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

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

(11) **1-0038912**

(51)[7] **C07K 16/28**; A61K 39/00

(13) **B**

(21) 1-2018-01313 (22) 29/09/2016
(86) PCT/EP2016/073192 29/09/2016 (87) WO 2017/055404 06/04/2017
(30) 15188065.5 02/10/2015 EP; 15188036.6 02/10/2015 EP
(45) 26/02/2024 431 (43) 25/09/2018 366A
(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
(72) CODARRI-DEAK, Laura (CH); FERTIG, Georg (DE); FISCHER, Jens (DE); KLEIN, Christian (DE); LEVITSKI, Viktor (SE); LIFKE, Valeria (DE); PERRO, Mario (IT); REGULA, Joerg Thomas (DE); SCHLOTHAUER, Tilman (DE); SEEBER, Stefan (DE); UMAÑA, Pablo (CR); WUENSCHE, Ildiko (HU); ZWICK, Adrian (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PD1 VÀ TIM3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, cụ thể là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn khi so với mức gắn kết với PD1. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất các phân tử này và dược phẩm chứa các phân tử này. Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép, vectơ và tế bào chủ chứa polynucleotit này.

**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, cụ thể là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn khi so với mức gắn kết với PD1. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất các phân tử này và phương pháp sử dụng chúng.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Tầm quan trọng của hệ miễn dịch trong việc bảo vệ chống ung thư là dựa trên khả năng phát hiện và phá hủy các tế bào bất thường của nó. Tuy nhiên, một số tế bào khối u có thể thoát khỏi hệ miễn dịch bằng cách tạo ra trạng thái ức chế miễn dịch (Zitvogel et al., Nature Reviews Immunology 6 (2006), 715–727). Một ví dụ về cơ chế ức chế miễn dịch có trong vật chủ mang khối u là thúc đẩy hiện tượng rối loạn chức năng hoặc mất chức năng của tế bào T. Tế bào T là trọng điểm chính của các nỗ lực để điều khiển theo hướng trị liệu tính miễn dịch chống khối u nội sinh do khả năng của chúng trong việc nhận diện có chọn lọc peptit có nguồn gốc từ protein trong tất cả các ngăn tế bào; khả năng của chúng trong việc trực tiếp nhận diện và tiêu diệt tế bào biểu hiện kháng nguyên (bằng tế bào T tác động $CD8^+$; còn được biết đến là tế bào lympho T độc hại tế bào (cytotoxic T lymphocyte-CTL)) và khả năng của chúng trong việc sắp xếp các đáp ứng miễn dịch khác nhau (bằng tế bào T trợ giúp $CD4^+$), kết hợp cơ chế tác động đáp ứng và bẩm sinh. Tế bào T đã mất chức năng không thể sinh sôi và gây ra các chức năng tác động như tính độc hại tế bào và tiết xytokin đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. Các nghiên cứu khác chỉ ra rằng các tế bào T đã mất chức năng được đặc trưng bởi sự biểu hiện duy trì của phân tử ức chế PD-1 (protein 1 gây chết tế bào theo chương trình) và tương tác phong bế của PD-1 và PD-L1 (phối tử PD-1) có thể hủy bỏ hiện tượng mất chức năng tế bào và khôi phục đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên ở chuột nhắt nhiễm LCMV (Barber et al., Nature 439 (2006), 682-687). Tuy nhiên, việc chỉ hướng đích con đường PD-1–PD-L1 luôn không dẫn đến hiện tượng hủy bỏ hiện tượng mất chức năng tế bào T (Gehring et al., Gastroenterology 137 (2009), 682–690), chỉ ra rằng

các phân tử khác có thể liên quan đến hiện tượng mất chức năng tế bào T (Sakuishi, J. Experimental Med. 207 (2010), 2187-2194).

TIM-3 là phân tử được nhận biết từ đầu là được biểu hiện có chọn lọc trên Th1 tiết IFN-γ và tế bào Tc1 (Monney et al., Nature 415 (2002), 536-541). Tương tác giữa TIM-3 với phối tử của nó, galectin-9, gây chết tế bào trong tế bào T TIM-3$^+$. Vì vậy, cả TIM-3 và PD-1 đều có thể có chức năng làm chất điều hòa âm của các đáp ứng tế bào T. Đã cho thấy rằng TIM-3 đánh dấu quần thể được ức chế hoặc rối loạn chức năng nhiều nhất của tế bào T CD8$^+$ trong các mô hình tiền lâm sàng của cả bệnh ác tính dạng rắn và bệnh ác tính huyết học (Sakuishi, J. Experimental Med. 207 (2010), 2187-2194; Zhou, Blood 117 (2011), 4501-4510; Majeti R et al., PNAS, 106 (2009), 3396-3401). Trong các mô hình này, tất cả các tế bào T CD8$^+$ và TIM-3$^+$ biểu hiện đồng thời PD1, và các tế bào biểu hiện kép cho thấy các thiếu sót ở cả quá trình tiến triển chu kỳ tế bào và sản sinh xytokin tác động [interleukin (IL)-2, TNF, và IFN-γ] lớn hơn so với các tế bào biểu hiện PD1 một mình. Vì vậy, con đường TIM-3 có thể kết hợp với con đường PD-1 để thúc đẩy sự phát triển của phenotyp rối loạn chức năng nghiêm trọng trong tế bào T CD8$^+$ ở bệnh ung thư. Vì thế, việc hướng đích kết hợp con đường TIM-3 và PD1 được mong đợi là có hiệu quả cao trong việc kiểm soát sự phát triển khối u.

TIM3 là protein người thuộc siêu họ globulin miễn dịch, và họ TIM của protein. Ở người, tương tự như chuột nhắt, TIM-3 được biểu hiện trên tế bào T cũng như tế bào thực bào như đại thực bào và tế bào đuôi gai. Việc TIM3 gắn kết với phối tử protein (ví dụ, galectin-9) có thể ức chế đáp ứng Th1 thông qua cơ chế cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình, và do đó dẫn đến hiện tượng như cảm ứng sự dung nạp ngoại vi. Việc cảm ứng sự biểu hiện của TIM3 ở người với ARN ngắn can thiệp (siRNA) hoặc ức chế TIM3 ở người bởi kháng thể phong bế làm tăng sự tiết interferon alpha từ tế bào T CD4$^+$, hỗ trợ vai trò ức chế của TIM3 trong tế bào T người. Trong thực bào, TIM3 cũng có chức năng làm thụ thể để nhận diện các tế bào chết theo chương trình. Phép phân tích các mẫu lâm sàng từ các bệnh nhân mắc bệnh tự miễn cho thấy rằng không có sự biểu hiện TIM3 trong tế bào dương tính với CD4. Cụ thể, trong dòng vô tính tế bào T có nguồn gốc từ dịch não tủy của bệnh nhân mắc bệnh đa xơ cứng, mức độ biểu hiện của TIM3 thấp hơn và mức độ tiết ra IFN-gama cao hơn so với mức độ biểu hiện của TIM3 và mức độ tiết ra IFN-gama của dòng vô tính có nguồn gốc từ người khỏe mạnh bình thường (Koguchi K et al., J Exp Med. 203 (2006), 1413-1418). Có các báo cáo về mối

liên hệ giữa TIM-3 với các bệnh dị ứng hoặc bệnh hen (WO 96/27603 và WO2003/063792).

