)
7.	25 mg/kg Ab1 + 5 mg/kg Mab x-kháng-mPD-1	8	7 (87,5%)

Tóm lại, dữ liệu tiền lâm sàng này chứng tỏ rằng dạng kết hợp của sự ức chế PD-1 với sự ức chế TGF- β có thể ức chế sự phát triển đến mức độ lớn hơn so với chỉ có một mình sự phong bế chất ức chế điểm kiểm tra.

Ví dụ 6: Hàm Lượng TGF- β 1 Trong Khối U

Hàm lượng TGF- β 1 trong khối u được nghiên cứu trong mô hình chuột nhắt BALB/c được ghép mảnh ghép khác loài dưới da ung thư kết trực tràng LoVo. Các con chuột nhắt được tiêm bằng Ab1 hoặc đối chứng isotyp Mab ở 10, 25, hoặc 50 mg/kg trong tĩnh mạch 3 ngày một lần đối với tổng số tám lần dùng IV, bắt đầu khi thể tích khối u nhỏ hơn 100 mm³.

Các mẫu khối u, mà được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C trong ống 2 ml làm bằng chất dẻo với các viên bi gồm 2,8 mm (MoBio 13114-50), được rã đông ở nhiệt độ trong phòng. Một mili lít (ml) của chất đệm Meso Scale Diagnostic (MSD) Tris Lysis lạnh (R60TX-2) có bổ sung 1x Hỗn Hợp Chất Ức Chế Proteaza Và Phosphatase Halt™ (Thermo 78440) được bổ sung vào mô, mà sau đó được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng máy đồng nhất hóa Precellys® 24 Dual (Bertin Instruments) trong hai chu kỳ ở 6500 vòng/phút, mỗi chu kỳ 20 giây, ở nhiệt độ 4°C. Dịch dung giải được làm trong bằng ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 20.000 x g trong máy ly tâm Eppendorf 5417C ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi bề mặt được chuyển vào các ống Eppendorf đã được làm lạnh sạch và được làm trong thêm bằng ly tâm trong 20 phút nữa như được mô tả ở trên. Sau đó, dịch nổi bề mặt được chuyển vào khối lưu trữ 96 giếng làm bằng chất dẻo, kết đông nhanh trong nitơ lỏng, và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C.

Ngày hôm sau các mẫu được rã đông ở nhiệt độ trong phòng và đặt trên nước đá. Nồng độ protein trong dịch dung giải được đo bằng cách sử dụng bộ kit Thử Nghiệm Protein Axit Bicinchoninic (BCA) (Thermo 23225) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dịch dung giải được chuẩn hóa đến nồng độ protein bằng xấp xỉ 8 mg/ml bằng cách sử dụng chất đệm MSD Tris Lysis với các chất ức chế proteaza và phosphatase (xem ở trên), và chia phần phân ước trong các vi ống làm bằng chất dẻo.

Nồng độ TGF- β 1 trong dịch dung giải khối u được chuẩn hóa được đo theo hướng dẫn của nhà sản xuất bằng cách sử dụng bộ kit TGF- β 1 người (MSD, K151IUC-2) sử dụng thử nghiệm phát quang điện hóa. TGF- β 1 chuột nhắt tái tổ hợp (R&D Systems, Cat. #7666-MB-005) được pha loãng theo dãy trong chất đệm MSD Lysis được sử dụng làm mẫu chuẩn. Các mẫu được tải lên đĩa trong hai bản sao. Tín hiệu phát quang điện hóa được đo bằng cách sử dụng

dụng máy đọc đĩa MESO SECTOR S 600 (MSD), và nồng độ TGF- β 1 trong các mẫu được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm MSD Discovery Workbench v4.0 dựa trên đường cong chuẩn.

Nồng độ trung bình đối với hai bản sao mẫu được tính bằng phần mềm. Các giá trị nồng độ xác định bằng phần mềm dưới dạng "Dưới Khoảng Đường Cong Khớp" hoặc "Dưới Khoảng Phát Hiện" được thay thế bằng giá trị không. Để tính nồng độ TGF- β 1 cho mỗi mg của tổng số protein, nồng độ đo được trong thử nghiệm (pg/ml) được chia cho nồng độ protein (mg/ml) trong các mẫu.

Kết quả cho thấy rằng hàm lượng TGF- β 1 trong khối u trong các con chuột nhất được tiêm bằng đối chứng isotyp có trung vị bằng 21,4 pg/mg tổng số protein, hàm lượng tương ứng trong các con chuột nhất được tiêm bằng Ab1 không phát hiện được (HÌNH 8).

Để chứng minh sự liên quan của các phát hiện trên ở người, chúng tôi thử nghiệm mười mẫu khối u kết trực tràng người và mười mẫu khối u u melanin người về hàm lượng TGF- β 1 trong khối u của họ như được mô tả ở trên bằng cách sử dụng phương pháp đã mô tả ở trên. Đối với các mẫu CRC người, hàm lượng TGF- β 1 nằm trong khoảng từ khoảng 7 đến 25 pg/mg. Đối với các mẫu u melanin người, hàm lượng TGF- β 1 nằm trong khoảng từ khoảng 1 pg/mg đến cao bằng 43 pg/mg. Dữ liệu này ủng hộ thêm việc sử dụng trị liệu kháng-TGF- β 1 chẳng hạn như Ab1 trong điều trị khối u, một mình hoặc kết hợp với chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch khác chẳng hạn như kháng thể kháng-PD-1.

Ví dụ 7: Nghiên Cứu Dược Động Học Của Ab1

Ví dụ này mô tả các nghiên cứu mà xác định đặc điểm biên dạng dược động học (PK) của Ab1 và so sánh nó với biên dạng dược động học của fresolimumab. Trong một nghiên cứu, năm nhóm chuột cống Sprague-Dawley đã được đặt ống thông được cấp liều đơn lẻ của Ab1 hoặc fresolimumab ở 5 mg/kg trong tĩnh mạch. Mỗi nhóm có năm con cái và năm con đực. Máu từ các con chuột cống được thu gom vào 0,25, 6, 24, 48, 72, 144, 192, và 240 giờ sau khi dùng liều lượng. Nồng độ trong huyết thanh của Ab1 và fresolimumab được xác định bằng ELISA. Tính so sánh được được xác định nếu khoảng tin cậy 90% đối với tỉ lệ AUC (của nguyên liệu thử nghiệm với tham chiếu) nằm trong khoảng từ 80% đến 125%.

Nồng độ kháng thể trong huyết thanh theo thời gian từ năm nhóm chuột cống được thể hiện trên HÌNH 9A. Các tham số PK từ nhóm 2, 4, và 5 (xem chú thích của HÌNH 9A) được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Nghiên cứu này cho thấy rằng Ab1 có động thái PK tuyến

tính, với thời gian bán thải lâu hơn nhiều ($T_{1/2}$ trung bình bằng 7,1 ngày so với 4,3 ngày) và tốc độ loại trừ thấp hơn (CL bằng 0,30 ml/giờ/kg so với 0,51 ml/giờ/kg) so với fresolimumab. Dữ liệu cho thấy rằng Ab1 có sự bộc lộ cao hơn 1,7 lần ở chuột cống so với fresolimumab.

Bảng 7 So Sánh PK Giữa Fresolimumab Và Ab1

Tham Số PK	Fresolimumab (mẻ 2)	Ab1 (mẻ 1)	Ab1 (mẻ 2)
$t_{1/2}$ (giờ)	103,21 ± 12,98	181,83 ± 80,92*	158,38 ± 66,73
C lớn nhất (µg/ml)	114,56 ± 16,42	116,60 ± 16,78	109,72 ± 18,49
Vz (ml/kg)	75,22 ± 15,21	78,35 ± 26,33	63,47 ± 10,65
CL (ml/giờ/kg)	0,51 ± 0,10	0,31 ± 0,04*	0,30 ± 0,05*
AUC _{cuối cùng} (giờ*µg/ml)	8046 ± 1210	10007 ± 1180*	11223 ± 1035*
AUC _{0-INF} (giờ*µg/ml)	10107 ± 1613	16322 ± 2523*	17553 ± 4130*

*Trung bình nhóm ± SD khác biệt có ý nghĩa thống kê với nhóm "fresolimumab (B2)" (Nhóm 2 trên HÌNH 9A).

Nghiên cứu PK bổ sung trên Ab1 (Nghiên cứu 2) được thực hiện trong nhóm khỉ cynomolgus. Mỗi nhóm có năm con cái và năm con đực, và được cấp bằng cách truyền trong tĩnh mạch liều đơn lẻ của Ab1 ở 1 mg/kg (HÌNH 9B) hoặc 10 mg/kg (HÌNH 9D), hoặc năm liều mỗi tuần của Ab1 ở 1 mg/kg (HÌNH 9C) hoặc 10 mg/kg (HÌNH 9E) cho mỗi liều. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của Ab1 ở các con khỉ được thể hiện trong các hình vẽ HÌNH 9B-E. Nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của fresolimumab được cấp cho các con khỉ ở liều đơn lẻ hoặc liều Q2W (hai tuần một lần) lặp lại trong các nghiên cứu trước cũng được thể hiện trong các hình vẽ để so sánh. Dữ liệu này cho thấy rằng Ab1 cũng có động thái PK tuyến tính ở khỉ và thể hiện sự bộc lộ cao hơn cả sau khi dùng liều đơn lẻ và dùng liều lặp lại so với fresolimumab ở cả 1 mg/kg và 10 mg/kg cho mỗi liều. Khi dùng liều đơn lẻ bằng 10 mg/kg, Ab1 có thời gian bán thải là 13 ngày, trong khi đó fresolimumab có thời gian bán thải là 4,5 ngày; Ab1 có CL bằng khoảng 0,40 ml/giờ/kg, trong khi đó fresolimumab có CL bằng 0,66 ml/giờ/kg. Giống như nghiên cứu ở chuột cống, nghiên cứu ở khỉ cũng cho thấy Ab1 có sự bộc lộ cao hơn khoảng 1,7 lần so với fresolimumab.

Các nghiên cứu được mô tả ở trên chứng tỏ rằng Ab1 có thời gian bán thải lâu hơn đáng kể về mặt thống kê, thời gian thanh thải lâu hơn, và sự bộc lộ sinh học cao hơn *in vivo* so với fresolimumab.

Ngoài ra, nghiên cứu ở các con chuột nhắt Balb/C mang khối u Ab12 cho thấy rằng Ab1 có biên dạng PK tương tự dù nó được dùng trong tĩnh mạch hay trong màng bụng.

Bằng cách sử dụng thang tỉ lệ tương quan sinh trưởng trên mô hình hai ngăn, chúng tôi dự đoán các tham số PK sau đây ở người nặng 70 kg dựa trên dữ liệu ở khỉ (Bảng 8):

Bảng 8 Lập Mô Hình Tương Quan Sinh Trưởng Của Các Tham Số PK

Tham Số PK	Ab1 Ở Khỉ	Ab1 Ở Người
$T_{1/2}$ (ngày)	13,1	20,9
CL (ml/giờ/kg)	0,392	5,7
V1 (ngăn trung tâm) (l)	0,104	2,43
Q (ml/giờ)	3,18	46
V2 (ngăn ngoại vi) (l)	0,0693	1,62

Các tham số PK được dự đoán của Ab1 cũng phù hợp hơn so với các tham số PK được dự đoán của fresolimumab ở người. Ví dụ như, fresolimumab, với CL bằng 12,3 ml/giờ/kg ở người, có tốc độ thanh thải nhanh hơn so với Ab1.

Ví dụ 8: Nghiên Cứu Độc Học Của Ab1

Nghiên cứu độc học của Ab1 được thực hiện ở chuột cống và khỉ cynomolgus. Các điểm đầu mút được tính an toàn được đánh giá trong GLP liều lặp lại (thực hành tốt phòng thí nghiệm) hàng tuần trong thời gian 5 tuần. Ở liều lên đến 10 mg/kg/liều (nồng độ bằng 2 mg/ml) ở khỉ và lên đến 30 mg/kg/liều (nồng độ bằng 6 mg/ml) ở chuột cống, không có phát hiện mô bệnh học liên quan đến Ab1 được tìm thấy ở vị trí tiêm. Không có tác dụng liên quan đến Ab1 được ghi nhận trong nghiên cứu này ở mức liều lượng bất kỳ được thử nghiệm ở các xét nghiệm thần kinh, về các tham số nhiệt độ cơ thể, tốc độ hô hấp, huyết áp và ECG.

NOAEL (ngưỡng không quan sát thấy tác dụng phụ) đối với chuột cống được phát hiện là 3 mg/kg/liều trong việc dùng liều lượng lặp lại hàng tuần trong thời gian 5 tuần, và STD10 (liều lượng gây độc nghiêm trọng mà gây chết hoặc sự gây độc nghiêm trọng không thể đảo ngược ở 10% các con vật) được phát hiện là nằm trong khoảng từ 3 đến 10 mg/kg/liều

đối với chuột cống. Sự gây độc bao gồm sự tăng sinh van tim đặc trưng bởi nhiều hạch dày lên; và tình trạng phổi bất thường chẳng hạn như dịch tiết phế nang tế bào hỗn hợp, sự rò rỉ quanh mạch tế bào hỗn hợp, phì đại động mạch cơ, xuất huyết, và/hoặc khối lượng phổi tăng.

Các liều lượng NOAEL và HNSTD (tức là, liều lượng gây độc không nghiêm trọng cao nhất mà trên mức đó thì xảy ra sự gây chết, sự gây độc đe dọa tính mạng, hoặc sự gây độc không đảo ngược được) đối với khỉ trong việc dùng liều lượng lặp lại hàng tuần trong thời gian 5 tuần được phát hiện là 10 mg/kg/liều (*so với fresolimumab*, mà NOAEL ở khỉ được thể hiện là 1 mg/kg khi được dùng hai tuần một lần trong 7 hoặc 13 liều lượng, hoặc Q3D trong 4 tuần). Cũng xem dữ liệu được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây.

Bảng 9 Tóm Tắt Nghiên Cứu Độc Học Ở Chuột Cống Và Khỉ

Tham Số Độc Học	Chuột Cống	Khỉ
LD (Liều Gây Chết)	50 mg/kg/liều ¹	> 10 mg/kg/liều
HNLD (Liều Không Gây Chết Cao Nhất)	30 mg/kg/liều	10 mg/kg/liều
STD10	3-10 mg/kg/liều	KHÔNG ÁP DỤNG
HNSTD	KHÔNG ÁP DỤNG	10 mg/kg/liều
NOAEL	< 3 mg/kg/liều	10 mg/kg/liều
Cơ quan đích chính (mô bệnh học)	Tim, phổi, xương, răng	Không cơ quan nào được xác định
¹ : dựa trên nghiên cứu thăm dò NA: Không áp dụng		

Dựa trên dữ liệu độc học nêu trên, mong đợi rằng Ab1 có thể được dùng cho người bệnh một cách an toàn ở mức liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg đến 0,5 mg/kg hàng tuần hoặc ít thường xuyên hơn, ví dụ như, hai tuần một lần.

Ví dụ 9: Hiệu Quả In Vivo Của Đơn Trị Liệu Kháng-TGF- β

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu hiệu quả của 1D11, kháng thể kháng-TGF- β bò IgG₁ ở chuột nhắt mà phản ứng chéo với TGF- β 1, 2, và 3 người và chuột nhắt, trên mô hình khối u đồng sinh di căn. Trong mô hình này, tế bào u melanin chuột nhắt B16-F10

được đưa vào vào gan bàn chân của các con chuột nhắt C57BL/6 bằng IV và tạo nên sự di căn trong hạch bạch huyết dẫn lưu của chuột nhắt. Mặc dù việc điều trị bằng kháng thể đối chứng, 13C4, không có hiệu quả, việc điều trị bằng 50 mg/kg 1D11 ba lần một tuần bắt đầu một ngày sau khi gây nhiễm khối u triệt tiêu hoàn toàn sự di căn.

Để nghiên cứu vai trò của đáp ứng miễn dịch, các con chuột nhắt thiếu hụt gen β 2-microglobulin và do đó thiếu đáp ứng tế bào T gây độc tế bào $CD8^+$ được cấy bằng B16-F10 trong gan bàn chân và được điều trị như trên. Trái ngược với kết quả thấy được ở chuột nhắt, 1D11 không có hiệu quả trên số lượng của di căn trong hạch bạch huyết dẫn lưu ở các con chuột nhắt này. Các kết quả này gợi ý rằng cơ chế tác động của sự ức chế TGF- β dựa vào miễn dịch tế bào tập nhiễm.

Ví dụ 10: Chữ Ký TGF- β Trong Ung Thư

Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy rằng bệnh nhân u melanin mà không đáp ứng với trị liệu kháng-PD-1 có chữ ký phiên mã IPRES (Hugo et al., Cell (2016) 165:35-44). Để nghiên cứu cơ chế của tính kháng bẩm sinh đối với đơn trị liệu kháng-PD-1, chúng tôi nghiên cứu chữ ký phiên mã của đối tượng không đáp ứng so với đối tượng đáp ứng. Chúng tôi phát hiện ra rằng việc so sánh các biên dạng này bằng cách sử dụng Phân Tích Sự Làm Giàu Tập Hợp Gen với cơ sở dữ liệu có hơn 1M biên dạng phát hiện ra sự tương quan mạnh mẽ giữa đáp ứng kháng-PD-1 và sự hoạt hóa của việc truyền tín hiệu TGF- β trong khối u. Dữ liệu này gợi ý rằng ở đường cơ sở trong u melanin, TGF- β được kết hợp với tính kháng bẩm sinh đối với đơn trị liệu kháng-PD-1.