Các ví dụ về kháng thể đơn dòng kháng TIM3 bao gồm kháng thể đơn dòng chuột cống kháng TIM3 ở người (dòng vô tính 344823, được sản xuất bởi R&D Systems) và kháng thể đơn dòng chuột nhắt kháng TIM-3 người (dòng vô tính F38-2E2, được sản xuất bởi R&D Systems). WO2013/06490 đề cập đến kháng thể kháng TIM3 có sự tiếp nhận nhanh và các thể liên hợp miễn dịch của nó để điều trị bệnh ung thư và giảm viêm. US2012/189617 đề cập đến kháng thể kháng TIM-3 có hoạt tính tác động cao hơn như độc hại tế bào trong tế bào phụ thuộc kháng thể (hoạt tính ADCC) đối với các bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện TIM3 ở người.

Protein 1 gây chết tế bào theo chương trình (PD-1 hoặc CD279) là thành viên ức chế của họ thụ thể CD28, cũng bao gồm CD28, CTLA-4, ICOS và BTLA. PD-1 là thụ thể bề mặt tế bào và được biểu hiện trên tế bào B được hoạt hóa, tế bào T, và tế bào dạng tủy (Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). Cấu trúc của PD-1 là protein xuyên màng typ 1 dạng monome, bao gồm một miền ngoại bào giống miền biến đổi globulin miễn dịch và miền bào tương chứa mô-típ ức chế dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin (ITIM) và mô-típ chuyển đổi dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin (ITSM). Tế bào T được hoạt hóa biểu hiện tạm thời PD1, nhưng việc biểu hiện ở mức cao và kéo dài của PD1 và phối tử PDL1 của nó thúc đẩy hiện tượng mất chức năng miễn dịch, dẫn đến việc tồn tại dai dẳng các bệnh nhiễm virut, sự lẩn tránh của khối u, tăng lây nhiễm và tỷ lệ tử vong. Việc biểu hiện PD1 được cảm ứng bằng cách nhận diện kháng nguyên thông qua thụ thể tế bào T và việc biểu hiện của nó được duy trì cơ bản thông qua việc truyền tín hiệu thụ thể tế bào T liên tục. Sau khi tiếp xúc kháng nguyên kéo dài, locus PD1 không được metyl hóa lại, mà thúc đẩy sự biểu hiện ở mức cao liên tục. Việc phong bế con đường PD1 có thể khôi phục chức năng của tế bào T đã mất chức năng ở bệnh ung thư và nhiễm virut mạn tính (Sheridan, Nature Biotechnology 30 (2012), 729-730). Kháng thể đơn dòng đối với PD-1 đã được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/042402, WO 2004/004771, WO 2004/056875, WO 2004/072286, WO 2004/087196, WO 2006/121168, WO 2006/133396, WO 2007/005874, WO 2008/083174, WO 2008/156712, WO 2009/024531, WO 2009/014708, WO 2009/101611, WO 2009/114335, WO 2009/154335, WO 2010/027828, WO 2010/027423, WO 2010/029434, WO 2010/029435, WO 2010/036959, WO

2010/063011, WO 2010/089411, WO 2011/066342, WO 2011/110604, WO 2011/110621, WO 2012/145493, WO 2013/014668, WO 2014/179664, và WO 2015/112900.

Cũng đã cho thấy rằng việc phong bế cả PD1 và TIM3 có thể khôi phục các đáp ứng miễn dịch kháng khuẩn, ví dụ ở bệnh nhân mắc bệnh viêm gan do rượu cấp tính (AAH). Tế bào lympho từ các bệnh nhân này biểu hiện hàm lượng cao các thụ thể ức chế miễn dịch, tạo ra hàm lượng thấp interferon gama, và tăng sản sinh IL10 do tiếp xúc với nội độc tố kinh niên. Các tác động này có thể được đảo ngược bằng cách phong bế PD1 và TIM3, mà làm tăng hoạt tính kháng vi trùng của tế bào T và bạch cầu trung tính (Markwick et al, Gastroenterology 148 (2015), 590–602).

Kháng thể đặc hiệu kép kháng TIM3 và PD1 đối với liệu pháp miễn dịch trong các điều kiện miễn dịch mạn tính đã được mô tả trong WO 2011/159877. Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu tạo ra kháng thể đặc hiệu kép mới không những gắn kết đồng thời với PD1 và TIM3 và vì vậy hướng đích có chọn lọc các tế bào T biểu hiện cả PD1 và TIM3, mà còn tránh phong bế TIM3 trên các tế bào khác như tế bào miễn dịch bẩm sinh, ví dụ, tế bào đuôi gai còn non (DC) và bạch cầu đơn nhân. Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế không chỉ phong bế hiệu quả PD1 và Tim3 trên tế bào T biểu hiện quá mức cả PD1 và TIM3, chúng chọn lọc cao các tế bào này và nhờ đó có thể tránh được các tác dụng phụ bằng cách dùng kháng thể TIM3 có hoạt tính cao.

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm

miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:1,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:12,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6; hoặc

(b) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22; hoặc

(c) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:31; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 có hóa trị hai.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực thấp và gắn kết với PD1 với ái lực cao. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 50 lần khi so với mức gắn kết với PD1, đặc biệt hơn là với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 100 lần khi so với mức gắn kết với PD1. Theo một phương án được ưu tiên, ái lực gắn kết (KD) được xác định bằng Thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (như được mô tả ví dụ trong Ví dụ 12.)

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24, hoặc

(f) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, hoặc

(g) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, hoặc

(h) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm

miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 50 lần khi so với mức gắn kết với PD1, đặc biệt hơn là với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 100 lần khi so với mức gắn kết với PD1.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 là kháng thể người, kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể khảm. Cụ thể, kháng thể đó là kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể khảm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này bao gồm miền Fc, mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3.

Cụ thể, miền Fc là miền IgG, cụ thể hơn là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc, đặc biệt là đối với thụ thể Fcγ. Cụ thể, miền Fc là thuộc phân nhóm IgG1 người với đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm các phần phình và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm các phần lõm theo phương pháp phần phình vào phần lõm. Theo một khía cạnh cụ thể, cấu trúc tiểu

đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm thay thế axit amin S354C và T366W (đánh số theo EU) và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm thay thế axit amin Y349C, T366S và Y407V (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh bổ sung, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó trong một trong các mảnh Fab, miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau sao cho miền VH là một phần của chuỗi nhẹ và miền VL là một phần của chuỗi nặng. Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể, trong đó trong mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1, miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó trong một trong các mảnh Fab trong miền hằng định CL, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể, trong đó trong mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3 của miền hằng định CL, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 52, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 56, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 60, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 64, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 68, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:69.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:69.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề xuất vectơ, cụ thể là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit theo sáng chế và tế bào chủ nhân rải rác hoặc nhân điển hình bao gồm polynucleotit hoặc vectơ theo sáng chế. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào nhân điển hình, cụ thể là tế bào động vật có vú.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây, bao gồm các bước gồm a) biến nạp tế bào chủ bằng các vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép nêu trên, b) nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép và c) thu hồi kháng thể đặc hiệu kép từ môi trường nuôi cấy. Sáng chế còn đề xuất cả kháng thể đặc hiệu kép được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây, và ít nhất một tá dược dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất cả kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép, để sử dụng làm thuốc chữa bệnh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép, để sử dụng

i) trong điều biến các đáp ứng miễn dịch, như khôi phục hoạt tính tế bào T,

ii) trong kích thích đáp ứng hoặc chức năng miễn dịch,

iii) trong điều trị các bệnh lây nhiễm,

iv) trong điều trị bệnh ung thư,

v) trong trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư,

vi) trong kéo dài sự sống của bệnh nhân mắc bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép, để sử dụng trong điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép, để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư. Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép, để sử dụng trong điều biến các đáp ứng miễn dịch. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với

TIM3, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virut mạn tính.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây để sản xuất thuốc chữa bệnh để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị, đặc biệt là để sản xuất thuốc chữa bệnh để điều trị bệnh ung thư, cũng như phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của chế phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây ở dạng dược dụng. Theo một khía cạnh cụ thể, bệnh nêu trên là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh cụ thể khác, bệnh nêu trên là bệnh nhiễm virut mạn tính. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến các đáp ứng miễn dịch ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của chế phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây ở dạng dược dụng. Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên, cá thể tốt hơn là động vật có vú, đặc biệt là người.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây, hoặc dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này được dùng kết hợp với chất hóa trị, xạ trị và/hoặc các chất khác để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch ung thư.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của tế bào khối u ở cá thể bao gồm cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 như được mô tả ở đây để ức chế sự phát triển của tế bào khối u. Cá thể tốt hơn là động vật có vú, đặc biệt là người.

**Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1: Phong bế PD1 bằng PD1-0103 dạng khảm làm tăng mạnh sự tiết IFN-gama bằng tế bào T người sơ cấp đã được kích thích dị sinh.

Fig.2: Phong bế PD1 bằng PD1-0103 dạng khảm làm tăng mạnh sự tiết interferon-gama (IFN-γ) bằng tế bào T người sơ cấp đã được kích thích dị sinh.

Fig.3: Phong bế PD1 bằng PD1-0103 dạng khảm làm tăng mạnh sự tiết yếu tố alpha (TNF) hoại tử khối u bằng tế bào T người sơ cấp đã được kích thích dị sinh.

Fig.4: 4A) Tần suất tế bào T CD4 sản sinh ra Granzyme B và 4B) Lượng IFN-γ được phát hiện ra bởi mức hấp thụ (Mật độ quang học, O.D.) trong phần dịch nổi trên bề mặt của MLR trong sự có mặt của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau với các nồng độ gia tăng.

Fig.5: 5A) Tác động của việc phong bế PD1/PD-L1 đến sự hoạt hóa lại của thụ thể tế bào T đã được ức chế truyền tín hiệu trong sự có mặt của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau 5B) Tác động của việc phong bế PD1/PD-L1 đến sự hoạt hóa lại của thụ thể tế bào T đã được ức chế truyền tín hiệu trong sự có mặt của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau.

Fig.6: Sơ đồ thử nghiệm FRET về sự gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1/Tim3 với tế bào tái tổ hợp.

Fig.7: Cảm ứng FRET khi điều trị/gắn kết các kháng thể PD1TIM3 đặc hiệu kép khác nhau trên tế bào biểu hiện PD1 và TIM3: tế bào HEK293, được chuyển nhiễm kép với PD1 SNAP Tim3 CLIP, được nhuộm bằng 100nM SNAP-Lumi4-Tb (Cisbio) và 100nM Clip-Red (Cisbio) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37° trong chất đệm Tag-Lite (Cisbio). Sau khi rửa, các tế bào đã được đánh dấu được ủ với kháng thể kháng PD1/Tim3 đặc hiệu kép được chỉ định [0-10nM] (biến thể đặc hiệu kép đã được nhân hóa được thể hiện trên Fig.7B) trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trước khi huỳnh quang phân giải theo thời gian được đo ở

665/620nm bằng bộ đọc BMG Pherastar (được mô tả là giá trị trung bình +/- SD của tín hiệu FRET [tỷ lệ 665/620 nm * 10000], n=3).7A: mô hình 1+1 (kháng thể PD1TIM3_0389 và PD1TIM3_0168) so với cấu trúc 2+2 (PD1TIM3_0358+ PD1TIM3_0359) 7B: biến thể đặc hiệu kép đã được nhân hóa (PD1TIM3_0476 và PD1TIM3_477.

Fig.8: Thử nghiệm FRET về sự gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1/Tim3 1+1 PD1TIM3-0168: tế bào PD1 đuôi SNAP và TIM3 đuôi CLIP (như được mô tả ở trên) được đánh dấu bằng 100nM SNAP-Lumi4-Tb và 100nM Clip-Red. Sau khi rửa, các tế bào đã được đánh dấu được ủ với kháng thể kháng PD1/TIM3 đặc hiệu kép #0168 [ở các nồng độ được chỉ định] trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trước khi huỳnh quang phân giải theo thời gian được đo ở 665/620nm bằng bộ đọc BMG Pherastar (đường màu đen). Để nhấn mạnh độ đặc hiệu của tín hiệu FRET cảm ứng kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đơn dòng kháng PD1 (#0165; Fig.8A) hoặc kháng thể phong bế kháng TIM3 (#0018, Fig.8B) được bổ sung để cạnh tranh dẫn đến việc ngăn chặn được gần như hoàn toàn tín hiệu FRET (đường cong màu xám). Việc điều trị bằng một mình kháng thể kháng PD1 không dẫn đến việc cảm ứng FRET (đường chấm chấm, chỉ biểu đồ bên trái).

Fig.9A: 1+1 PD1TIM3-0389 đặc hiệu kép thể hiện tỷ lệ gắn kết với tế bào T CD4$^+$ dương tính (PD1$^+$, (Tim3$^+$) giống như TIM3_0028 (chi0028) dạng khảm và TIM3-0438 (0438) đã được nhân hóa, nhưng gắn kết ít hơn với bạch cầu đơn nhân, tế bào NK và tế bào T CD3+.

Fig.9B: 1+1 PD1TIM3-0389 đặc hiệu kép thể hiện MFI tăng đáng kể gắn kết với tế bào T CD4$^+$ dương tính (PD1$^+$, (Tim3$^+$) so với TIM3_0028 dạng khảm (chi0028) và Tim3-0438 đã được nhân hóa (0438).

Fig.9C: 1+1 PD1TIM3-0168 đặc hiệu kép không có khác biệt liên quan đến sự gắn kết với tế bào T CD4$^+$ dương tính (PD1$^+$, (Tim3$^+$) so với TIM3_0018 dạng khảm (Tim3-chi0018) và TIM3-0434 được nhân hóa (0434).

Fig.9D: 1+1 PD1TIM3-0168 đặc hiệu kép thể hiện MFI chỉ tăng nhẹ gắn kết với tế bào T $CD4^+$ dương tính ($PD1^+$, ($Tim3^+$).

Fig.9E và Fig.9F: kháng thể kháng TIM3 TIM3-0038 thể hiện sự gắn kết với cả bạch cầu đơn nhân và tế bào T $CD4^+$.

Fig.9G và Fig.9H: 1+1 PD1TIM3-0166 đặc hiệu kép (dựa trên PD1-0103 dạng khảm// Tim3-0038) thể hiện sự giảm mạnh gắn kết với bạch cầu đơn nhân (so với kháng thể kháng TIM3 ban đầu TIM3_0038 xem Fig.4E và 4F) trong khi vẫn giữ được gắn kết mạnh với tế bào T $CD4^+$.

Fig.10A đến 10D: 1+1 PD1TIM3-0166 đặc hiệu kép (dựa trên PD1-0103 dạng khảm// TIM3-0038) cho thấy sự tiếp nhận giảm so với 2+2 PD1TIM3-0321 đặc hiệu kép (cũng dựa trên PD1-0103 dạng khảm// TIM3-0038, nhưng có hai vị trí gắn kết kháng nguyên đối với PD và hai vị trí gắn kết kháng nguyên đối với TIM3) và so với kháng thể TIM3-0038 ban đầu trên tế bào T $CD4^+$ đã được hoạt hóa và trên tế bào NK đã được hoạt hóa.