Ngoài ra, chúng tôi phát hiện không chỉ có sự tương quan giữa đáp ứng kháng-PD-1 và sự hoạt hóa của việc truyền tín hiệu TGF- β , mà sự tương quan này còn là mạnh mẽ ($R=0,59$, giá trị p theo kiểm định t $<9E-4$). Do đó, chúng tôi đặt tới chỉ dẫn cổng 1: Sự kìm hãm miễn dịch qua trung gian TGF- β trong u melanin (ví dụ, u melanin di căn) có thể góp phần vào tính kháng bẩm sinh. Ngoài ra, chúng tôi phát hiện ra rằng sự thay đổi biểu hiện gen cảm ứng bởi TGF- β có thể dập tắt được bằng việc điều trị 1D11, xác nhận sự đặc hiệu của chữ ký hoạt hóa TGF- β . Kết quả này chứng minh cho lợi ích của việc sử dụng các trị liệu kháng-TGF- β và kháng-PD-1 ở dạng kết hợp để điều trị cho bệnh nhân ung thư mà không đáp ứng với đơn trị liệu kháng-PD-1.

Phân tích mối tương quan này ở các kiểu khối u khác không phải là u melanin phát hiện ra rằng khối u trung mô (ví dụ, CRC, HCC, ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, và

ung thư buồng trứng) cũng được làm giàu đối với cả sự hoạt hóa TGF- β và tính kháng kháng-PD-1 đã được dự đoán. Phát hiện này thống nhất với vai trò của việc truyền tín hiệu TGF- β trong EMT. Do đó, chúng tôi đặt tới chỉ dẫn công 2: Khối u trung mô, đặc biệt là khối u có sự thâm nhiễm miễn dịch, có thể hưởng lợi từ liệu pháp kết hợp kháng-TGF- β và kháng-PD-1. Phương pháp học máy được sử dụng để xác định từ hơn 30 gen đánh dấu EMT số lượng gen nhỏ hơn, ví dụ như, ACTA2, VIM, MGP, ZEB2, và ZWINT, mà có thể được sử dụng để chọn lọc khối u trung mô. ACTA2 và VIM, ví dụ như, được phát hiện là có thể vận chuyển được qua các loại khối u. Theo đó, chữ ký phiên mã hoạt hóa TGF- β và các gen ở trong chữ ký này có thể đóng vai trò làm các chỉ thị sinh học hữu dụng để chọn lọc bệnh nhân ung thư ở đường cơ sở đối với liệu pháp kết hợp kháng thể kháng-TGF- β và kháng-PD-1.

Để nghiên cứu các chỉ thị sinh học trong vi môi trường khối u, kết cấu miễn dịch của khối u bệnh nhân được đánh giá bằng cách sử dụng MultiOmyx, thử nghiệm IHC đa thành phần, trên CRC và u melanin. Việc ghép đa thành phần được thực hiện với 12 chỉ thị sinh học (cùng nhau mô tả 22 loại tế bào miễn dịch) trên phần cắt FFPE đơn lẻ từ mỗi mẫu khối u. Các nghiên cứu này bao gồm khoảng giá trị của viêm để đánh giá các phân tích đánh giá mỗi loại khối u và tương quan với hiệu quả điều trị có thể có tốt như thế nào. Phương pháp thống kê được phát triển để đánh giá sự khác biệt ở cấp độ quần thể tế bào, bao gồm sự phù hợp bản sao, đồ thị phân tán dạng núi lửa để phân tích sự biến đổi, và ma trận tương quan. Thử nghiệm MultiOmyx chứng tỏ khả năng tái lập và độ chính xác kỹ thuật tốt, khoảng động lực phù hợp, sự khác biệt tình trạng viêm ở tế bào miễn dịch chọn lọc và vùng được quan tâm, và bao gồm cả sự tương quan dương và âm giữa các quần thể tế bào.

Ví dụ 11: Sự Thay Đổi Ở TGF- β 1, MIP-2 và KC/GRO Ở Khối U MC38 Sau Khi Điều Trị Bằng Ab1 Có Hoặc Không Có Kháng-PD1

Để chứng minh sự trung hòa của TGF- β , khả năng của Ab1 (có hoặc không có kháng-PD-1) để ảnh hưởng đến sự biểu hiện của xytokin trong khối u được đánh giá.

Các con chuột nhắt mang khối u MC38 được điều trị bằng liều đơn lẻ của PBS hoặc kháng-PD-1 một mình (5 mg/kg), hoặc các liều lượng tăng dần của Ab1 (10, 25 hoặc 50 mg/kg, trong màng bụng) kết hợp với kháng-PD-1 (5 mg/kg) khi thể tích của khối u nằm trong khoảng từ 61 đến 110 mm³. Khối u được thu gom 1 giờ, 6 giờ, 10 giờ, 24 giờ, 72 giờ, và 168 giờ sau khi điều trị, kết đông nhanh trong ống 2 ml làm bằng chất dẻo có các viên bi gồm 2,8 mm (Precyllys KT3961-1007.2), và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C. Để điều chế dịch dung

giải, khối u được rã đông ở nhiệt độ trong phòng. Một ml chất đệm Meso Scale Diagnostics (MSD) Tris Lysis lạnh (R60TX-2) có bổ sung 1x hỗn hợp chất ức chế proteaza và phosphataza Halt™ (Thermo 78440) được bổ sung vào mô, mà sau đó được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng máy đồng nhất hóa Precellys®24 Dual (Bertin Instruments) trong 2 chu kỳ ở tốc độ 6.500 vòng/phút, mỗi chu kỳ 20 giây, ở nhiệt độ 4°C. Dịch dung giải được làm trong bằng ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 20.000 x g trong máy ly tâm Eppendorf 5417C ở nhiệt độ 4°C. Dịch nổi bề mặt được chuyển vào các ống Eppendorf đã được làm lạnh sạch và được làm trong thêm bằng ly tâm trong 30 phút nữa như được mô tả ở trên. Dịch nổi bề mặt được chuyển vào khối lưu trữ 96 giếng làm bằng chất dẻo và đặt trên nước đá. Nồng độ protein trong dịch dung giải được đo bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm protein Axit Bicinchoninic (BCA) (Thermo 23225) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dịch dung giải được chuẩn hóa đến nồng độ protein xấp xỉ 5 mg/ml bằng cách sử dụng chất đệm MSD Tris Lysis với các chất ức chế proteaza và phosphataza (xem ở trên), chia phần phân ước trong các vi ống làm bằng chất dẻo, kết đông nhanh trong nitơ lỏng, và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C.

Nồng độ của TGFβ-1 hoạt tính trong dịch dung giải khối u được đo bằng cách sử dụng bộ Kit TGFβ-1 Người (MSD, K151IUC-2) sử dụng thử nghiệm phát quang điện hóa. TGFβ-1 chuột nhất tái tổ hợp (R&D Systems 7666-MB-005) được pha loãng theo dãy trong chất đệm MSD Lysis được sử dụng làm mẫu chuẩn. Dịch dung giải khối u đã được chuẩn hóa được điều chế như được mô tả ở trên được rã đông, và thử nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc xử lý axit của các mẫu không được thực hiện để chỉ định lượng dạng hoạt tính của TGFβ-1 có mặt trong khối u chứ không phải là toàn bộ TGFβ-1, mà bao gồm TGFβ-1 trong phức hợp với Peptit Kết Hợp Tiềm Tàng. Các mẫu được tải trên đĩa trong hai bản sao. Tín hiệu phát quang điện hóa được đo bằng cách sử dụng máy đọc đĩa MESO SECTOR S 600 (MSD), và nồng độ TGFβ-1 trong các mẫu được định lượng bằng cách sử dụng phần mềm MSD Discovery Workbench v. 4.0 dựa trên đường cong chuẩn.

So với các con vật được điều trị bằng một mình PBS hoặc kháng-PD-1, con vật được điều trị bằng Ab1 ở tất cả các mức liều lượng (10, 25, hoặc 50 mg/kg) cùng với kháng-PD-1 (5 mg/kg) được thể hiện là có hàm lượng giảm của TGF-β1 hoạt tính trong khối u, chứng tỏ sự ăn khớp của Ab1 với đích của nó in vivo (HÌNH 10A). Hàm lượng giảm của TGF-β1 hoạt tính được quan sát thấy trong một giờ và vẫn còn trong ít nhất là 168 giờ.

MIP-2 (CXCL2) và KC/GRO (CXCL1) là các chemokine hóa hướng động đối với bạch cầu hạt bao gồm bạch cầu trung tính. Hàm lượng MIP-2 và KC/GRO cũng được đánh giá trong cùng các mẫu này. Sau khi điều trị bằng Ab1 cùng với kháng-PD-1, hàm lượng MIP-2 trong khối u được thể hiện là tăng lên ít nhất là 4 lần ở các con vật được điều trị bằng Ab1 cùng với kháng-PD-1, so với hàm lượng ở các con vật được điều trị bằng một mình PBS hoặc kháng-PD-1; và sự tăng lên của hàm lượng MIP-2 được thể hiện là vẫn còn trong ít nhất là 168 giờ (HÌNH 10B). Tương tự, hàm lượng KC/GRO được thể hiện là tăng lên, dù ở các thời điểm muộn hơn là 72 và 168 giờ khi so với hàm lượng của MIP-2 (HÌNH 10C). Do đó, dạng kết hợp Ab1 và Mab kháng-PD-1 gây ra sự giảm đi của hàm lượng TGF- β 1 hoạt tính sớm hơn so với sự tăng lên của hàm lượng MIP-2 và KC/GRO. Kết quả này chứng tỏ rằng Ab1 có thể làm giảm hàm lượng, và ức chế, TGF- β ở trong vi môi trường khối u. Ngoài ra, sự tăng lên được quan sát thấy của hàm lượng MIP-2 và KC/GRO chỉ ra rằng chúng là cytokine bị ảnh hưởng bởi sự trung hòa của TGF- β và do đó có thể đóng vai trò làm các chỉ thị sinh học tiềm năng ở bệnh nhân được điều trị bằng Ab1.

Ví dụ 12: Sự Khôi Phục Của Sự Kết Cúm Tế Bào NK Bằng Cách Điều Trị Bằng Ab1

TGF- β được biết là ảnh hưởng đến hệ miễn dịch bằng cách ức chế hoạt tính của các loại tế bào miễn dịch khác nhau. TGF- β đã được báo cáo là ức chế hoạt tính tế bào giết tự nhiên (NK) và ADCC qua trung gian tế bào NK (Trotta *et al.*, Journal of immunology (2008) 181:3784-3792). Tế bào NK gần đây được báo cáo là tạo thành các cụm dày đặc là cơ chế để tăng cường hoạt tính và sự hoạt hóa của chúng thông qua sự định vị của IL-2 ở trong các cụm xếp dày đặc này (Kim *et al.*, Scientific Reports (2017) 7:40623). Tế bào NK người đã tinh chế được nuôi cấy *in vitro* trong sự có mặt của IL2 được thể hiện là tạo thành các cụm xếp dày đặc này.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hiệu quả của TGF- β khi không có mặt hoặc có mặt Ab1 trên "cụm" tế bào NK. Tế bào NK mới được phân lập từ máu của người cho khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính với chất phản ứng RosetteSep tế bào NK theo quy trình của nhà sản xuất (Stem Cell Technologies). Tế bào NK được nuôi cấy ở $1,2 \times 10^5$ tế bào/giếng trong IL-2 (100 IU/ml) có bổ sung Myelocult (Stem Cell Technologies) trong đĩa thử nghiệm đáy tròn (Costar). TGF- β 1 được bổ sung đến nồng độ cuối cùng bằng 0,1, 1 hoặc 10 ng/ml trong sự có mặt của IgG4 không liên quan hoặc Ab1 ở 100 μ g/ml, như được chỉ ra. Tế bào

được nuôi cấy trong thời gian 72 giờ và sự kết cụm tế bào NK được trực quan hóa bằng cách chụp ảnh trên kính hiển vi Nikon.

Việc bổ sung các liều lượng tăng dần của TGF- β 1 được thể hiện là ức chế sự kết cụm tế bào NK. Khi Ab1, chứ không phải là kháng thể đối chứng IgG4, được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào NK, các cụm tế bào NK được thể hiện là phát triển. Kết quả này chứng tỏ rằng sự trung hòa TGF- β ảnh hưởng đến sự hoạt hóa tế bào NK, dẫn đến hoạt tính và sự tăng sinh tăng lên của tế bào NK chứng tỏ đáp ứng kháng-khối u của hệ miễn dịch.

Ví dụ 13: Sự Đảo Ngược Của Sự Kìm Hãm Qua Trung Gian TGF- β Của Sự Sản Xuất IFN- γ Trong Tế Bào T CD8⁺ Tăng Sinh Bằng Cách Điều Trị Bằng Ab1

Ngoài hệ miễn dịch bẩm sinh, TGF- β đã được báo cáo là ức chế hoạt tính của tế bào T CD8⁺ (Flavell *et al.*, Nature Reviews Immunology (2010) 10:554-567). Để khám phá vai trò của TGF- β và Ab1 trên hoạt tính tế bào T CD8⁺, hệ thử nghiệm MLR (phản ứng tế bào lympho hỗn hợp) được thiết lập trong đó tế bào CD3⁺ người đã được tinh chế được trộn với tế bào BLCL. Sự tăng sinh tế bào CD8⁺ và sự sản xuất IFN- γ được đánh giá trước tiên trong sự có mặt của TGF- β . Cụ thể là, tế bào CD3⁺ được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit làm giàu Tế Bào T EasySep (StemCell Technologies) từ PBMC được tách phân đoạn từ người cho khỏe mạnh bình thường sau khi phân lập gradien Ficoll. Sau đó tế bào CD3⁺ được gắn nhãn bằng CellTrace Violet theo quy trình của nhà sản xuất (ThermoFisher). Thử nghiệm MLR được thực hiện bằng cách trộn tế bào CD3⁺ đã được gắn nhãn (2×10^5 tế bào) với tế bào BLCL đã được chiếu xạ (Astarte Bio) (2×10^4 tế bào; 2 phút) trong RPMI có bổ sung FBS 10%. TGF- β 1, kháng thể đối chứng IgG4 và/hoặc Ab1 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, như được chỉ ra, và môi trường nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 37°C với CO₂ 5% trong thời gian 4 ngày. Tiếp theo tế bào được kích thích trong thời gian 4 giờ trong sự có mặt của hỗn hợp kích thích tế bào PMA (eBioscience) và hỗn hợp chất ức chế vận chuyển protein (eBioscience). Tế bào sống được phân biệt bằng cách nhuộm màu bằng thuốc nhuộm khả năng sống sót Zombie NIR (BioLegend) trên nước đá và rửa bằng chất đệm FACS. Tế bào được cố định bằng chất đệm True-Nuclear (BioLegend), rửa, tạo viên và tái tạo huyền phù trong chất đệm FACS. Tế bào được điều chế để đếm tế bào theo dòng bằng cách nhuộm màu bằng BV650 kháng-huCD4, PERCP/Cy5.5 kháng-huCD8, FITC kháng-huCD3, và PE kháng-huIFN γ (BioLegend). Đếm Tế Bào Theo Dòng được chạy trên BD Canto và kết quả được phân tích trong phần mềm FlowJo và tạo cổng trên tế bào sống, mức đơn, và tế bào CD3⁺. Tỷ lệ phần

trăm của tế bào T $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ được định lượng bằng cách tạo cổng trên tế bào CD8^+ mà đã tăng sinh dựa trên sự bắt màu CellTrace Violet đã giảm bớt và dương tính đối với sự bắt màu $\text{IFN-}\gamma$. FMO được chạy làm đối chứng đối với tất cả các nhuộm màu kháng thể.

Sự bao gồm của $\text{TGF-}\beta$ trong thử nghiệm MLR được thể hiện là làm giảm tỉ lệ phần trăm của tế bào T CD8^+ mà dương tính đối với $\text{IFN-}\gamma$ đi xấp xỉ 4 lần (HÌNH 11A). Sự bao gồm của Ab1 hoặc Ab đối chứng không có hiệu quả trên sự phát triển của các tế bào CD8^+ tăng sinh $\text{IFN}\gamma^+$ khi không có mặt $\text{TGF-}\beta$ (HÌNH 11B). Tuy nhiên, sự bao gồm của Ab1, chứ không phải là kháng thể đối chứng, có thể khôi phục sự tăng sinh của tế bào $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ theo phương thức phụ thuộc liều lượng. Kết quả này chứng tỏ rằng sự trung hòa $\text{TGF-}\beta$ có thể ảnh hưởng đến hệ miễn dịch tập nhiễm bằng cách phong bế tác dụng kìm hãm miễn dịch của $\text{TGF-}\beta$ lên sự tăng sinh của tế bào CD8^+ tác động mà biểu hiện $\text{IFN-}\gamma$. Tế bào T $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+$ được gợi ý là đóng vai trò quan trọng trong sự miễn dịch kháng-khối u (Ikeda *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev (2002) 13:95-109).

Ví dụ 14: Đáp Ứng Của Mô Hình Chuột Nhất Đồng Sinh Với Liệu Pháp Kháng- $\text{TGF-}\beta$

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu mô hình chuột nhất đồng sinh nào có thể được sử dụng để dự đoán đáp ứng đối với việc điều trị bằng kháng thể kháng- $\text{TGF-}\beta$ Ab1 và kháng-PD-1. Để phân tầng các mô hình chuột nhất, chúng tôi đánh giá sự thâm nhiễm tế bào T CD8^+ vào trong khối u trong các con chuột nhất và sự hoạt hóa con đường $\text{TGF-}\beta$. Sự thâm nhiễm tế bào T CD8^+ được thử nghiệm dựa trên chữ ký tế bào T CD8^+ từ dữ liệu thu được từ RNASeq. Mười bảy mô hình đồng sinh chuột nhất riêng biệt có tế bào khối u sinh ra từ một vài chỉ thị (như được thể hiện dưới trục x trên HÌNH 12A và HÌNH 12B) được lập biên dạng phiên mã bằng cách sử dụng hệ phiên mã hoàn chỉnh RNAseq. "Tập hợp" này của các mô hình đồng sinh được xây dựng trên chủng nền tảng phổ biến C57/BL6, với từ 5 đến 7 bản sao sinh học được sử dụng cho mỗi mô hình. Sau khi xác định trình tự Illumina 2000, biên dạng biểu hiện gen được biểu diễn trong các bản phiên mã cho mỗi triệu (TPM) được tạo ra bằng cách xử lý tiêu chuẩn kết quả đọc trình tự thô, bằng cách sử dụng bộ sắp xếp thẳng hàng STAR và bộ ước tính độ nhiều bản phiên mã Cufflinks. Ma trận dữ liệu nhiều mẫu thu được cuối cùng được chuẩn hóa điểm phân vị.