Fig.11A: Phép phân tích theo thời gian thể hiện sự khu trú trong màng cao hơn ở cả kháng thể đặc hiệu kép và kháng thể PD1 khi so với tụ hợp nội bào của kháng thể TIM3.

Ký hiệu kháng thể trên hình vẽ TIM3 (chi18-A647 = TIM3_0018 dạng khảm được đánh dấu bằng AlexaA647), a-TIM3 (chi28-A647 = TIM3_0028 dạng khảm được đánh dấu bằng AlexaA647), Bispec (0168-A647 =1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0018) được đánh dấu bằng AlexaA647) Bispec (0389-A647= 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028) được đánh dấu bằng Alexa 647) và a-PD1 (0165-A488 = PD1-0103 dạng khảm được đánh dấu bằng Alexa488).

Kháng thể kháng PD1 và kháng thể 1+1 PD1TIM3_0389 đặc hiệu kép (Bispec 0389) thể hiện sự tiếp nhận rất chậm, thậm chí sau 3 giờ, trong khi đó sự tiếp nhận đối với 1+1 PD1TIM3_0168 đặc hiệu kép khác (Bispec 0168) mạnh hơn. Sự tiếp nhận mạnh hơn được thể hiện

là TIM3 Ab 0028, sự tiếp nhận mạnh nhất được thể hiện là TIM3-0018.

Fig.11B: PD1-0103 dạng khảm (aPD1-0165) thể hiện chỉ có sự tiếp nhận yếu, trong khi đó TIM3_0018 dạng khảm ái lực cao (aTim3-chi18) được tiếp nhận mạnh khi gắn kết TIM3, thậm chí sau 15 phút. Sự tiếp nhận đối với tác nhân gắn kết ái lực thấp TIM3_0028 dạng khảm (aTIM3-chi28) được làm giảm nhẹ. 1+1 AB 0168 đặc hiệu kép (gồm có tác nhân gắn kết ái lực cao aPD1-0165 và aTIM3-0018 ái lực cao) thể hiện sự tiếp nhận giảm nhiều hơn. 1+1 AB 0389 đặc hiệu kép (gồm có tác nhân gắn kết ái lực cao PD1-0103 dạng khảm (aPD1-0165) và TIM3_0028 dạng khảm ái lực thấp (aTIM3-0028) thể hiện sự tiếp nhận giảm rất mạnh. Điều này có thể là do việc gắn kết hóa trị hai với PD1 và TIM3, khi gắn kết ái lực cao với PD1 vẫn giữ được kháng thể ở bề mặt tế bào.

Fig.12A: Hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0018 (=AB 0168) so với PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và TIM3_0018 dạng khảm (=TIM3-chi18) và các hỗn hợp của chúng.

Fig.12B: Hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028 (=Bispec AB 0389) so với PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và TIM3_0028 dạng khảm (=TIM3-chi28) và các hỗn hợp của chúng.

Fig.12C: Hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1-0103 / Ky8213 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / và kháng TIM3 Ky8213 từ US20120189617 (xem kháng thể 8213 chẳng hạn trong Ví dụ 33) được sản xuất theo phương pháp tương tự như được mô tả trong Ví dụ 1 dưới dạng 1+1 CrossMab) so với PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và kháng TIM3-Ky8213 (từ US20120189617 (xem kháng thể 8213) chẳng hạn trong Ví dụ 33) và các hỗn hợp của chúng.

Fig.12D: Hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028

(=Bispec AB 0389 (1+1))) so với kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 2+2 PD1TIM3_0358 dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028 (= Bispec AB 0358 (2+2)), và PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và TIM3_0028 dạng khảm (=TIIM3-chi28) và các hỗn hợp của chúng

Fig.13: Điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0476 làm tăng đáng kể khả năng của tế bào T CD4 trong việc giải phóng IFN-gama so với điều trị bằng kháng thể PD1 hoặc TIM3 một mình và thậm chí so với điều trị bằng hỗn hợp của kháng thể ban đầu PD1_0376 và kháng thể TIM3_0438. Các tế bào T CD4 được nuôi cấy đồng thời với dòng tế bào khối u biểu hiện MHCII. Kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0476 được thử nghiệm kháng kháng thể PD1 aPD1_0376, MDX-1106 (nivolumab) và MK-3475 (pembrolizumab), kháng kháng thể TIM3 aTIM3_0438 và Kyowa-8213 (như được mô tả trong WO 2011/155697) và kháng hỗn hợp của kháng thể kháng PD1 aPD1-0376 và kháng thể kháng TIM3 aTIM3_0438.

Fig.14A và 14B: Kết quả của thử nghiệm hiệu lực so sánh kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 (0476) với kháng thể PD1 hoặc kháng thể TIM3 một mình ở chuột nhắt cái đã được ức chế miễn dịch (NOG) được thách thức bằng tế bào MKN45 và được cung cấp PBMC từ người cho khỏe mạnh được thể hiện trên Fig.14A và Fig.14B. Các biểu đồ tượng trưng cho số đo trung bình kích thước khối u (trong nhóm điều trị) bao gồm sai số tiêu chuẩn của kích thước khối u trung bình trong khoảng thời gian 30 ngày. Các đường cong có hình tròn đặc tương ứng với sự phát triển kích thước khối u mà không điều trị (chất dẫn thuốc). Trên Fig.14A, sự phát triển khối u khi tiếp nhận điều trị ở liều lượng thấp hơn được thể hiện (1,5mg/kg kháng thể PD1_0376, 1,5mg/kg nivolumab, 1,5mg/kg kháng thể TIM3_0438 hoặc 3mg/kg kháng thể đặc hiệu kép 1+1 PD1TIM3_0476), trên Fig.14B, sự phát triển khối u ở các liều lượng cao hơn (5mg/kg kháng thể PD1_0376, 5mg/kg nivolumab, 5mg/kg kháng thể Tim3_0438 hoặc 10mg/kg kháng thể đặc hiệu kép 1+1 PD1TIM3_0476) được thể hiện.

**Mô tả chi tiết sáng chế**

Các định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa khác đi, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa giống như thường được sử dụng trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Nhằm mục đích làm rõ bản mô tả, các định nghĩa sau sẽ áp dụng và bất cứ khi nào thích hợp, các thuật ngữ được sử dụng ở dạng số ít cũng bao gồm cả dạng số nhiều và ngược lại.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên" dùng để chỉ nghĩa rộng nhất của nó là phân tử gắn kết đặc hiệu với thể quyết định kháng nguyên. Các ví dụ về phân tử gắn kết kháng nguyên là kháng thể, mảnh kháng thể và protein gắn kết kháng nguyên trong khung.

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

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể gần như đồng nhất, tức là, các cá thể riêng lẻ bao gồm quần thể giống hệt nhau và/hoặc gắn kết với cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có mặt với các lượng nhỏ. Trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng kháng các thể quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng kháng thể quyết định đơn trên kháng nguyên.