HÌNH 12A thể hiện độ nhiều tương đối của tế bào T CD8^+ (được biến đổi $\log_2$) trong tập hợp. Độ nhiều tế bào T CD8^+ tương đối được ước tính bằng cách sử dụng gen đánh dấu

độc nhất CD8B, mà đã được chứng minh là chỉ thị đặc hiệu cao của sự có mặt của tế bào T CD8 (Becht *et al.*, Curr Opin Immunol (2016) 39:7-13; và Becht *et al.*, Genome Biol (2016) 17:218). Mỗi biểu đồ hộp tóm tắt khoảng của các giá trị trong các bản sao sinh học. Mô hình MC38 cho thấy sự thâm nhiễm tế bào T CD8⁺ lớn hơn khoảng 2 lần so với mô hình EMT6 (lần lượt là hộp bên trái và hộp bên phải). Các mô hình u lympho A20 và EL4 lần lượt thể hiện hàm lượng cao nhất và thấp nhất nói chung của sự thâm nhiễm tế bào T CD8⁺, với tế bào T CD8⁺ không đáng kể trong EL4.

Các dòng tế bào chuột nhất MC38, MC38.ova, CT26, và L1210 thể hiện hàm lượng cao nhất của chữ ký gen CD8. Ngoài ra, dòng tế bào ung thư vú EMT-6 được thể hiện là có sự thâm nhiễm tế bào T gần với đường cơ sở, mà thống nhất với các báo cáo gần đây rằng khối u EMT6 có kiểu hình miễn trừ miễn dịch (S. Mariathasan et al. 2017, ESMO Immunology Congress, Geneva, Geneva Switzerland).

HÌNH 12B thể hiện sự hoạt hóa con đường TGF- β trong tập hợp. Chữ ký phiên mã 170 gen của sự hoạt hóa con đường TGF β , có nguồn gốc từ sự kích thích *in vitro* của tế bào MCF7 bằng TGF- β và được xác nhận bằng cách so sánh với một vài chữ ký TGF- β khác, được sử dụng để ấn định điểm hoạt hóa con đường cho mỗi biên dạng trong tập hợp. Điểm được tính bằng cách sử dụng "phân tích làm giàu tập hợp gen được điều chỉnh" (rGSEA, Theilhaber et al. 2014), và được biểu diễn dưới dạng sự làm giàu log2 của các gen chữ ký so với nền gen. Mặc dù mô hình MC38 thể hiện sự hoạt hóa trung bình, mô hình EMT6 thể hiện sự hoạt hóa con đường TGF- β rất cao (lần lượt là hộp bên trái và hộp bên phải).

Ví dụ 15: Tác Dụng Của Dạng Kết Hợp Ab1 và Kháng Thể Kháng-PD1 Lên Mô Hình Ung Thư Vú Chuột Nhất

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu tác dụng trị liệu của Ab1 có hoặc không có kháng-PD-1. Tế bào vú EMT-6 phát triển theo hàm mũ (CRL-2755, ATCC) được nuôi cấy trong RPMI-1640 có bổ sung FBS 10% trong thiết bị ủ CO₂ 5% đã được làm ấm và sau đó được cấy dưới da ($0,5 \times 10^6$ tế bào/con chuột nhất) vào sườn của các con chuột nhất BALB/c cái (Shanghai Lingchang Bio-Technology Co. Ltd, Shanghai, Trung Quốc). Ngay khi khối u đạt kích thước trung bình bằng $68-116 \text{ mm}^3$, các con chuột nhất được gom lại và được phân ngẫu nhiên vào nhóm đối chứng và nhóm điều trị (10 con chuột nhất cho mỗi nhóm). Sau đó các con chuột nhất mang khối u được điều trị trong màng bụng bằng PBS, Ab1 (10 và 25mg/kg) ba lần cho mỗi tuần đối với mỗi con vật đối với tổng số 6 liều lượng. Khối u được

đo bằng thước kẹp số 2 lần cho mỗi tuần và thể tích khối u được tính ($\text{mm}^3 = L \times W \times H$) và được vẽ biểu đồ bằng cách sử dụng GraphPad Prism. Các con chuột nhất bị giết chết êm ái bằng CO_2 khi kết thúc nghiên cứu, nếu khối u phát triển đến $>3000\text{mm}^3$ hoặc nếu khối u thể hiện sự loét $> 20\%$ bề mặt khối u.

Dưới dạng các chất đơn lẻ, Ab1 ở liều lượng bằng 10 hoặc 25 mg/kg Q3D và kháng thể $\alpha\text{-PD-1}$ chuột nhất ở liều lượng bằng 5 mg/kg chứng tỏ hoạt tính một phần lần lượt với 1/10, 2/10 và 2/10 thoái biến khối u hoàn toàn, ở các con chuột nhất mang khối u EMT-6. Dạng kết hợp của Ab1 ở liều lượng bằng 10 hoặc 25 mg/kg Q3D và kháng thể $\alpha\text{-PD-1}$ chuột nhất ở 5 mg/kg Q3D có hoạt tính trị liệu. Vào ngày 31 sau khi cấy, khi so sánh sự thay đổi thể tích khối u từ đường cơ sở, hiệu quả của dạng kết hợp của Ab1 ở tất cả các liều lượng được thử nghiệm với kháng thể $\alpha\text{-PD-1}$ chuột nhất ở 5 mg/kg Q3D lớn hơn so với tác dụng của mỗi chất đơn lẻ với 7/10 và 4/10 thoái biến khối u hoàn toàn lần lượt đối với 10, và 25 mg/kg của Ab1. Bảng 10 là bản tóm tắt kết quả.

Bảng 10 Tác Dụng Của Dạng Kết Hợp Ab1/ Kháng-mPD-1 Lên Mô Hình Chuột Nhất EMT-6

Nhóm	Điều Trị	Tổng Số Lượng Chuột Nhất	Số Lượng Của Đáp Ứng Hoàn Toàn (Tỷ Lệ Đáp Ứng Hoàn Toàn)
1.	PBS	10	0 (0%)
2.	5 mg/kg Mab x- kháng-mPD-1	10	2 (20%)
3.	10 mg/kg Ab1	10	1 (10%)
4.	25 mg/kg Ab1	10	2 (20%)
5.	10 mg/kg Ab1	10	7 (70%)

Nhóm	Điều Trị	Tổng Số Lượng Chuột Nhất	Số Lượng Của Đáp Ứng Hoàn Toàn (Tỷ Lệ Đáp Ứng Hoàn Toàn)
	+		
	5 mg/kg Mab x- kháng-mPD-1		
6.	25 mg/kg Ab1	10	4 (40%)
	+		
	5 mg/kg Mab x- kháng-mPD-1		

Trừ khi được xác định theo cách khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Phương pháp và nguyên liệu ví dụ được mô tả ở đây, mặc dù phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm của sáng chế. Tất cả các tài liệu công bố và các tài liệu tham khảo khác được viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo đến toàn bộ nội dung của chúng. Trong trường hợp có mâu thuẫn, bản mô tả này, bao gồm các định nghĩa, sẽ được áp dụng. Mặc dù một số lượng các tài liệu được viện dẫn trong bản mô tả này, việc viện dẫn này không tạo thành sự công nhận rằng bất kỳ tài liệu nào trong số các tài liệu này tạo thành một phần của hiểu biết chung thông thường trong lĩnh vực. Ngoài ra, trừ khi ngữ cảnh đòi hỏi có nghĩa khác, các thuật ngữ số ít bao gồm nghĩa số nhiều và các thuật ngữ số nhiều bao gồm nghĩa số ít. Nhìn chung, danh pháp được sử dụng liên quan đến và các kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh học, di truyền học, hóa học phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, y học và hóa dược phẩm, và hóa học protein và axit nucleic và sự lai hóa được mô tả trong bản mô tả này là các danh pháp đã được biết rõ và thường dùng trong lĩnh vực. Các phản ứng enzym và

kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo các thông số kỹ thuật của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực hoặc như được mô tả ở đây. Trong toàn bộ bản mô tả này và các phương án, các từ "có" và "có chứa," hoặc các biến thể chẳng hạn như "gồm," hoặc "gồm có," được hiểu là để chỉ sự bao gồm của số nguyên hoặc nhóm của các số nguyên được chỉ ra nhưng không loại trừ số nguyên hoặc nhóm của các số nguyên khác bất kỳ.

Các trình tự được mô tả trong bản mô tả này được liệt kê dưới đây.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

SEQ ID NO:1 (chuỗi nặng Ab1)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA
PGQGLEWMGG VIPIVDIANY

AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW
GQGTLVTVSS

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS

GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
APEFLGGPSV

FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTY

RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK

NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL
TVDKSRWQEG

NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

SEQ ID NO:2 (chuỗi nhẹ Ab1)

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRAPGIP

DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG QGTRLEIKRT
VAAPSVFIFP

PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK
DSTYLSSTL

TLISKADYEKH KUYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC

SEQ ID NO:3 (chuỗi nặng fresolimumab, bao gồm trình tự dẫn đầu – các gốc 1-19)

MGWSCILFL VATATGVHSQ VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGYTFSS
 NVISWVRQAP GQGLEWMGGV IPIVDIANYA QRFKGRVTIT ADESTSTTYM
 ELSSLRSED AVYYCASTLG

LVLDAMDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGKTKY
 TCNVDHKPSN TKVDKRVESK

YGPPCPSCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP
 EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNNKGLPSS IEKTISKAKG

QPREPQVYTL PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 KTTTPVLDSG GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 SLSLGK

SEQ ID NO:4 (chuỗi nhẹ fresolimumab, bao gồm trình tự dẫn đầu – các gốc 1-19)

MGWSCILFL VATATGVHSE TVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSLGS
 SYLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASSRAPGIPD RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
 EDFAVYYCQQ YADSPITFGQ

GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO:5 (chuỗi nặng Mab kháng-PD-1)

EVQLLESQGV LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG
 ISGGGRDTYF ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYCVKKG
 NIYFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGKTKYTC
 NVDHKPSNTK VDKRVESEKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS
 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

SEQ ID NO:6 (chuỗi nhẹ Mab kháng-PD-1)

DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWFYQQKPK GKAPNLLIYA
 ASSLHGGVPS RFSGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP
 GTVVDLFRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO:7 (chuỗi nặng Mab x-kháng-mPD-1)

EVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGYSIT SSYRWNWIRK FPGNRLEWMG
 YINSAGISNY NPSLKRRISI TRDTSKNQFF LQVNSVTTED AATYYCARSD
 NMGTTPFTYW GQGTLVTVSS AKTTPPSVYP LAPGSAAQTN SMVTLGCLVK
 GYFPEPVTVT WNSGSLSSGV HTFPAVLQSD LYTLSSSVTV PSSTWPSQTV
 TCNVAHPASS TKVDKKIVPR DCGCKPCICT VPEVSSVFIF PPKPKDVLTI
 TLTPKVTCTV VDISKDDPEV QFSWFVDDVE VHTAQTQPRE EQFNSTFRSV
 SELPMHQDW LNGKEFKCRV NSAAFPAPIE KTISKTKGRP KAPQVYTIPP
 PKEQMAKDKV SLTCMITDFE PEDITVEWQW NGQPAENYKN TQPMIDTDGS
 YFVYSKLVNQQ KSNWEAGNTF TCSVLHEGLH NHHTEKSLSH SPG

SEQ ID NO:8 (chuỗi nhẹ Mab x-kháng-mPD-1)

DIVMTQGTLN NPVPSGESVS ITCRSSKSL YSDGKTYLNV YLQRPQGSPQ
 LLIYWMSTRA SGVSDRFSGS GSGTDFTLKI SGVEAEDVGI YYCQQGLEFP
 TFGGGTKLEL KRADAAPTQS IFPPSTEQLA TGGASVVCLM NNFYPRDISV
 KWKIDGTERR DGVLDSTVDQ DSKDSTYSMS STLSLTKADY ESHNLYTCEV
 VHKTSSSPVV KSFNRNEC

SEQ ID NO:9 (chuỗi nặng 1D11)

HVQLQQSGPE LVRPGASVKL SCKASGYIFI TYWMNWKQR PGQGLEWIGQ
 IFPASGSTNY NEMFEGKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARGD
 GNYALDAMDY WGQGTSVTVS

SAKTPPSVY PLAPGSAAQT NSMVTLGCLV KGYFPEPVTV TWNSGSLSSG
 VHTFPAVLQS

DLYTLSSSVT VPSSTWPSQT VTCNVAHPAS STKVDKKIVP RDCGCKPCIC
 TVPEVSSVFI

FPPKPKDVLT ITLTPKVTCV VVDISKDDPE VQFSWFVDDV EVHTAQTKPR
EEQFNSTFRS

VSELPIMHQD WLNGKEFKCR VNSAAFPAPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP
PPKEQMAKDK

VSLTCMITDF FPEDITVEWQ WNGQPAENYK NTQPIMDTDG SYFVYSKLVN
QKSNWEAGNT

FTCSVLHEGL HNHHTEKSL S HSPGK

SEQ ID NO:10 (chuỗi nhe 1D11)

NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGNSFMHWY QKSGQPPKL
LIYLASNLES

GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPL TFGAGTKLEL
KRADAAPTVS

IFPPSSEQLT SGGASVVCFL NNFYPKDINV KWKIDGSERQ NGVLNSWTDQ
DSKDSTYSMS

STLTLTKDEY ERHNSYTCEA THKTSTSPIV KSFNRNEC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập mà liên kết đặc hiệu với TGF- β 1, TGF- β 2, và TGF- β 3 người, có chứa các vùng xác định tính bổ sung chuỗi nặng (CDR) 1-3 trong SEQ ID NO:1 và CDR1-3 chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO:2, trong đó kháng thể này có chứa vùng không đổi IgG₄ người có prolin ở vị trí 228 (đánh số EU).
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có chứa trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) tương ứng với các gốc 1-120 của SEQ ID NO:1 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) tương ứng với các gốc 1-108 của SEQ ID NO:2.
3. Chế phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 1, trong đó chế phẩm bao gồm nhỏ hơn 1% kháng thể nữa.
4. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.
5. Kháng thể đơn dòng được phân lập, trong đó các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt bao gồm các SEQ ID NO:1 và 2.
6. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 5 và chất mang dược dụng.
7. Kháng thể đơn dòng được phân lập, trong đó các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt là các SEQ ID NO:1 và 2.
8. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 7 và chất mang dược dụng.
9. Sản phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 7 và tác nhân trị liệu khác.
10. Sản phẩm theo điểm 9, trong đó tác nhân trị liệu khác là kháng thể kháng-PD-1 hoặc kháng-PD-L1.

11. Sản phẩm theo điểm 9, trong đó tác nhân trị liệu khác là kháng thể kháng PD-1 bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng trong SEQ ID NO:5 và CDR1-3 chuỗi nhẹ trong SEQ ID NO:6.

12. Sản phẩm theo điểm 11, trong đó kháng thể kháng PD-1 bao gồm trình tự axit amin VH tương ứng với các gốc 1-117 của SEQ ID NO:5 và trình tự axit amin VL tương ứng với các gốc 1-107 của SEQ ID NO:6.

13. Sản phẩm theo điểm 12, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD-1 lần lượt bao gồm các SEQ ID NO:5 và 6.

<110> SANOFI

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP GỒM MIỀN FC CỦA IGG1 Ở NGƯỜI VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 022548.W0011

<140>

<141>

<150> EP 17305061.8

<151> 2017-01-20

<150> 62/448,800

<151> 2017-01-20

<160> 10

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 1

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

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

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

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

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 2

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser

20

25

30

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

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

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

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

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 3

<211> 466

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

180

185

190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 4
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 4
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
 20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp
 65 70 75 80

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

38201

85

90

95

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala
100 105 110

Asp Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 5

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 5

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe 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 Lys Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

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

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

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225		230		235		240									
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
			245					250					255		
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe
		260						265					270		
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
		275						280					285		
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
	290					295					300				
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
305					310					315					320
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
			325						330					335	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln
		340						345					350		
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
		355				360						365			
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
	370					375						380			
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
385					390					395					400
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu
				405				410						415	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
		420						425					430		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys				
		435						440							

<210> 6
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 6
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

38201

165

170

175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 443

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 7

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Asn Ser Ala Gly Ile Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Asp Asn Met Gly Thr Thr Pro Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140

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

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

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

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 210 215 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr

325

330

335

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

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 435 440

<210> 8

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 8

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

Glu Ser Val Ser Ile Thr Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
85 90 95

Leu Glu Phe Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

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

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

Pro Arg Asp Ile Ser Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Arg Arg
145 150 155 160

Asp Gly Val Leu Asp Ser Val Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

His Asn Leu Tyr Thr Cys Glu Val Val His Lys Thr Ser Ser Ser Pro
195 200 205

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

<210> 9

<211> 445

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 9

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

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

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140

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

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

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

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

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

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn

420

425

430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
145 150 155 160

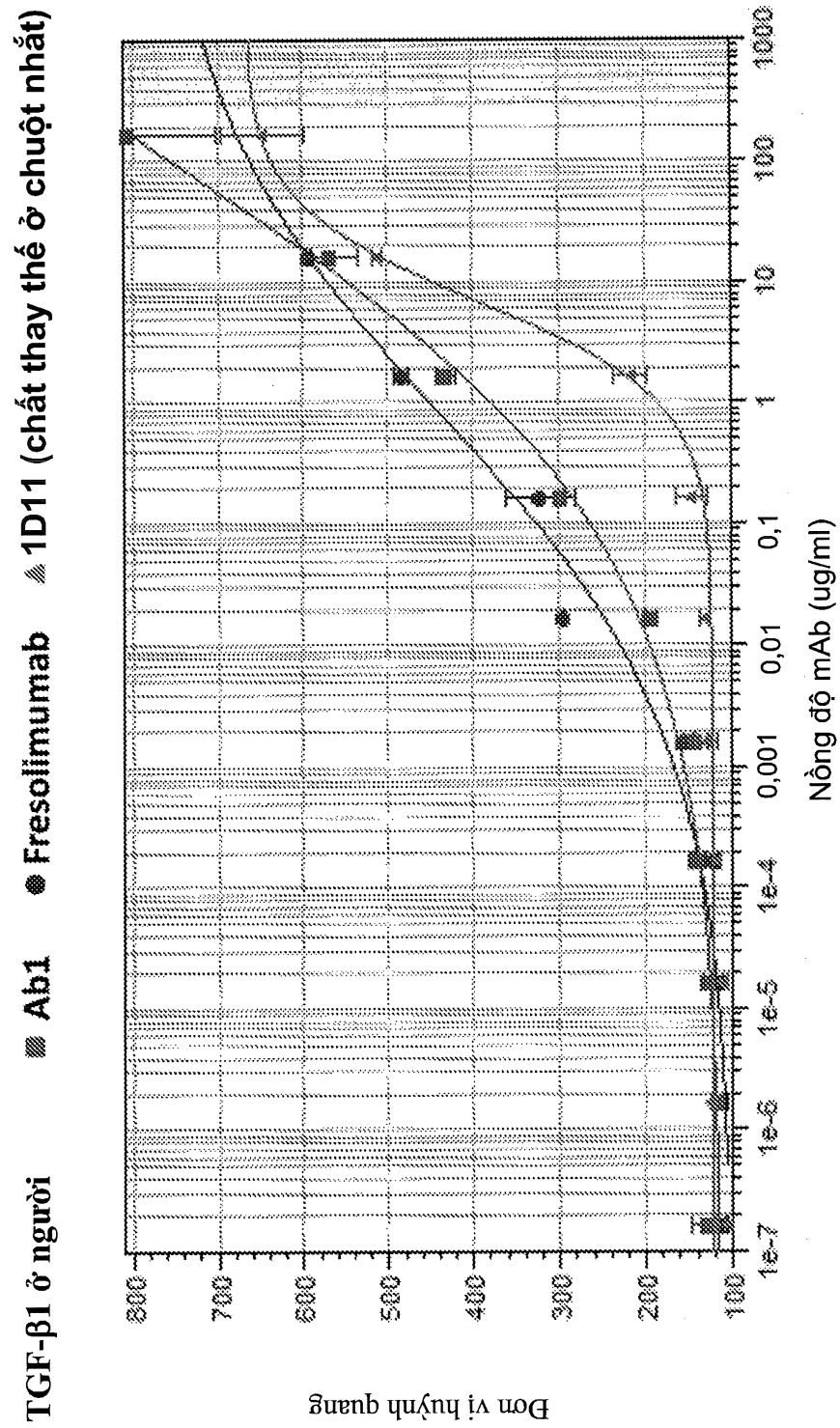
Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
180 185 190

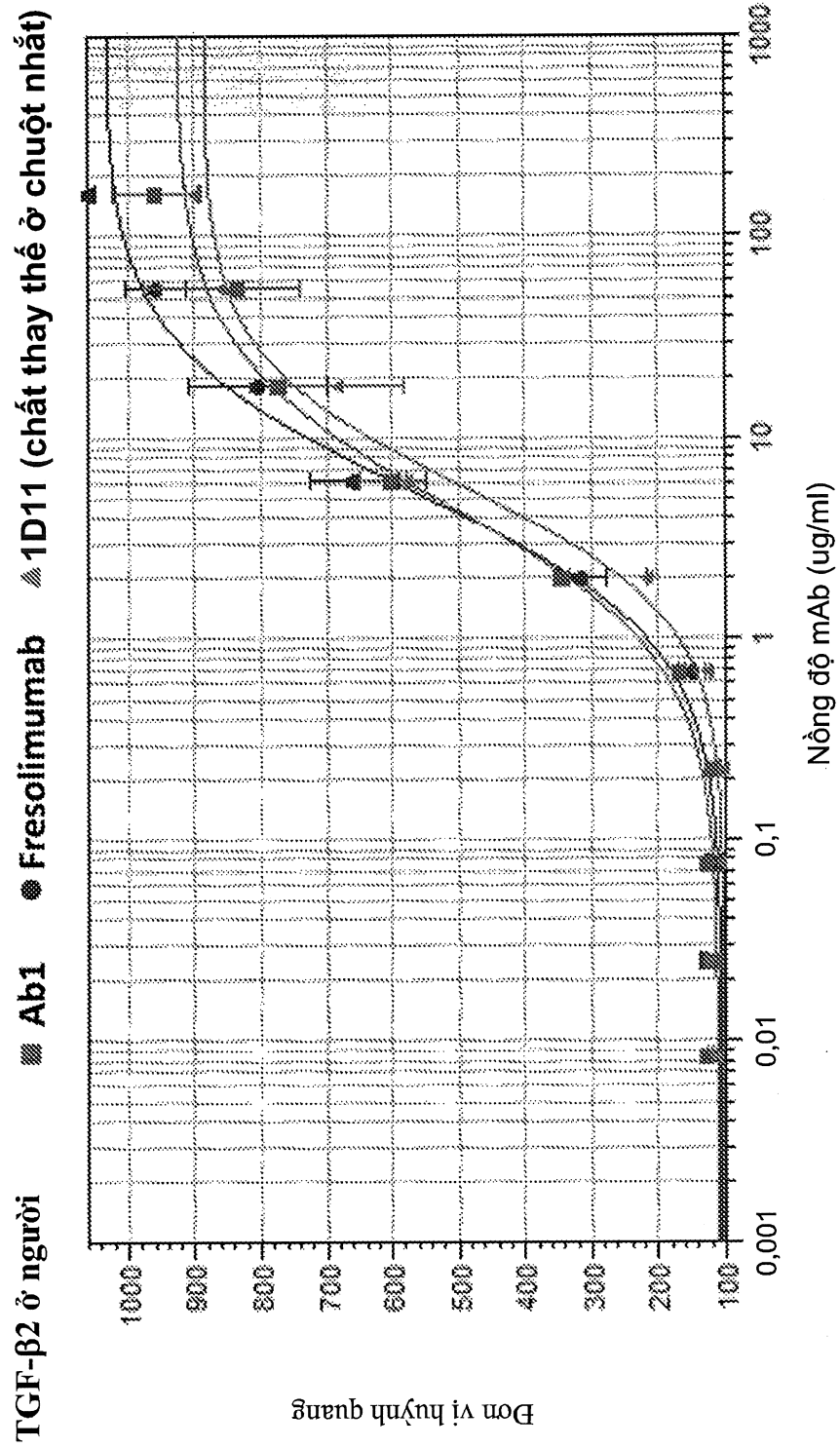
His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