Thuật ngữ kháng thể "đặc hiệu đơn" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ kháng thể có một hoặc nhiều vị trí gắn kết, mỗi vị trí trong số đó gắn kết với cùng một epitop của cùng một kháng nguyên. Thuật ngữ "đặc hiệu kép" có nghĩa là kháng thể có thể gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai thể quyết định kháng nguyên riêng biệt, ví dụ, hai vị trí gắn kết mỗi vị trí được tạo ra bằng một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) gắn kết với các kháng nguyên khác nhau

hoặc với các epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên. Kháng thể đặc hiệu kép này là mô hình 1+1. Các mô hình kháng thể đặc hiệu kép khác là mô hình 2+1 (bao gồm hai vị trí gắn kết cho kháng nguyên hoặc epitop thứ nhất và một vị trí gắn kết cho kháng nguyên hoặc epitop thứ hai) hoặc mô hình 2+2 (bao gồm hai vị trí gắn kết cho kháng nguyên hoặc epitop thứ nhất và hai vị trí gắn kết cho kháng nguyên hoặc epitop thứ hai). Thông thường, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm hai vị trí gắn kết kháng nguyên, mỗi vị trí đặc hiệu đối với thể quyết định kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ "hóa trị" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ sự có mặt của số lượng vị trí gắn kết cụ thể trong phân tử gắn kết kháng nguyên. Như vậy, thuật ngữ "hóa trị hai", "hóa trị bốn", và "hóa trị sáu" chỉ sự có mặt của hai vị trí gắn kết, bốn vị trí gắn kết, và sáu vị trí gắn kết, một cách tương ứng, trong phân tử gắn kết kháng nguyên. Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có ít nhất là "hóa trị hai" và có thể có "hóa trị ba" hoặc "đa hóa trị" (ví dụ, "hóa trị bốn" hoặc "hóa trị sáu"). Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể theo sáng chế có hai hoặc nhiều vị trí gắn kết và đặc hiệu kép. Tức là, kháng thể này có thể đặc hiệu kép ngay cả trong các trường hợp mà có nhiều hơn hai vị trí gắn kết (tức là kháng thể đó có hóa trị ba hoặc đa hóa trị). Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai, có một vị trí gắn kết cho mỗi kháng nguyên chúng gắn kết đặc hiệu với.

Thuật ngữ "kháng thể có độ dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn", và "kháng thể toàn vẹn" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản là tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên. "Kháng thể tự nhiên" dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên với các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, kháng thể lớp IgG tự nhiên là các glycoprotein dạng heterotetrame có khoảng 150000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3), còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền hằng định chuỗi nhẹ (CL), còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của kháng thể có thể được ấn định vào một trong năm kiểu, gọi là α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số kiểu trong đó còn có thể được chia thành các kiểu con, ví dụ γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) và α2 (IgA2).

Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được ấn định vào một trong hai kiểu, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

"Mảnh kháng thể" dùng để chỉ phân tử khác với kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này gắn kết. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; kháng thể thể đôi, kháng thể thể ba, kháng thể thể bốn, mảnh cross-Fab; kháng thể thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể và kháng thể miền đơn. Để có nhận xét về một số mảnh kháng thể, xem Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Để có nhận xét về mảnh scFv, xem ví dụ Plückthun, trong tài liệu: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); xem cả trong WO 93/16185; và patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để bàn luận về mảnh Fab và F(ab')2 bao gồm các gốc epitop gắn kết với thụ thể cứu và có thời gian bán thải in vivo tăng lên, xem patent Mỹ số 5,869,046. Kháng thể thể đôi là mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép, xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem ví dụ patent Mỹ số 6,248,516 B1). Ngoài ra, mảnh kháng thể bao gồm polypeptit chuỗi đơn có các đặc tính của miền VH, cụ thể là có thể lắp ghép cùng với miền VL, hoặc có đặc tính của miền VL, cụ thể là có thể lắp ghép cùng với miền VH vào vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng và nhờ đó tạo ra tính chất gắn kết kháng nguyên của kháng thể có độ dài đầy đủ. Mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở kỹ thuật phân hủy protein phân giải của kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bằng tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thực khuẩn thể), như được mô tả ở đây.

Việc phân hủy papain của kháng thể nguyên vẹn tạo ra hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau, gọi là mảnh "Fab" chứa mỗi miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và cả miền hằng định của chuỗi nhẹ và miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi

nặng. Vì vậy, như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "mảnh Fab" dùng để chỉ mảnh kháng thể bao gồm mảnh chuỗi nhẹ bao gồm miền VL và miền hằng định của chuỗi nhẹ (CL), và miền VH và miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Mảnh Fab' khác với mảnh Fab bằng cách bổ sung một số gốc ở đầu tận carboxy của miền CH1 chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề của kháng thể. Fab'-SH là mảnh Fab' trong đó (các) gốc xystein của miền hằng định mang nhóm thiol tự do. Việc xử lý pepsin tạo ra mảnh $F(ab')_2$ có hai vị trí gắn kết kháng nguyên (hai mảnh Fab) và một phần của vùng Fc.

Thuật ngữ "mảnh cross-Fab" hoặc "mảnh xFab" hoặc "mảnh Fab cắt chéo" dùng để chỉ mảnh Fab, trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được trao đổi. Hai hợp phần chuỗi khác nhau của phân tử Fab cắt chéo là có thể có và được bao gồm trong kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế: một mặt, vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fab được trao đổi, tức là phân tử Fab cắt chéo bao gồm chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH1), và chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL). Phân tử Fab cắt chéo này còn được đề cập đến là CrossFab (VLVH). Mặt khác, khi vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fab được trao đổi, phân tử Fab cắt chéo bao gồm chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL), và chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH1). Phân tử Fab cắt chéo này còn được đề cập đến là CrossFab (CLCH1).

"Mảnh Fab chuỗi đơn" hoặc "scFab" là polypeptit bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH), miền hằng định 1 của kháng thể (CH1), miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), miền hằng định chuỗi nhẹ kháng thể (CL) và phần tử liên kết, trong đó các miền kháng thể này và phần tử liên kết này có một trong các thứ tự sau theo chiều từ đầu tận N đến đầu tận C: a) VH-CH1-phần tử liên kết-VL-CL, b) VL-CL-phần tử liên kết-VH-CH1, c) VH-CL-phần tử liên kết-VL-CH1 hoặc d) VL-CH1-phần tử liên kết-VH-CL; và trong đó phần tử liên kết này là polypeptit gồm ít nhất 30 axit amin, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 32 đến 50 axit amin. Mảnh Fab chuỗi đơn nêu trên được cố định thông qua liên kết disulfua tự nhiên giữa miền CL và miền CH1. Ngoài ra, các phân tử Fab chuỗi đơn này có thể được cố định tiếp bằng cách tạo ra liên kết disulfua chuỗi

trung gian thông qua việc xen các gốc xystein vào (ví dụ vị trí 44 trong chuỗi nặng biến đổi và vị trí 100 trong chuỗi nhẹ biến đổi theo đánh số Kabat).

"Mảnh Fab chuỗi đơn cắt chéo" hoặc "x-scFab" là polypeptit bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH), miền hằng định 1 của kháng thể (CH1), miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), miền hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể (CL) và phần tử liên kết, trong đó các miền kháng thể này và phần tử liên kết này có một trong các thứ tự sau theo chiều từ đầu tận N đến đầu tận C: a) VH-CL-phần tử liên kết-VL-CH1 và b) VL-CH1-phần tử liên kết-VH-CL; trong đó VH và VL cùng tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên và trong đó phần tử liên kết này là polypeptit gồm ít nhất 30 axit amin. Ngoài ra, các phân tử x-scFab này có thể được cố định tiếp bằng cách tạo ra liên kết disulfua chuỗi trung gian thông qua việc xen các gốc xystein (ví dụ vị trí 44 trong chuỗi nặng biến đổi và vị trí 100 trong chuỗi nhẹ biến đổi theo đánh số Kabat).

"Mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv)" là protein dung hợp của vùng biến đổi của chuỗi nặng ($V_H$) và chuỗi nhẹ ($V_L$) của kháng thể, được nối với peptit liên kết ngắn gồm từ mười đến khoảng 25 axit amin. Phần tử liên kết thường giàu glyxin để linh hoạt, cũng như serin hoặc threonin để hòa tan, và có thể nối đầu tận N của $V_H$ với đầu tận C của $V_L$, hoặc ngược lại. Protein này vẫn giữ được độ đặc hiệu của kháng thể ban đầu, bất kể việc loại bỏ vùng hằng định và đưa phần tử liên kết vào. Kháng thể scFv được mô tả trong, ví dụ, Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96). Ngoài ra, mảnh kháng thể bao gồm polypeptit chuỗi đơn có các đặc tính của miền VH, cụ thể là có thể lắp ghép cùng với miền VL, hoặc có các đặc tính của miền VL, cụ thể là có thể lắp ghép cùng với miền VH vào vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng và nhờ đó tạo ra tính chất gắn kết kháng nguyên của kháng thể có độ dài đầy đủ.

"Protein gắn kết kháng nguyên trong khung" là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, fibronectin và protein lặp ankyrin đã được thiết kế (DARPins) được sử dụng làm khung thay thế cho miền gắn kết kháng nguyên, xem, ví dụ, Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009) và Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008). Theo một khía cạnh của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên trong khung được chọn từ nhóm bao gồm CTLA-4 (Evibody), Lipocalins (Anticalin), phân tử có nguồn gốc từ Protein A như miền Z của Protein A

(Affibody), miền A (Avimer/Maxibody), transferin huyết thanh (*trans*-body); protein lặp ankyrin đã được thiết kế (DARPin), miền biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể (kháng thể miền đơn, sdAb), miền biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể (nanobody, aVH), mảnh $V_{NAR}$, fibronectin (AdNectin), miền lectin typ C (Tetranectin); miền biến đổi của thụ thể kháng nguyên mới beta-lactamaza (mảnh $V_{NAR}$), gama-crystallin hoặc ubiquitin người (phân tử Affilin); miền kiểu kunitz của chất ức chế proteaza người, vi thể như protein từ họ knottin, peptit aptame và fibronectin (adnectin).

CTLA-4 (kháng nguyên liên quan đến tế bào lympho T độc hại tế bào 4) là thụ thể họ CD28 chủ yếu được biểu hiện trên tế bào T $CD4^+$. Miền ngoại bào của nó có nếp uốn Ig giống miền biến đổi. Vòng tương ứng với CDR của kháng thể có thể được thay thế bằng trình tự đồng nhất để mang lại các tính chất gắn kết khác nhau. Phân tử CTLA-4 được xử lý kỹ thuật để có các độ đặc hiệu gắn kết khác nhau còn được biết đến là Evibody (ví dụ US7166697B1). Evibody có kích cỡ gần giống như vùng biến đổi được phân lập của kháng thể (ví dụ, kháng thể miền). Để có thêm chi tiết, xem Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001). Lipocalin là họ của protein ngoại bào vận chuyển các phân tử nhỏ kỵ nước như steroit, bilin, retinoit và lipit. Chúng có cấu trúc thứ cấp dạng tấm beta cứng có một số vòng ở đầu mở của cấu trúc hình nón mà có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết với các kháng nguyên đích khác nhau. Anticalin có kích thước từ 160 đến 180 axit amin, và có nguồn gốc từ lipocalin. Để có thêm chi tiết, xem Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 và US20070224633. Affibody là khung có nguồn gốc từ Protein A của *Staphylococcus aureus* mà có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết với kháng nguyên. Miền này bao gồm bó xoắn ba gồm khoảng 58 axit amin. Các thư viện được tạo ra bằng cách chọn ngẫu nhiên các gốc bề mặt. Để có thêm chi tiết, xem Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462 và EP 1641818A1. Avimer là protein đa miền có nguồn gốc từ họ khung miền A. Miền tự nhiên gồm khoảng 35 axit amin chấp nhận cấu trúc được liên kết disulfua đã được xác định. Tính đa dạng được tạo ra bằng cách sắp xếp lại biến thể tự nhiên được biểu hiện bởi họ các miền A. Để có thêm chi tiết, xem Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) và Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007). Transferrin là glycoprotein vận chuyển huyết thanh dạng monome. Transferrin có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách xen vào một trình tự peptit trong vòng bề mặt cho phép. Các ví dụ về khung transferrin được xử lý

kỹ thuật bao gồm Trans-body. Để có thêm chi tiết, xem J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999). Protein lặp ankyrin đã được thiết kế (DARPins) có nguồn gốc từ Ankyrin là họ các protein điều tiết sự gắn của protein xuyên màng vào bộ khung tế bào. Đoạn lặp ankyrin đơn là mô-típ 33 gốc bao gồm hai chuỗi xoắn alpha và vòng xoắn beta. Chúng có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách chọn ngẫu nhiên các gốc trong chuỗi xoắn alpha thứ nhất và vòng xoắn beta của mỗi đoạn lặp. Bề mặt chung gắn kết của chúng có thể được gia tăng bằng cách làm tăng số lượng mô-đun (phương pháp trưởng thành ái lực). Để có thêm chi tiết, xem J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) và J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) và US20040132028A1.

Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể bao gồm miền kháng thể biến đổi dạng monome đơn lẻ. Miền đơn thứ nhất có nguồn gốc từ miền biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể từ họ lạc đà camelid (nanobody hoặc mảnh $V_HH$). Hơn nữa, thuật ngữ kháng thể miền đơn bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng người tự trị (aVH) hoặc mảnh $V_{NAR}$ có nguồn gốc từ cá mập. Fibronectin là khung có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết với kháng nguyên. Adnectin bao gồm mạch chính của trình tự axit amin tự nhiên của miền thứ 10 có 15 đơn vị lặp của fibronectin người typ III (FN3). Ba vòng ở một đầu của phần kẹp giữa.beta. có thể được xử lý kỹ thuật để khiến cho Adnectin có thể nhận diện đặc hiệu đích trị liệu đang quan tâm. Để có thêm chi tiết, xem Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, WO2005056764 và US6818418B1. Peptit aptame là phân tử nhận diện tổ hợp mà bao gồm protein khung hằng định, thường là thioredoxin (TrxA) chứa vòng peptit biến đổi miễn cưỡng được xen vào ở vị trí hoạt tính. Để có thêm chi tiết, xem Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005). Vi thể có nguồn gốc từ vi protein có trong tự nhiên có độ dài từ 25 đến 50 axit amin chứa 3-4 cầu xystein - các ví dụ về vi protein bao gồm KalataBI và conotoxin và knottin. Vi protein có vòng có thể được xử lý kỹ thuật để bao gồm lên đến 25 axit amin mà không ảnh hưởng đến nếp uốn tổng thể của vi protein. Để có thêm chi tiết về miền knottin được xử lý kỹ thuật, xem WO2008098796.

"Phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết với cùng một epitop" dưới dạng phân tử chuẩn gốc dùng để chỉ phân tử gắn kết kháng nguyên mà phong bế 50% mức gắn kết của phân tử chuẩn gốc với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh hoặc nhiều

hơn, và ngược lại, phân tử chuẩn gốc phong bế 50% mức gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh hoặc nhiều hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "vị trí gắn kết kháng nguyên" dùng để chỉ phần phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với thể quyết định kháng nguyên. Cụ thể hơn, thuật ngữ "vị trí gắn kết kháng nguyên" chỉ phần kháng thể bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu với và bổ sung vào một phần hoặc tất cả kháng nguyên. Khi kháng nguyên này lớn, phân tử gắn kết kháng nguyên chỉ có thể gắn kết với một phần cụ thể của kháng nguyên, phần này được gọi là epitop. Vị trí gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bởi, ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi (còn được gọi là vùng biến đổi). Tốt hơn là, vị trí gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH). Theo một khía cạnh, vị trí gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết với kháng nguyên của nó và phong bế hoặc phong bế một phần chức năng của nó. Vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 hoặc TIM-3 bao gồm kháng thể và các mảnh của nó như được xác định thêm trong bản mô tả. Ngoài ra, vị trí gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm protein gắn kết kháng nguyên trong khung, ví dụ, miền gắn kết dựa trên protein lặp được thiết kế hoặc miền lặp được thiết kế (xem ví dụ WO 2002/020565).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "thể quyết định kháng nguyên" đồng nghĩa với "kháng nguyên" và "epitop," và dùng để chỉ vị trí (ví dụ, đoạn duỗi liền kề của axit amin hoặc cấu hình hình dạng tạo ra từ các vùng khác nhau của axit amin không liền kề) trên đại phân tử polypeptit mà gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết, tạo ra phức hợp gốc gắn kết kháng nguyên-kháng nguyên. Các thể quyết định kháng nguyên hữu ích có thể được tìm thấy, ví dụ, trên bề mặt của tế bào khối u, trên bề mặt của tế bào nhiễm virut, trên bề mặt của các tế bào mắc bệnh khác, trên bề mặt của tế bào miễn dịch, tự do trong huyết thanh trong máu, và/hoặc trong cơ chất ngoại bào (ECM). Protein hữu ích làm kháng nguyên trong bản mô tả có thể có dạng tự nhiên bất kỳ các protein từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên là protein người. Khi tham khảo protein cụ thể trong bản mô tả, thuật ngữ bao gồm "độ dài đầy đủ", protein chưa được xử lý cũng như dạng bất kỳ của protein thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật

ngữ này còn bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của protein, ví dụ, biến thể ghép hoặc biến thể alen.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là gắn kết có chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể phân biệt với tương tác không mong đợi hoặc không đặc hiệu. Khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên trong việc gắn kết với kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance-SPR) (được phân tích trên công cụ BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một phương án, phạm vi gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên với protein không liên quan là thấp hơn khoảng 10% phạm vi gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên như được xác định, ví dụ, bằng SPR. Theo một số phương án nhất định, phân tử gắn kết với kháng nguyên có hằng số phân ly (Kd) là $\leq$ 1μM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ $10^{-7}$M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ $10^{-7}$M đến $10^{-13}$M, ví dụ, từ $10^{-9}$M đến $10^{-13}$M).

"Ái lực" hoặc "ái lực gắn kết" dùng để chỉ độ mạnh của tổng toàn bộ các tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, kháng thể) và phần tử gắn kết đi kèm của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả, "ái lực gắn kết" dùng để chỉ ái lực gắn kết nội tại mà phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với phần tử Y đi kèm của nó thường có thể được tượng trưng bởi hằng số phân ly (Kd), là tỷ lệ của hằng số tốc độ phân ly và kết hợp (koff và kon, một cách tương ứng). Vì vậy, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, miễn là tỷ lệ của các hằng số tốc độ vẫn giữ nguyên. Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp phổ biến đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Một phương pháp cụ thể để đo ái lực là cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "ái lực cao" của kháng thể dùng để chỉ kháng thể có Kd bằng $10^{-9}$M hoặc thấp hơn và đặc biệt hơn nữa là $10^{-10}$M hoặc thấp hơn đối với kháng nguyên đích. Thuật ngữ "ái lực thấp" của kháng thể dùng để chỉ kháng thể có Kd bằng $10^{-8}$ hoặc cao hơn.

Kháng thể "trưởng thành ái lực" dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với kháng thể ban đầu không có các thay đổi như vậy, các thay đổi như vậy dẫn đến sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3" "kháng thể đặc hiệu kép gắn kết đặc hiệu PD1 và TIM-3", "phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép đặc hiệu đối với PD1 và TIM-3" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả và dùng để chỉ kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết PD1 và TIM-3 với ái lực đủ sao cho kháng thể này hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc chất trị liệu để hướng đích PD1 và TIM-3.

Thuật ngữ "PD1", còn được biết đến là Protein 1 gây chết tế bào theo chương trình, là protein màng typ I gồm 288 axit amin mà được mô tả lần đầu vào năm 1992 (Ishida et al., EMBO J., 11 (1992), 3887–3895). PD-1 là thành viên của họ CD28/CTLA-4 mở rộng gồm các chất điều hòa tế bào T và có hai phối tử, PD-L1 (B7-H1, CD274) và PD-L2 (B7-DC, CD273). Cấu trúc của protein bao gồm miền IgV ngoại bào sau đó đến vùng xuyên màng và đuôi nội bào. Đuôi nội bào chứa hai vị trí phosphoryl hóa được đặt trong mô-típ ức chế dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin và mô-típ chuyển đổi dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin, đề xuất rằng PD-1 điều hòa âm các tín hiệu TCR. Điều này nhất quán với sự gắn kết của SHP-1 và SHP-2 phosphataza với đuôi bào tương của PD-1 khi gắn kết với phối tử. Trong khi PD-1 không được biểu hiện trên tế bào T còn non, nó được điều hòa tăng sau khi hoạt hóa qua trung gian thụ thể tế bào T (TCR) và được quan sát trên cả tế bào T đã được hoạt hóa và tế bào T đã mất chức năng (Agata et al., Int. Immunology 8 (1996), 765-772). Các tế bào T đã mất chức năng này có phenotyp rối loạn chức năng và không thể đáp ứng một cách thích hợp. Mặc dù PD-1 có mô hình biểu hiện tương đối rộng, vai trò quan trọng nhất của nó là có khả năng làm thụ thể ức chế cộng trên tế bào T (Chinai et al, Trends in Pharmacological Sciences 36 (2015), 587-595). Vì vậy, các phương pháp trị liệu hiện có tập trung vào việc phong bế tương tác của PD-1 với các phối tử của nó để tăng cường đáp ứng tế bào T. Thuật ngữ "chết theo chương trình 1," "chết tế bào theo chương trình 1," "Protein PD-1," "PD-1," PD1," "PDCD1," "hPD-1" và "hPD-I" có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và bao gồm các biến thể, dạng đồng phân, đồng đẳng theo loài của PD-1 người, và các chất tương tự có

ít nhất một epitop chung với PD-1. Trình tự axit amin của PD1 người được thể hiện trong UniProt (www.uniprot.org) số gia nhập Q15116 (SEQ ID NO:89).