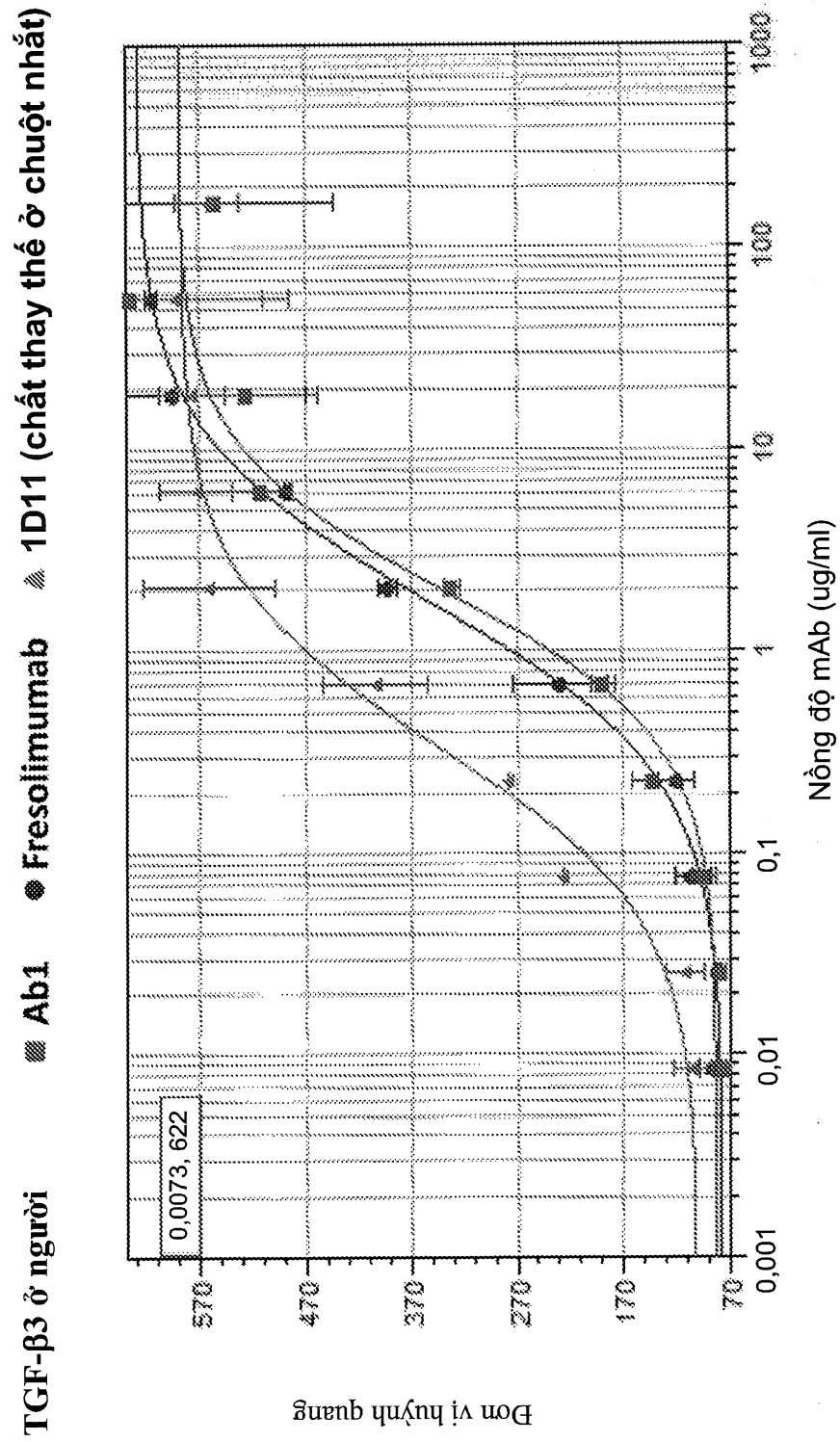
HÌNH 1A



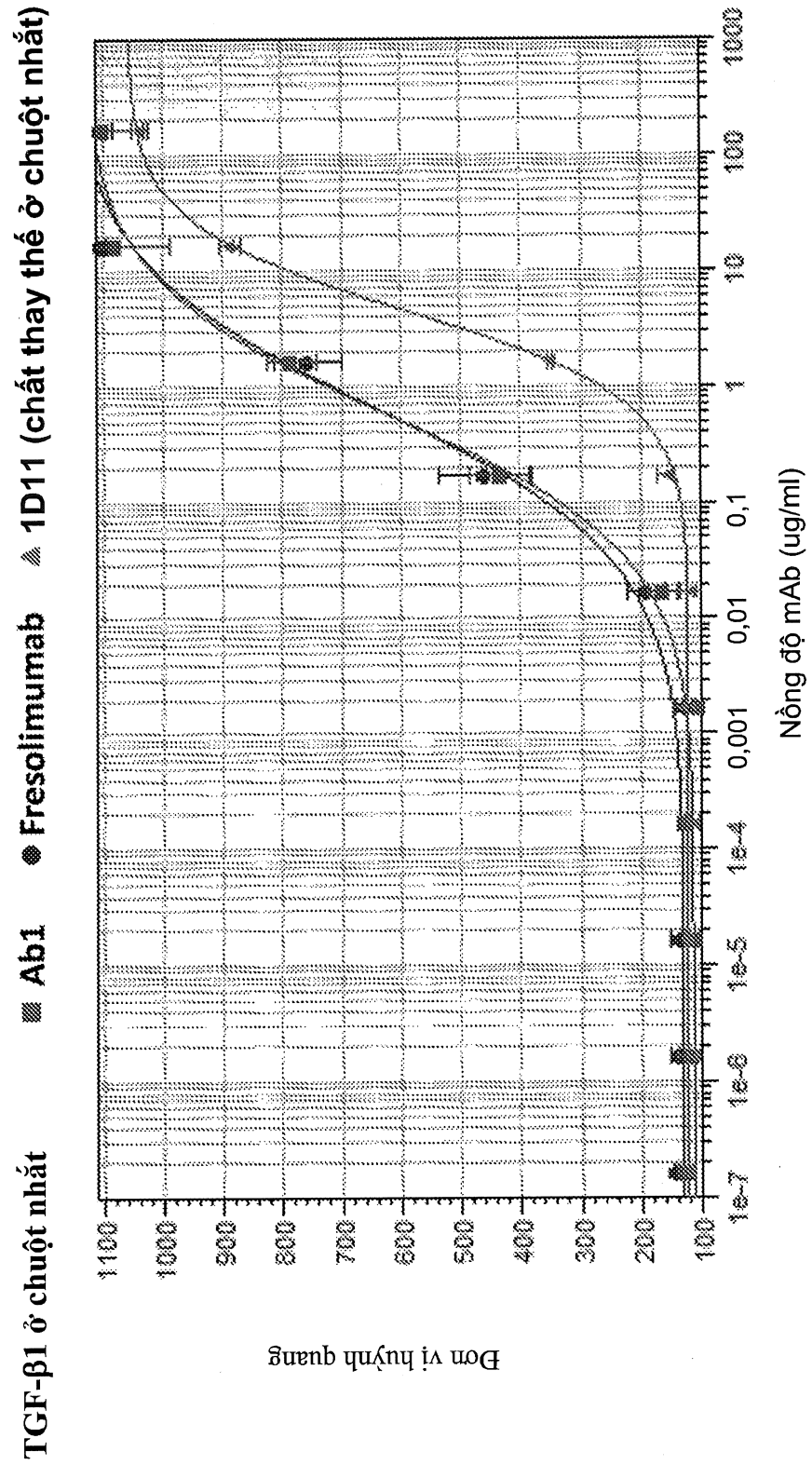
HÌNH 1B



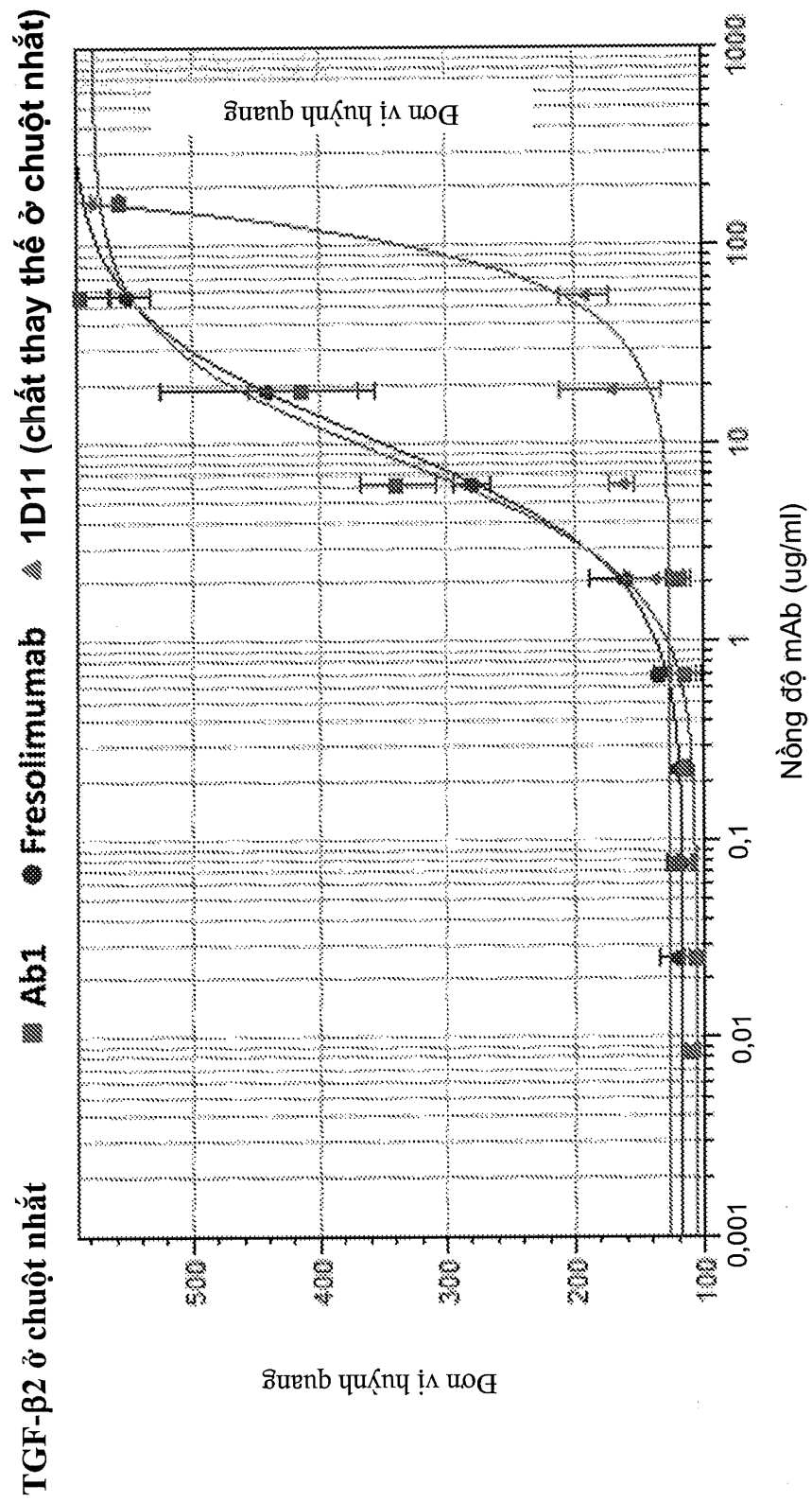
HÌNH 1C



HÌNH 1D



HÌNH 1E

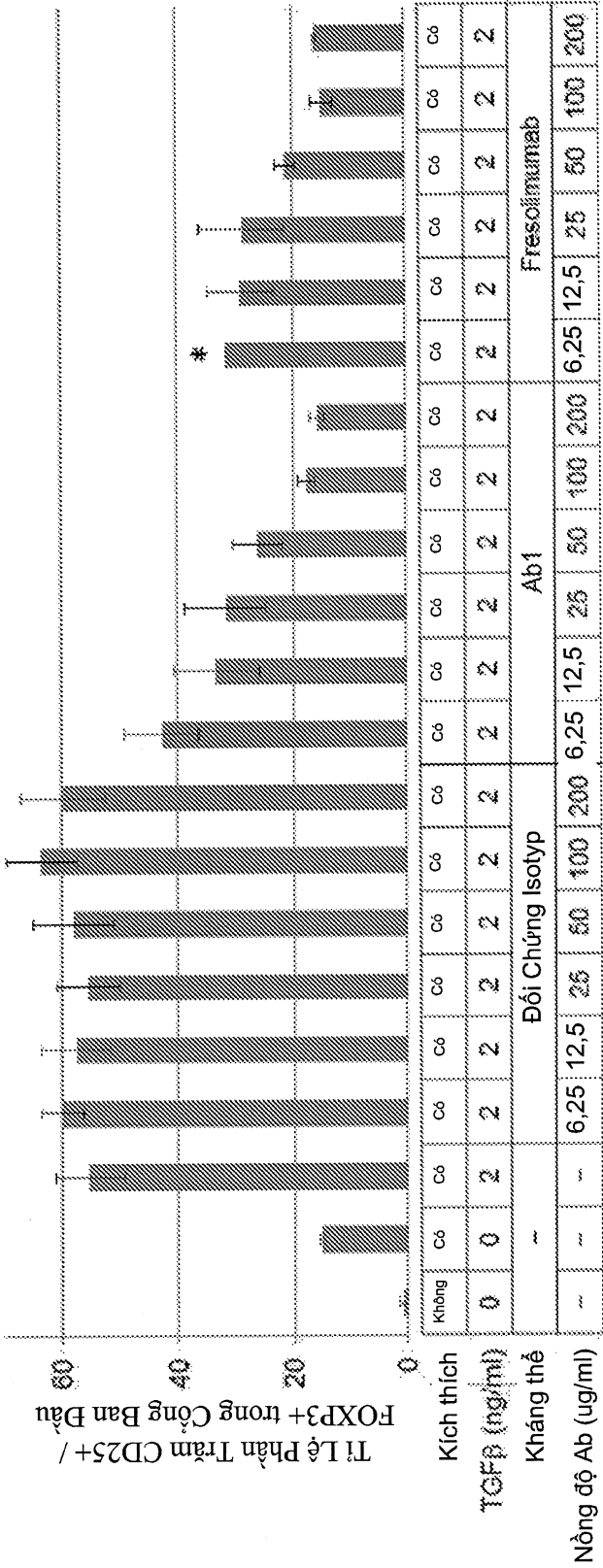


Đơn vị huỳnh quang

Nồng độ mAb (ug/ml)

HÌNH 3

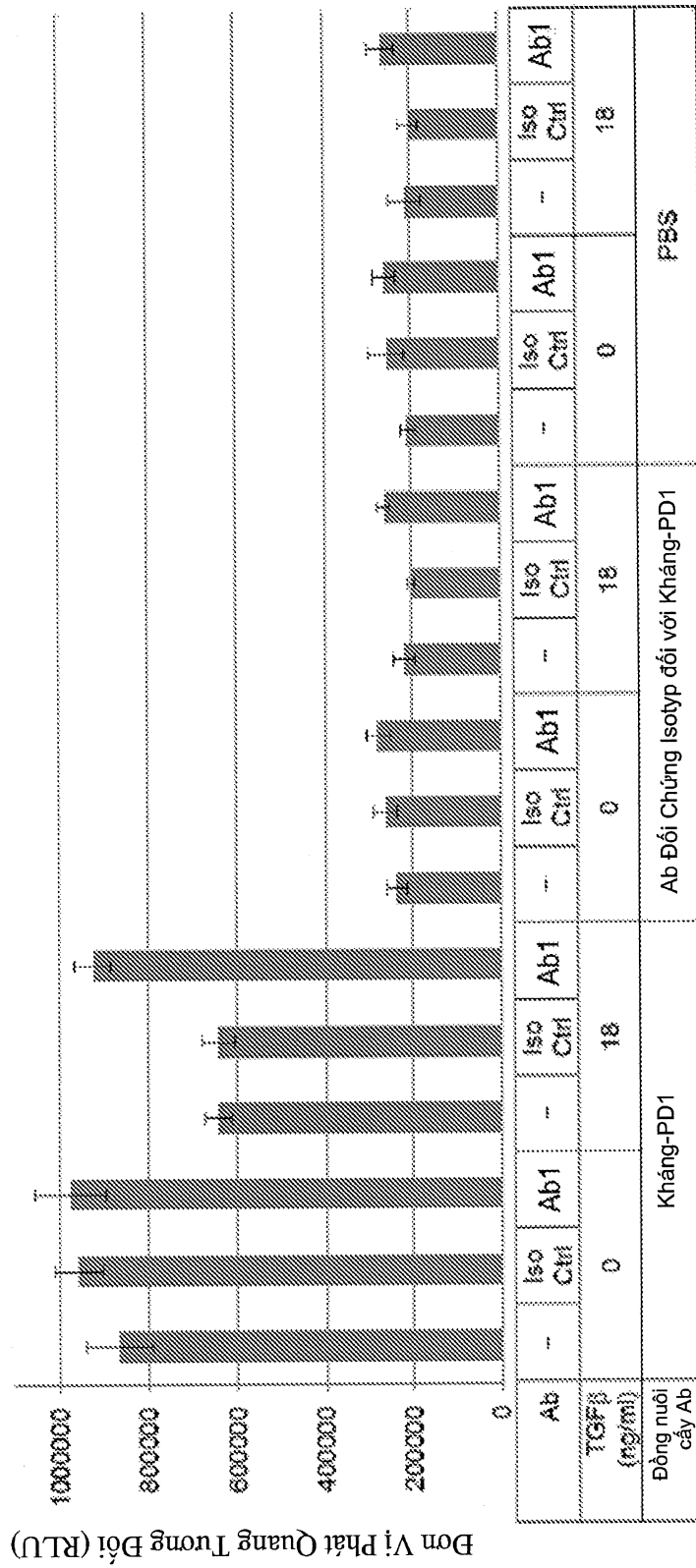
Tác dụng của Ab1 lên sự biệt hóa tế bào T điều hòa của người trong môi trường nuôi cấy được xử lý bằng 2 ng/ml TGF-β1



Chữ viết tắt: Ab Conc: nồng độ kháng thể
*, mẫu đơn lẻ

HÌNH 4

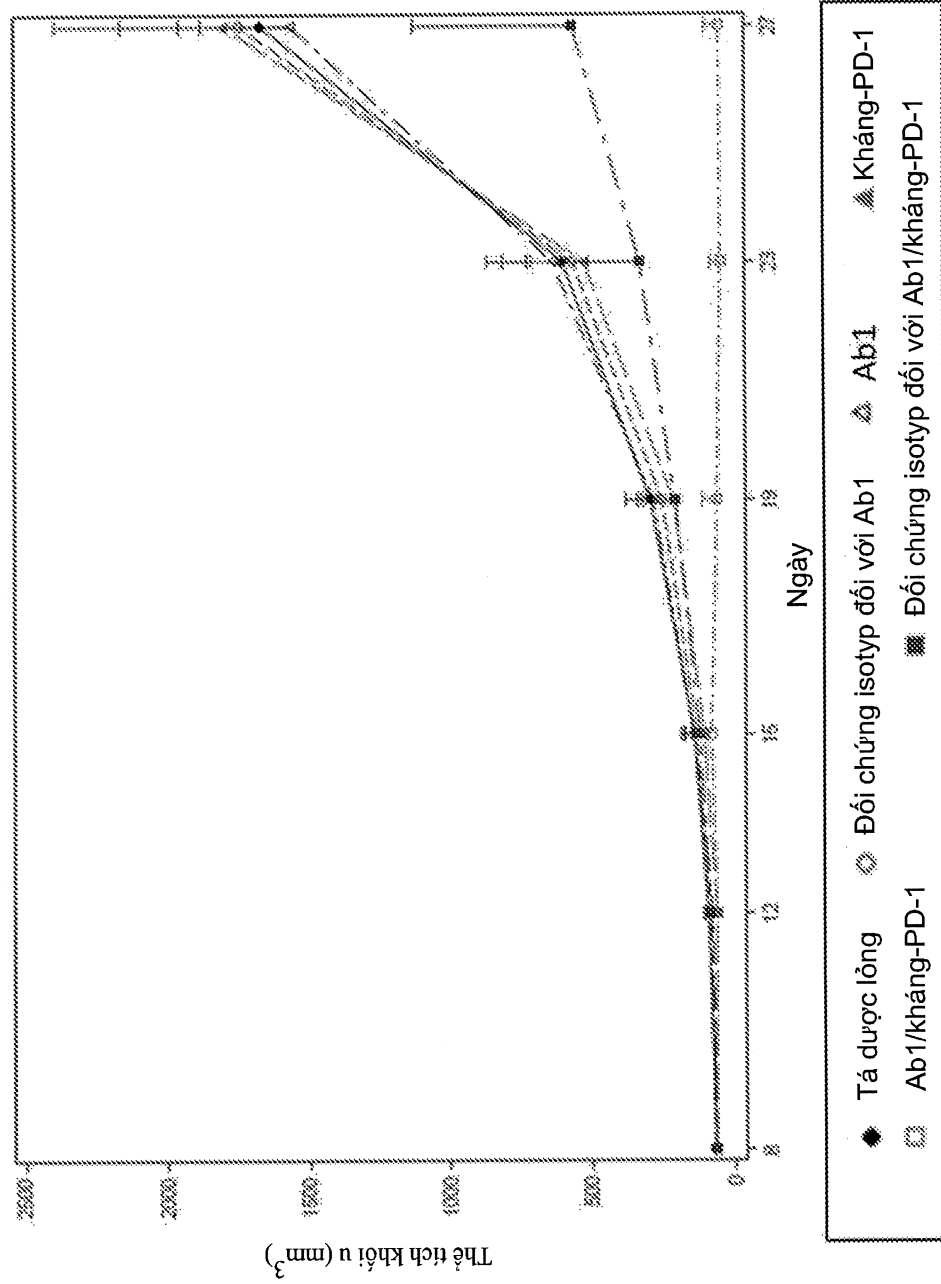
Tác dụng của Ab1 (30 $\mu\text{g/ml}$) và TGF- β 1 (18 ng/ml) lên sự biểu hiện luxiferaza được điều khiển bởi NFATc trên tế bào T Jurkat sau khi kích thích tế bào T và xử lý bằng kháng-PD-1



Chữ viết tắt: Ab: Kháng thể, Iso Ctrl: Ab đối chứng isotyp

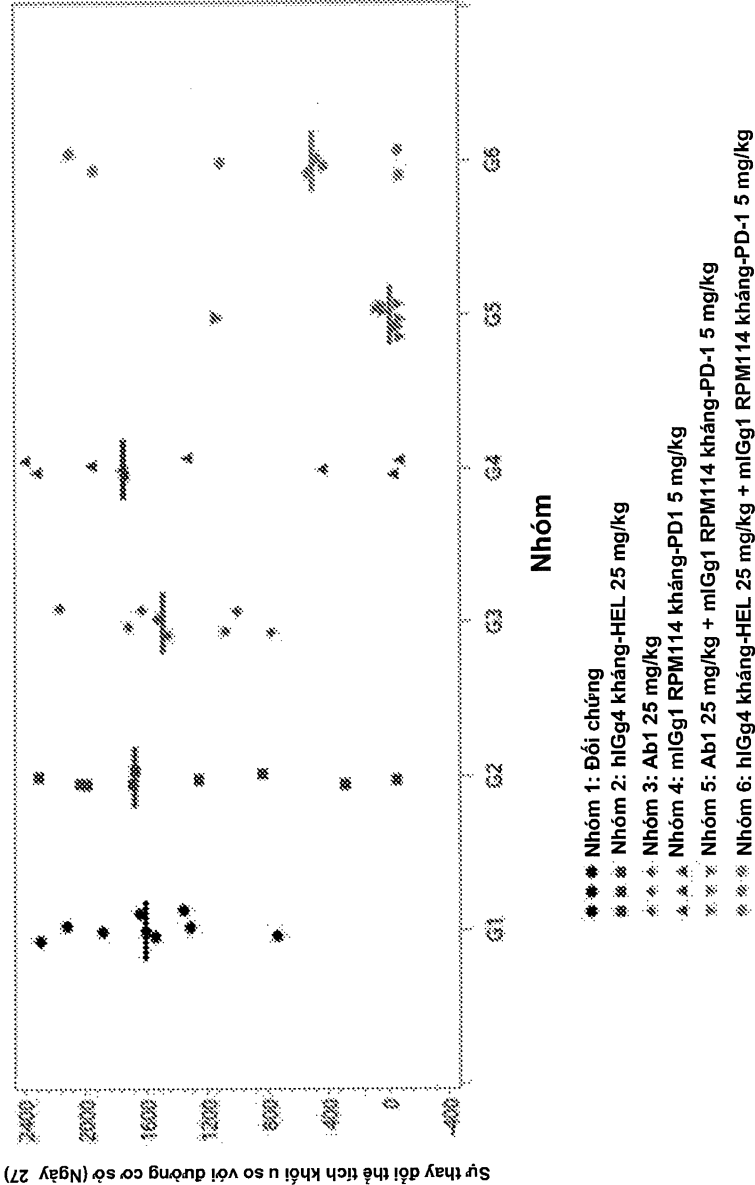
HÌNH 5

Thể tích khối u (mm^3) bởi nhóm điều trị - trung vị và MAD

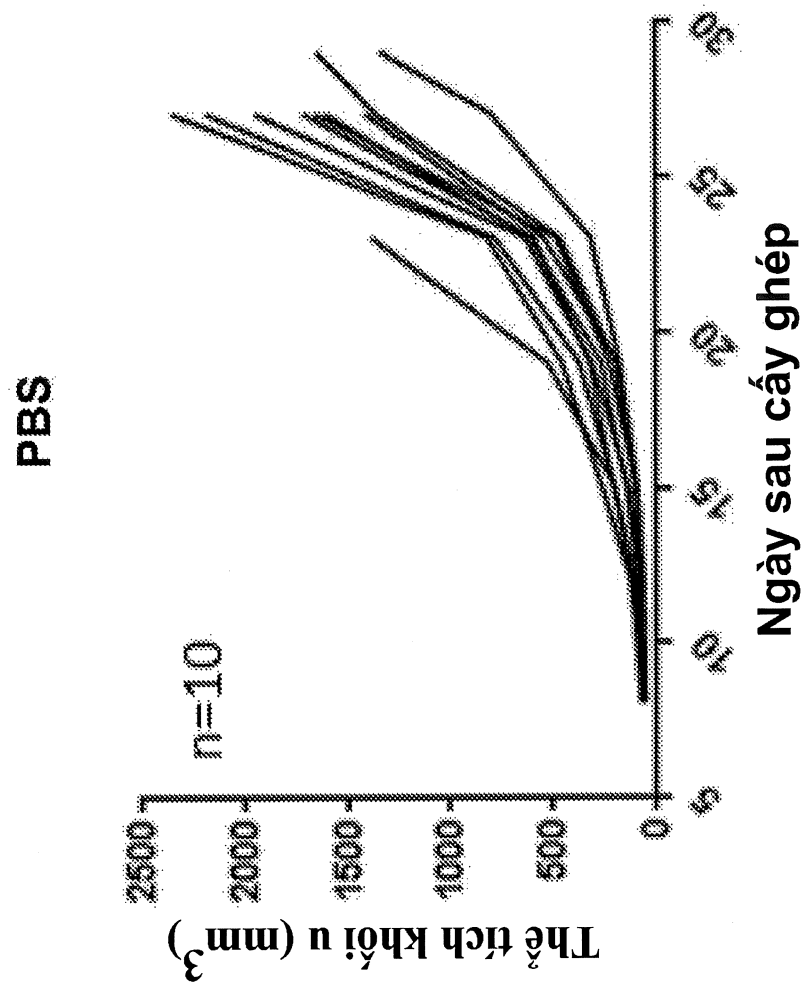


HÌNH 6

Sự thay đổi thể tích khối u so với đường cơ sở vào ngày 27

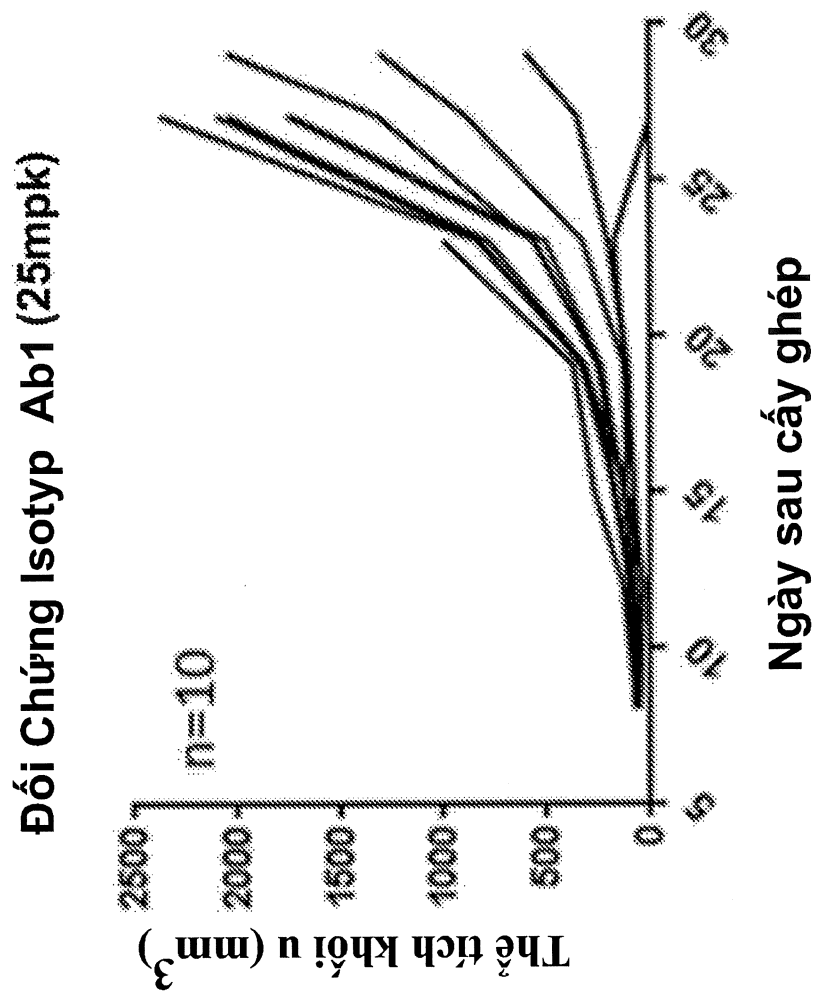


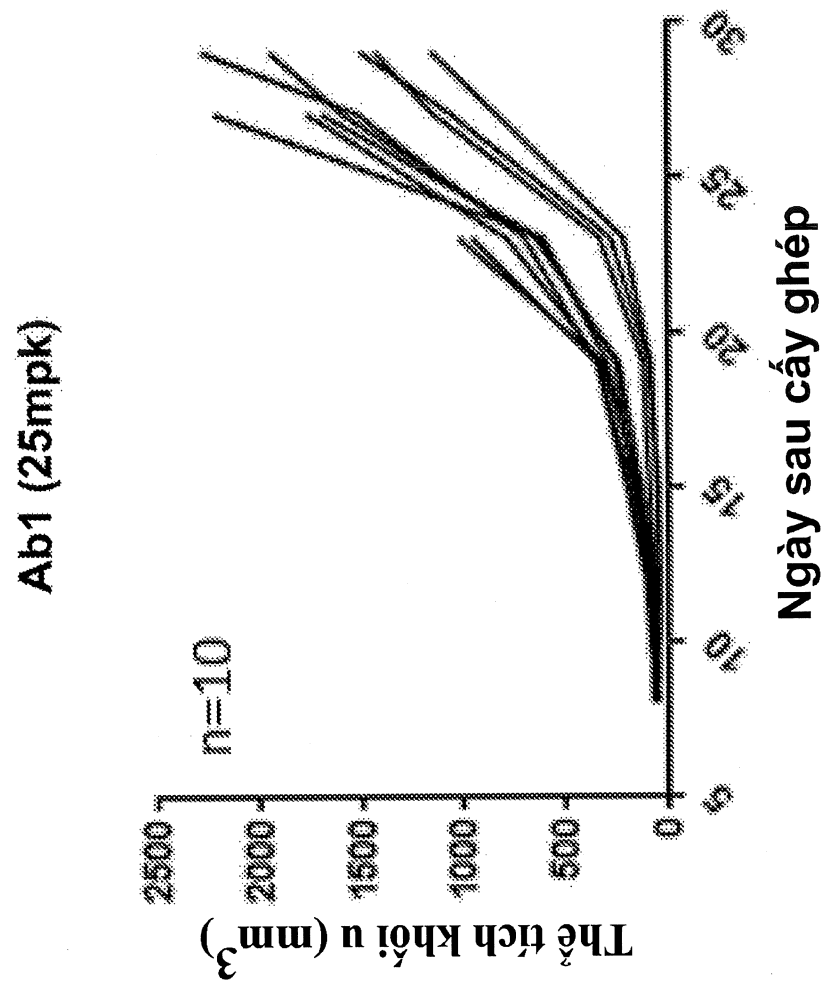
* Điểm thể hiện sự thay đổi thể tích khối u cụ thể so với đường cơ sở vào ngày 27, cột tương ứng với trung vị.



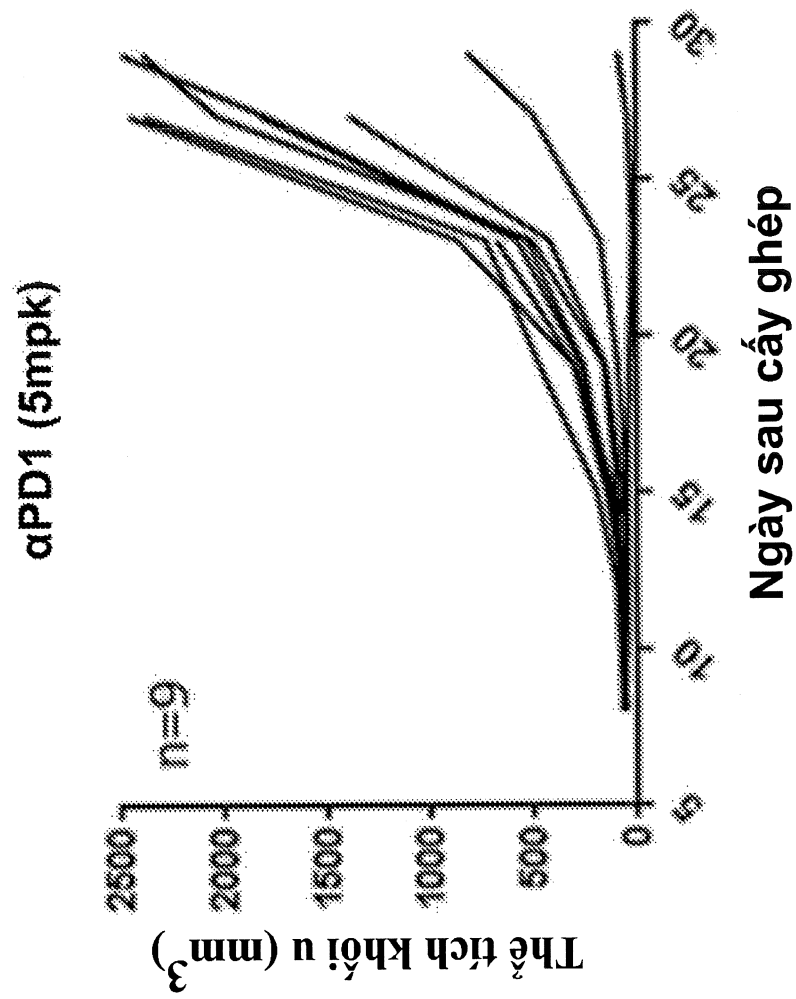
HÌNH 7A

HÌNH 7B



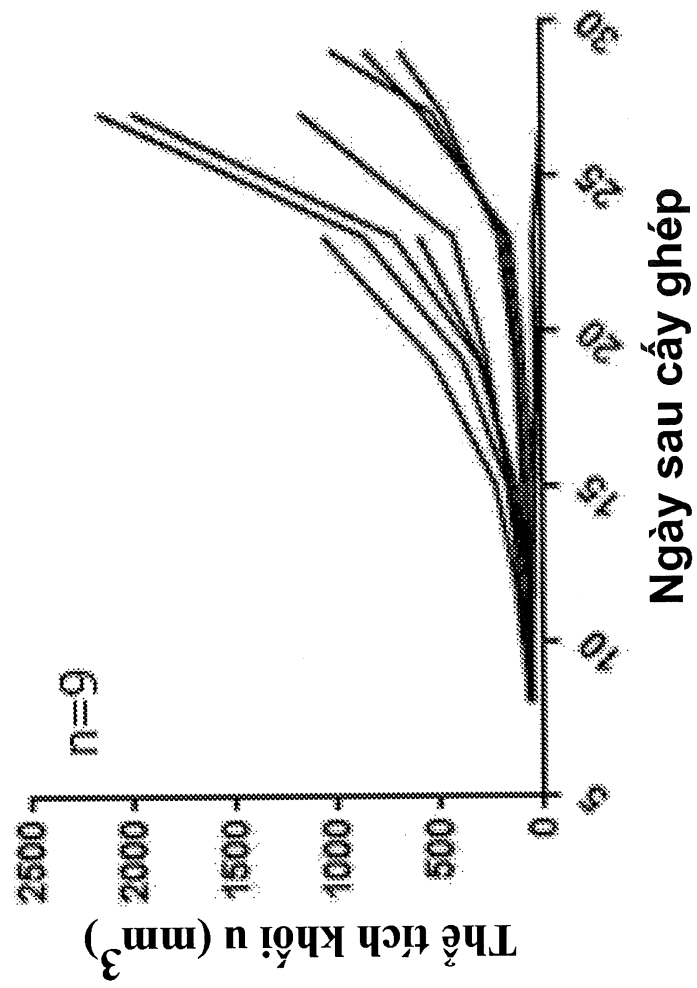


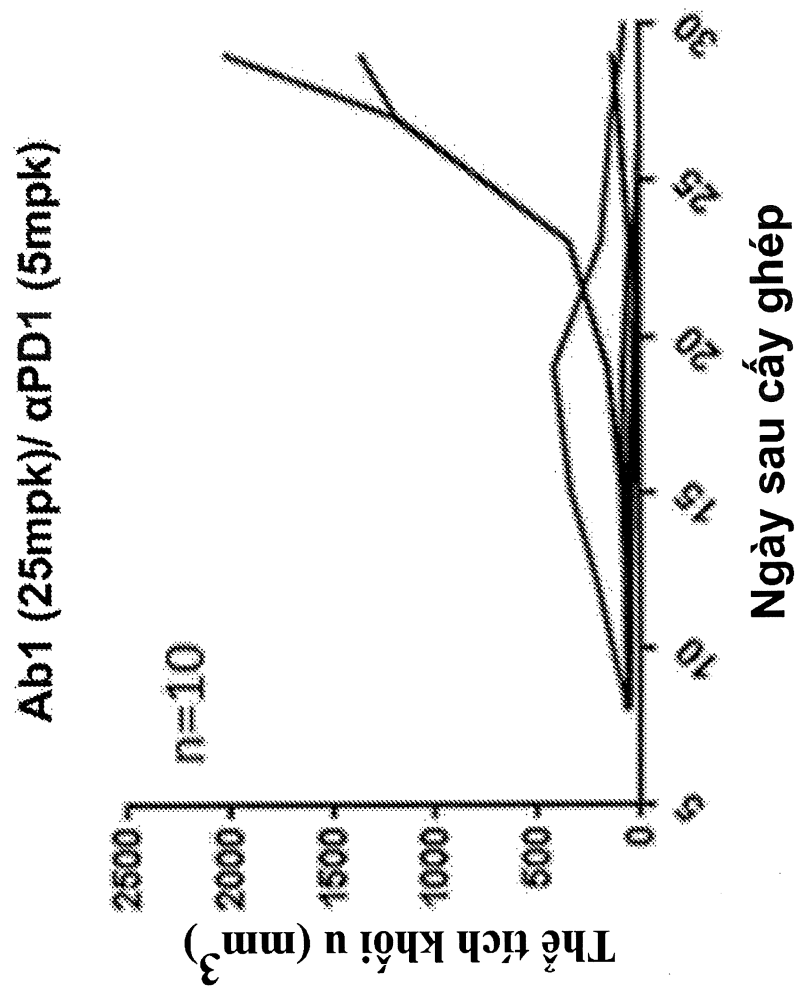
HÌNH 7C



HÌNH 7D

Đối Chứng Isotyp Ab1 (25mpk)/ α PD1 (5mpk)

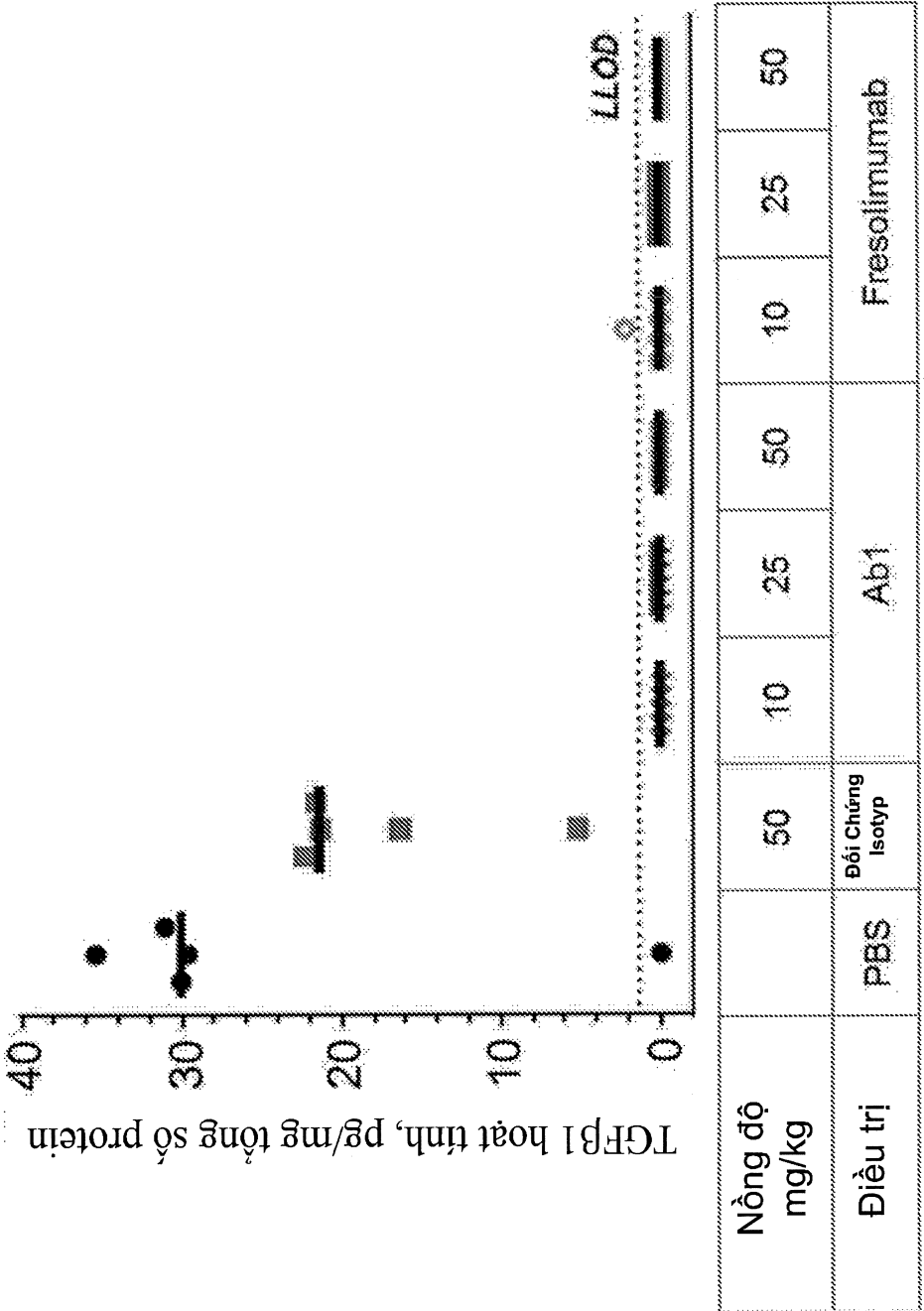




HÌNH 7F

HÌNH 8

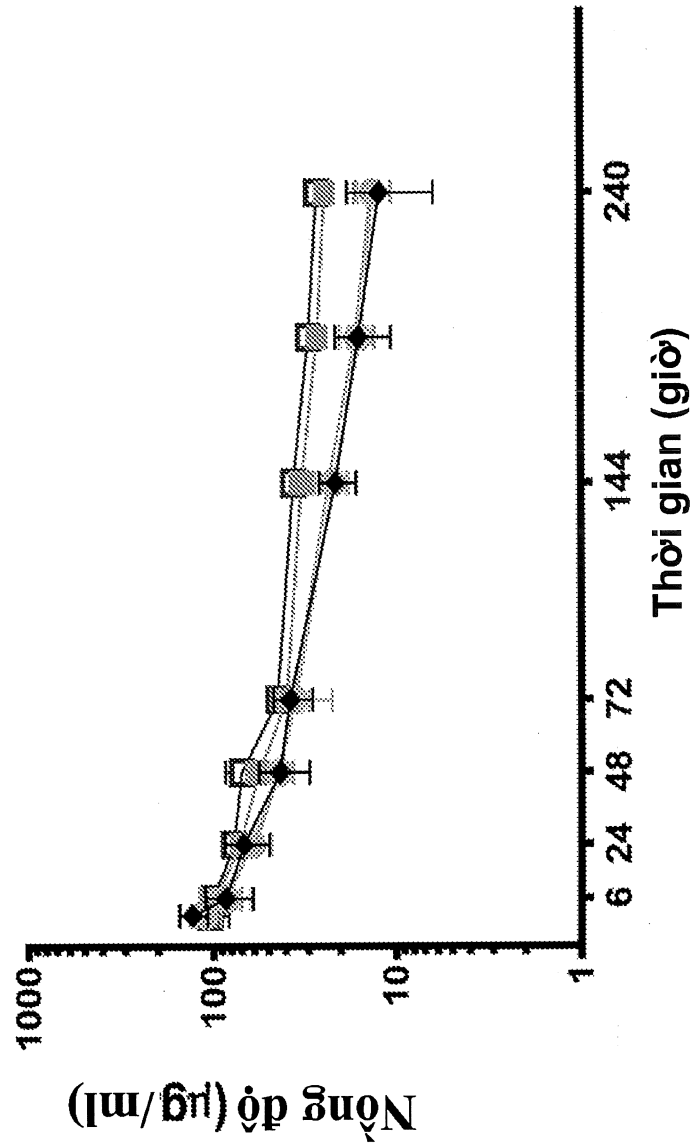
Tác dụng của Ab1 lên nồng độ TGF- β 1 hoạt tính trong dịch dung giải khối u LoVo



HÌNH 9A

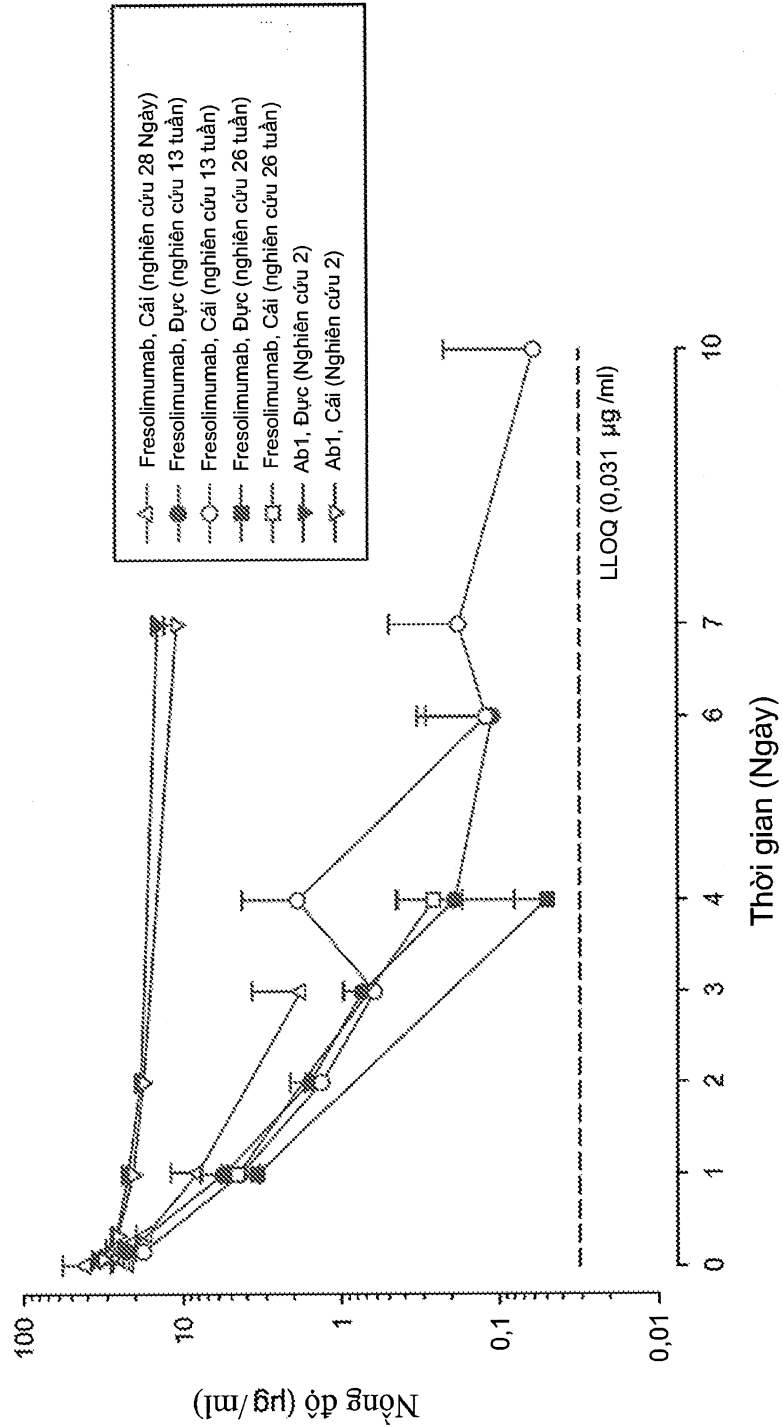
Chuột Cống- Liều Đơn Lê 5 mg/kg

- ◆ Nhóm 1: fresolimumab (B1)
- ◆ Nhóm 2: fresolimumab (B2)
- Nhóm 3: fresolimumab (B3)
- ◆ Nhóm 4: Ab1 (B1)
- Nhóm 5: Ab1 (B2)



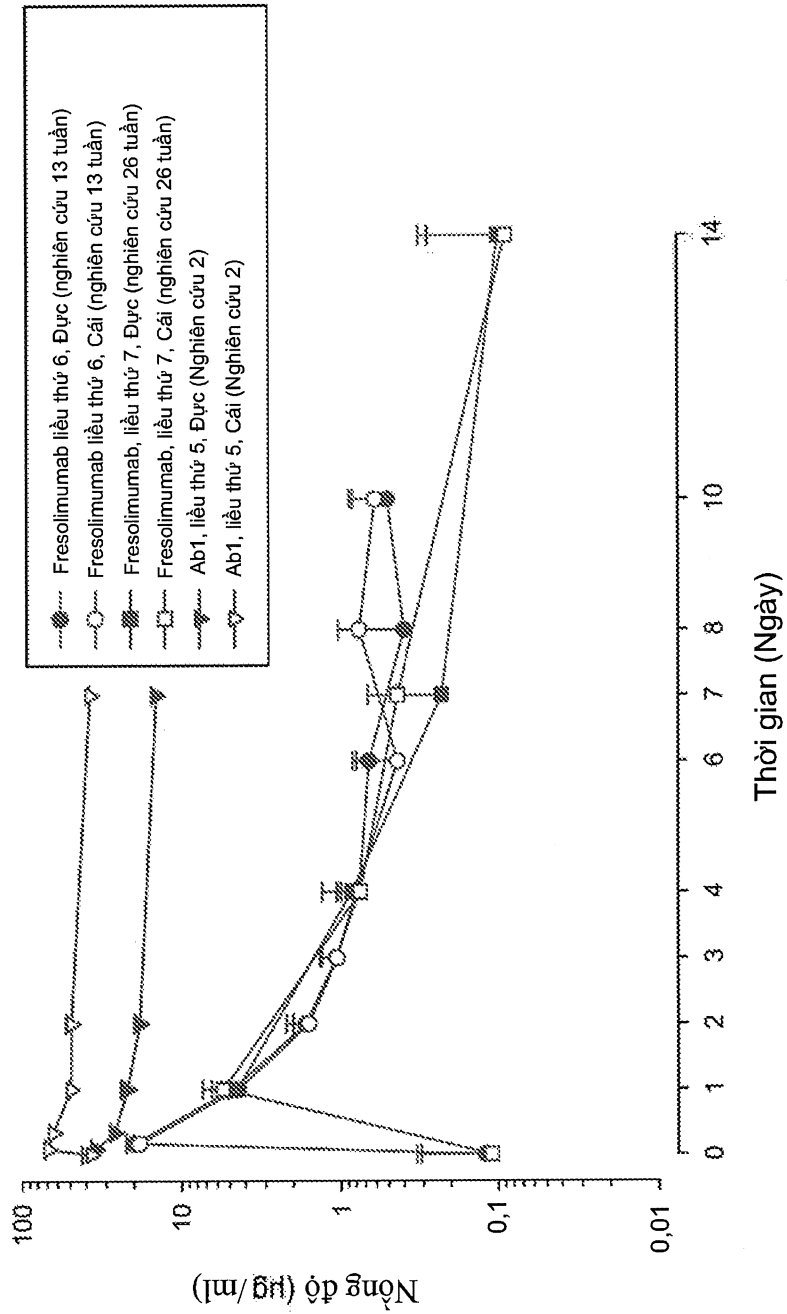
HÌNH 9B

Khí - Liều đơn lẻ 1 mg/kg



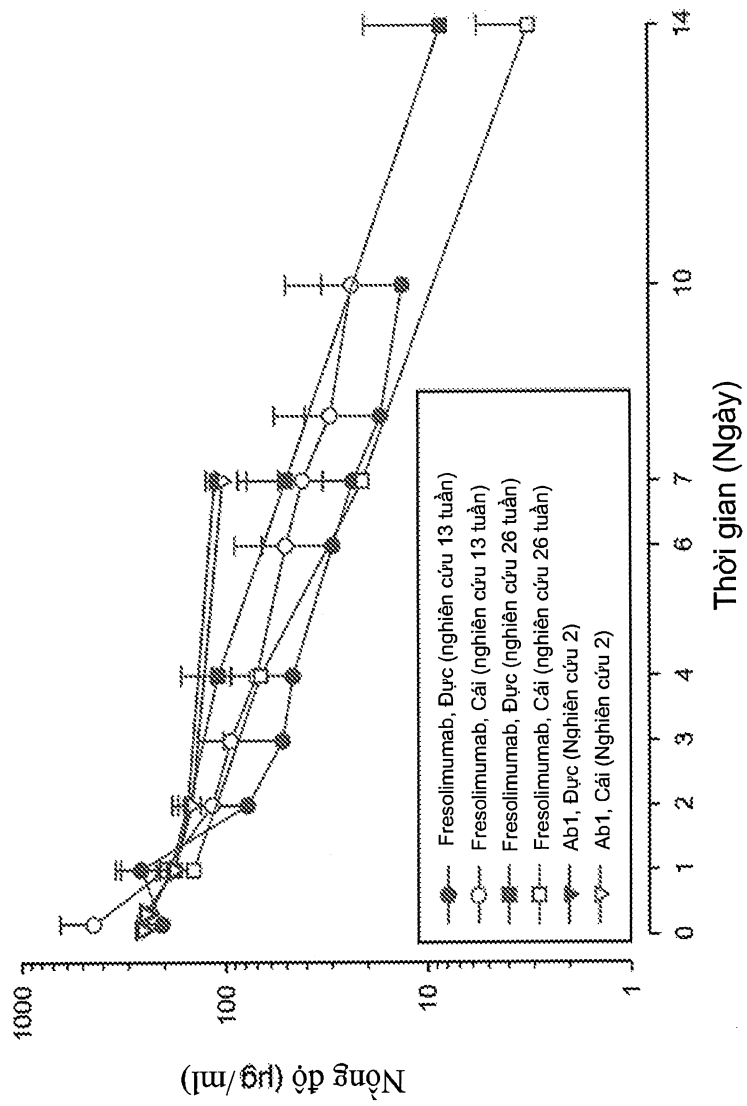
HÌNH 9C

Khí - liều nhắc lại 1 mg/kg



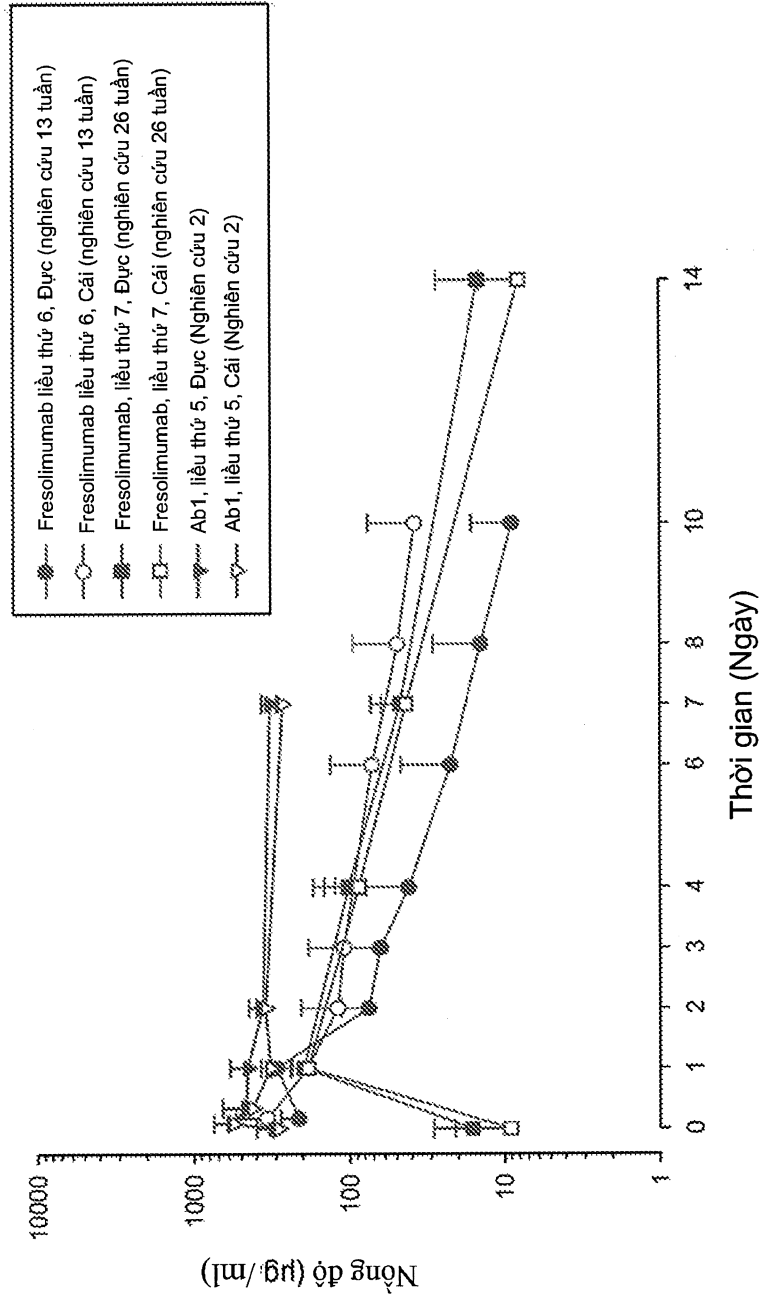
HÌNH 9D

Khí - Liều đơn lẻ 10 mg/kg

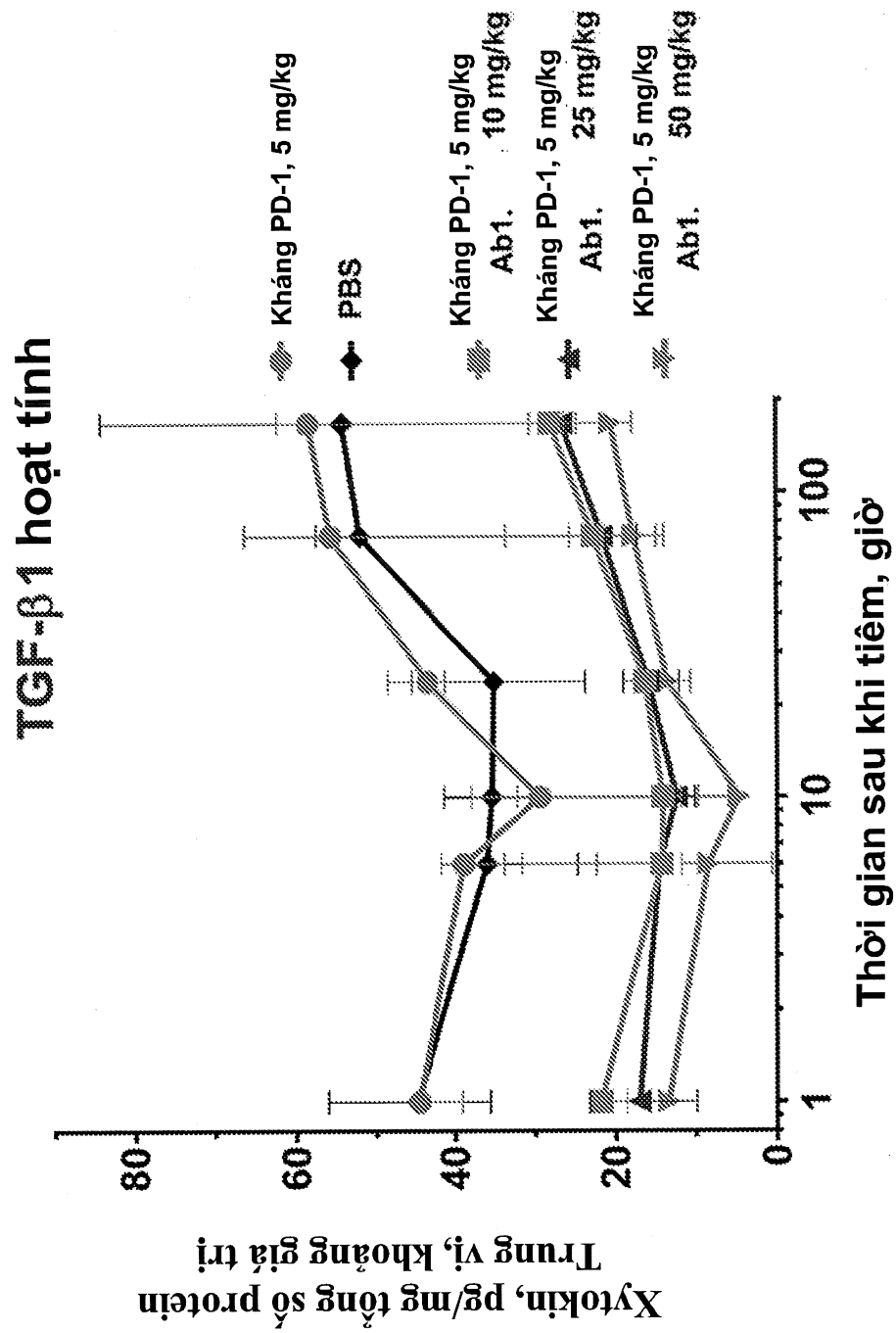


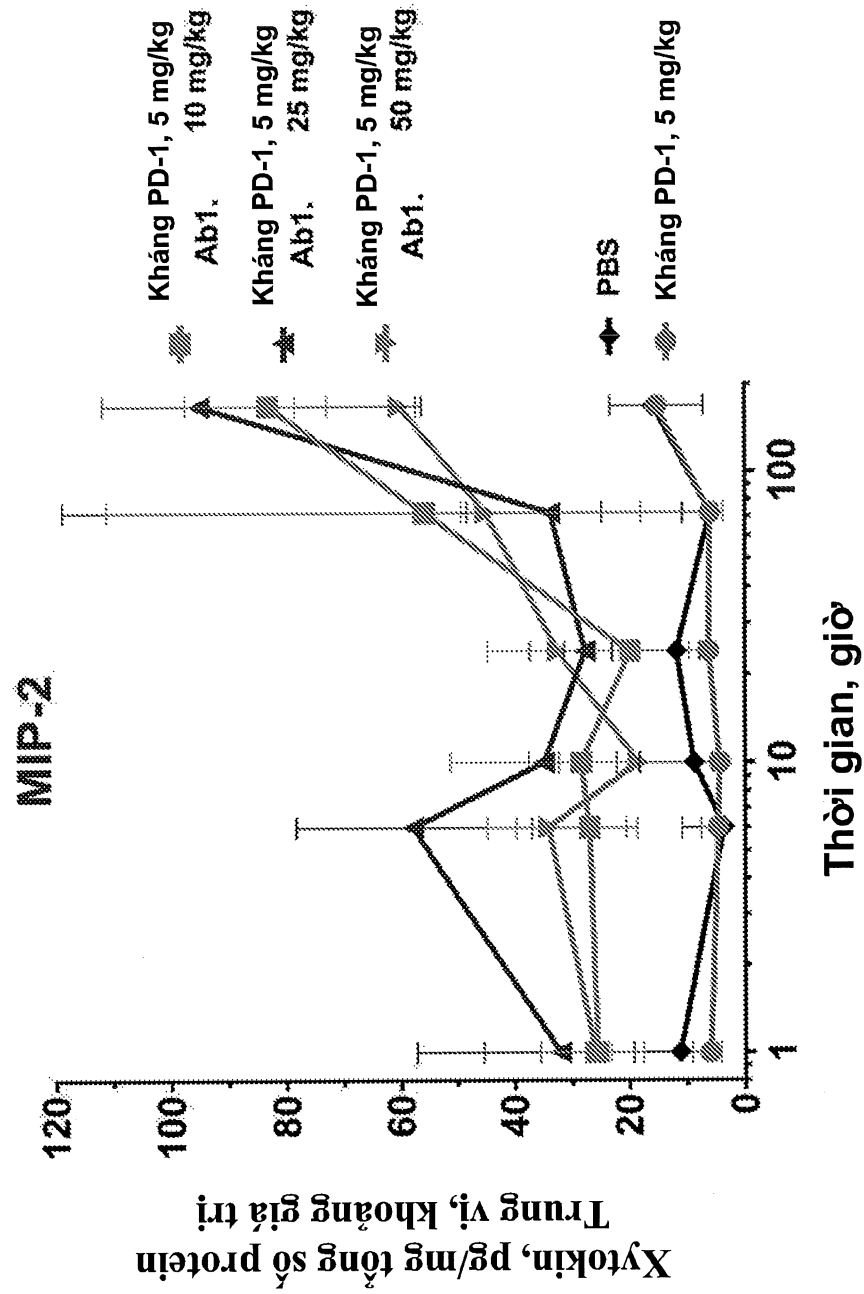
HÌNH 9E

Khí - liều nhắc lại 10 mg/kg



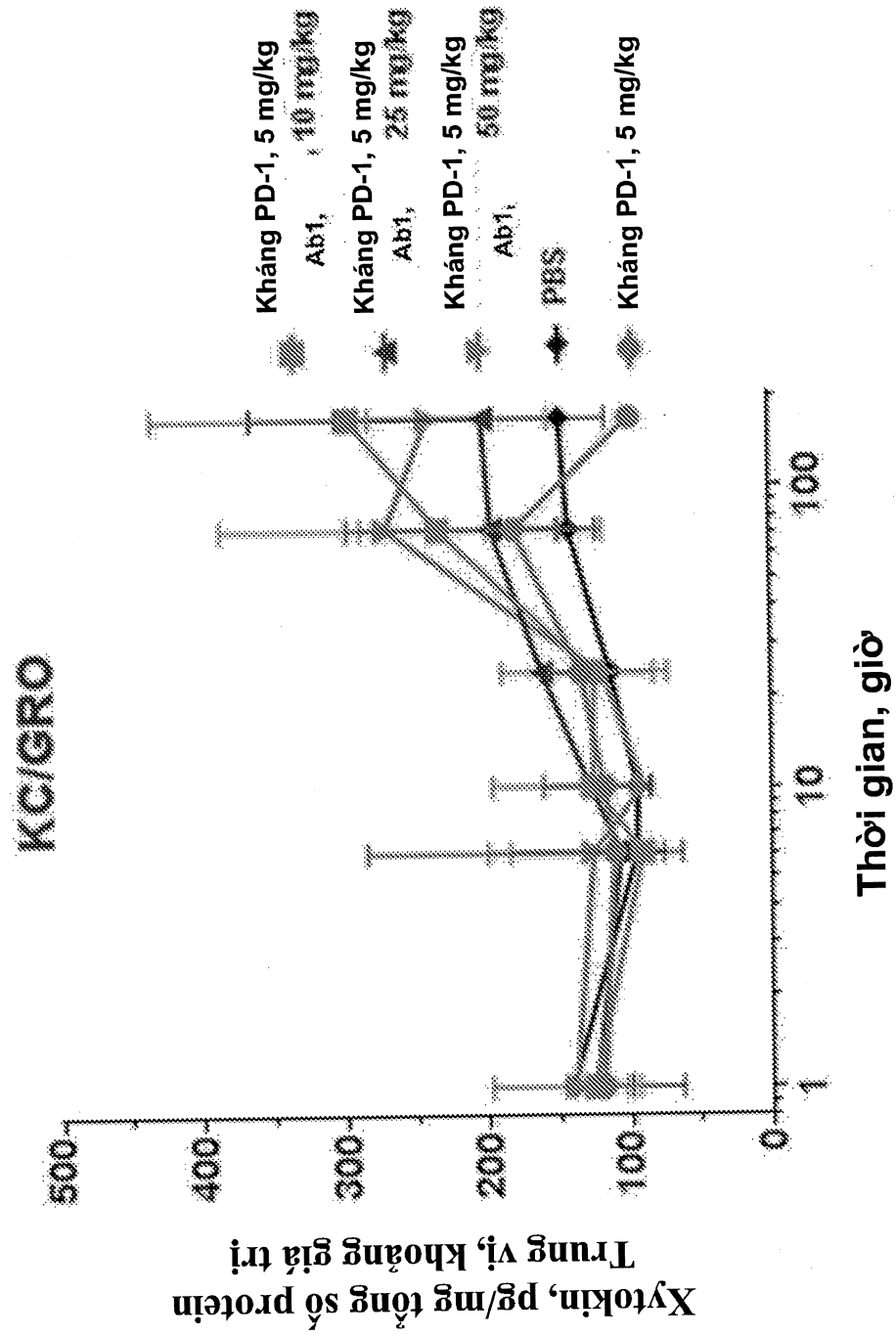
HÌNH 10A



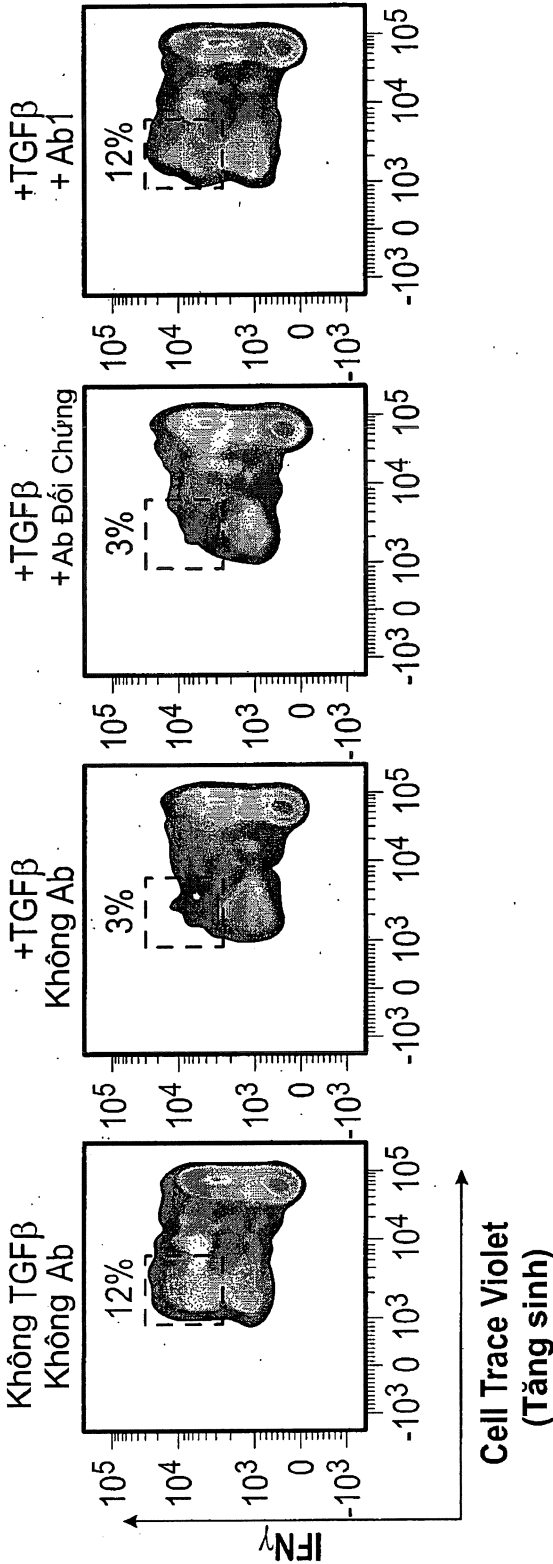


HÌNH 10B

HÌNH 10C

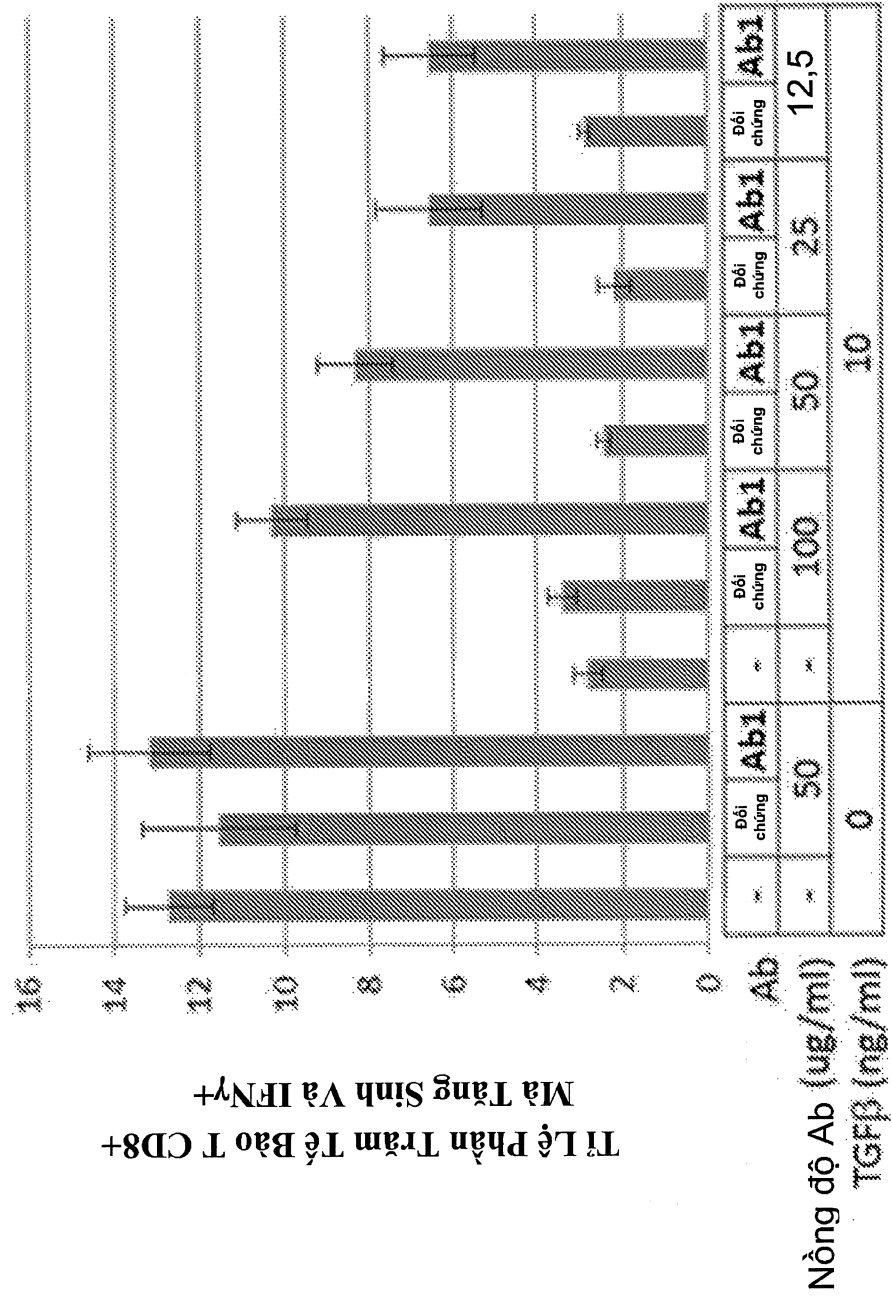


HÌNH 11A

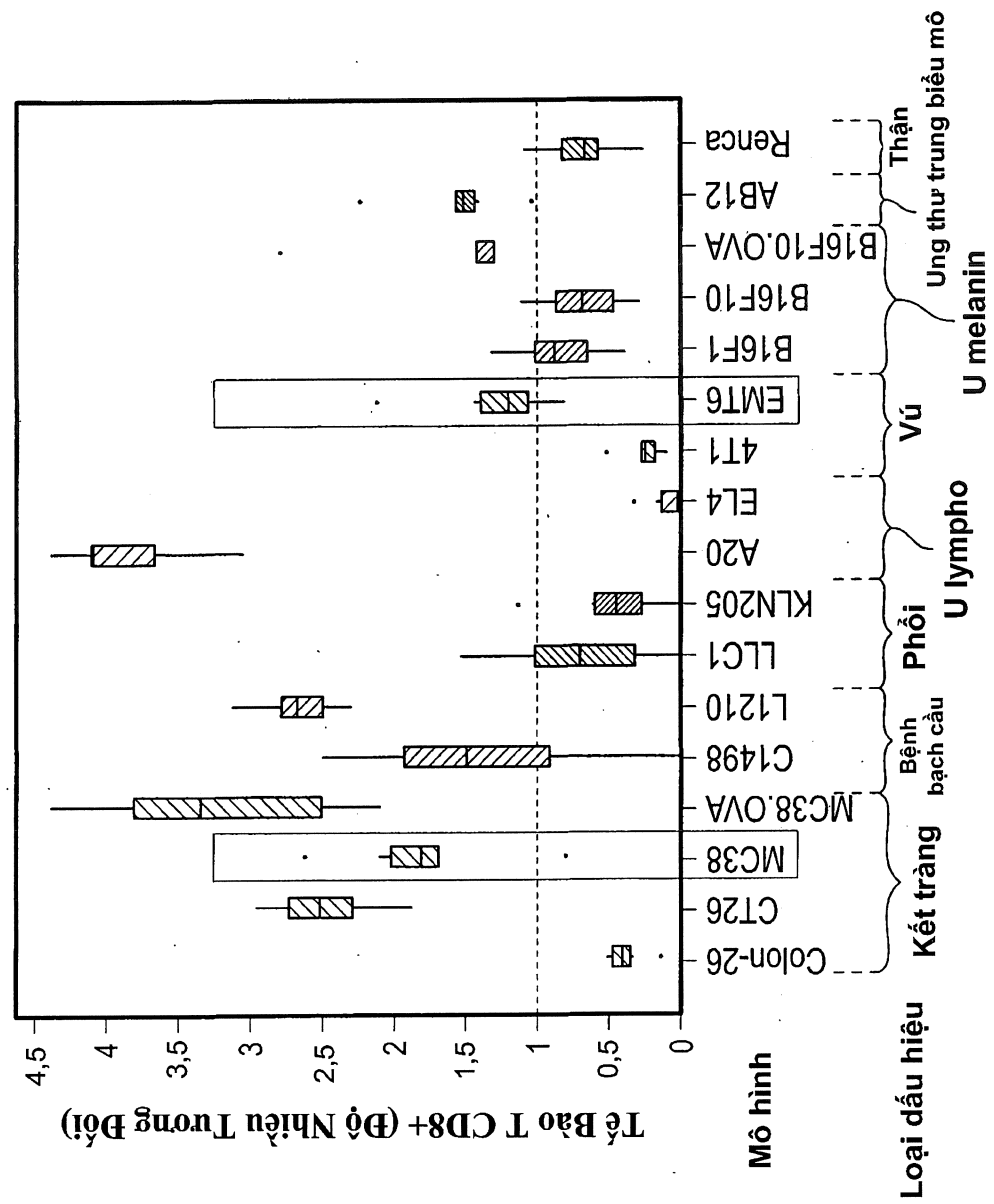


HÌNH 11B

Người cho 1



HÌNH 12A



HÌNH 12B