Thuật ngữ "kháng thể kháng PD1" và "kháng thể bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết với PD1" dùng để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết PD1, đặc biệt là PD1 polypeptit được biểu hiện trên bề mặt tế bào, có ái lực đủ sao cho kháng thể hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc chất trị liệu để hướng đích PD1. Theo một phương án, phạm vi gắn kết của kháng thể kháng PD1 với protein không phải PD1 không liên quan thấp hơn khoảng 10% phạm vi gắn kết của kháng thể với PD1 như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS) hoặc bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng hệ thống cảm biến sinh học như hệ thống Biacore®. Theo một số phương án nhất định, protein gắn kết kháng nguyên gắn kết với PD1 người có giá trị KD của ái lực gắn kết để gắn kết với PD1 người là ≤ 1μM, ≤ 100nM, ≤ 10nM, ≤ 1nM, ≤ 0,1nM, ≤ 0,01nM, hoặc ≤ 0,001nM (ví dụ, $10^{-8}$M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ $10^{-8}$M đến $10^{-13}$M, ví dụ, từ $10^{-9}$M đến $10^{-13}$M). Theo một phương án được ưu tiên, giá trị KD tương ứng của các ái lực gắn kết được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng miền ngoại bào (ECD) của PD1 người (PD1-ECD) đối với ái lực gắn kết PD1. Thuật ngữ "kháng thể kháng PD1" còn bao gồm kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết PD1 và kháng nguyên thứ hai.

Thuật ngữ "TIM3", viết tắt cho "phân tử chứa globulin miễn dịch của tế bào T và miền dịch nhầy muxin 3", còn được biết đến là TIM-3, HAVCR2, KIM-3, TIMD3, và FLJ14428, dùng để chỉ protein bề mặt tế bào đặc hiệu với tế bào trợ giúp T typ 1 mà điều hòa sự hoạt hóa của đại thực bào và độ nghiêm trọng của tình trạng viêm. TIM3 cũng liên quan đến bệnh ung thư, cụ thể là, liên quan đến tế bào gốc ung thư. Trình tự nucleotit và trình tự protein của TIM3 là đã biết đối với nhiều loài. Ví dụ, trình tự axit amin ở người có thể được tìm thấy trong Uniprot số tiếp cận Q8TDQ0 (SEQ ID NO:93). Protein người được đặc trưng bởi miền ngoại bào bao gồm miền giống Ig và miền dịch nhầy muxin (còn bao gồm vị trí glycosyl hóa liên kết với O và liên kết với N) bao gồm khoảng axit amin từ 22 đến 202, miền xuyên màng (axit amin từ 203 đến 223), và miền nội bào (bào tương) (axit amin từ 224 đến 301). Đối với protein TIM3 ở người được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 93, miền ngoại bào bao gồm khoảng axit amin từ 22 đến 202, miền xuyên màng bao gồm khoảng axit amin từ 203 đến 223, và miền bào tương bao gồm khoảng axit amin từ 224 đến 301. Thuật ngữ "TIM3" bao gồm các biến thể,

dạng đồng phân, đồng đẳng theo loài của TIM3 ở người, và các chất tương tự có ít nhất một epitop chung với TIM3.

Thuật ngữ "kháng thể kháng TIM3" và "kháng thể bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết với TIM3" dùng để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết TIM3, đặc biệt là TIM3 polypeptit được biểu hiện trên bề mặt tế bào, có ái lực đủ sao cho kháng thể hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc chất trị liệu để hướng đích TIM3. Theo một phương án, phạm vi gắn kết của kháng thể kháng TIM3 với protein không phải TIM3 không liên quan thấp hơn khoảng 10% phạm vi gắn kết của kháng thể với TIM3 như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS) hoặc bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng hệ thống cảm biến sinh học như hệ thống Biacore®. Theo một số phương án nhất định, protein gắn kết kháng nguyên gắn kết với TIM3 ở người có giá trị KD của ái lực gắn kết để gắn kết với TIM3 ở người là $\leq$ 1µM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ $10^{-8}$M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ $10^{-7}$M đến $10^{-13}$M, ví dụ, từ $10^{-9}$M đến $10^{-13}$M). Theo một phương án được ưu tiên, giá trị KD tương ứng của các ái lực gắn kết được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng miền ngoại bào (ECD) của TIM3 ở người (TIM3 -ECD) đối với ái lực gắn kết TIM3. Thuật ngữ "kháng thể kháng TIM3" còn bao gồm kháng thể đặc hiệu kép có khả năng gắn kết TIM3 và kháng nguyên thứ hai.

Kháng thể "phong bế" hoặc kháng thể "đối kháng" là kháng thể ức chế hoặc làm giảm hoạt tính sinh học của kháng nguyên nó gắn kết. Theo một số phương án, kháng thể phong bế hoặc kháng thể đối kháng ức chế hầu hết hoặc ức chế hoàn toàn hoạt tính sinh học của kháng nguyên. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế phong bế việc truyền tín hiệu qua PD- 1 và TIM-3 sao cho để khôi phục đáp ứng chức năng bởi tế bào T (ví dụ, sinh sôi, sản sinh xytokin, tiêu diệt tế bào đích) từ trạng thái rối loạn chức năng sang kích thích kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể liên quan đến sự gắn kết phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên. Miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách tương ứng) của kháng thể tự nhiên thường có các cấu trúc tương tự, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung làm việc bảo toàn (FR) và ba vùng siêu biến (HVR). Xem, ví dụ, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Miền

VH hoặc miền VL đơn lẻ có thể đủ thích hợp để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR," như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ mỗi một trong các vùng của miền biến đổi của kháng thể mà siêu biến về trình tự và/hoặc tạo ra các vòng được xác định cấu trúc ("vòng siêu biến"). Thông thường, các kháng thể bốn chuỗi tự nhiên bao gồm sáu HVR; ba HVR trong VH (H1, H2, H3), và ba HVR trong VL (L1, L2, L3). HVR thường bao gồm các gốc axit amin từ vòng siêu biến và/hoặc từ "vùng quyết định tính bổ sung" (CDR), vùng quyết định tính bổ sung có độ biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc liên quan đến sự nhận diện kháng nguyên. Các vòng siêu biến lấy làm ví dụ xuất hiện ở các gốc axit amin từ 26 đến 32 (L1), từ 50 đến 52 (L2), từ 91 đến 96 (L3), từ 26 đến 32 (H1), từ 53 đến 55 (H2), và từ 96 đến 101 (H3). (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Các CDR lấy làm ví dụ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3) xuất hiện ở các gốc axit amin từ 24 đến 34 của L1, từ 50 đến 56 của L2, từ 89 đến 97 của L3, từ 31 đến 35B của H1, từ 50 đến 65 của H2, và từ 95 đến 102 của H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Vùng siêu biến (HVR) còn được đề cập đến là vùng quyết định tính bổ sung (CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả có liên quan đến các phần của vùng biến đổi mà tạo ra vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng cụ thể này đã được mô tả trong Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và trong Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), trong đó các định nghĩa bao gồm sự trùng lặp hoặc các tập hợp con gồm các gốc axit amin khi được so sánh với nhau. Tuy nhiên, việc áp dụng từng định nghĩa để chỉ CDR của kháng thể hoặc các biến thể của nó được dự định nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được định nghĩa và được sử dụng trong bản mô tả. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm các CDR như được định nghĩa bởi mỗi một trong các tài liệu tham khảo được trích dẫn trên đây được nêu dưới đây trong Bảng A dưới dạng so sánh. Số lượng gốc chính xác mà bao gồm CDR cụ thể sẽ thay đổi tùy thuộc vào trình tự và kích thước của CDR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thường xác định gốc nào bao gồm CDR cụ thể tạo ra trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể.

Bảng A. Định nghĩa CDR[1]

| CDR | Kabat | Chothia | AbM[2] |
|---|---|---|---|
| $V_H$ CDR1 | 31-35 | 26-32 | 26-35 |
| $V_H$ CDR2 | 50-65 | 52-58 | 50-58 |
| $V_H$ CDR3 | 95-102 | 95-102 | 95-102 |
| $V_L$ CDR1 | 24-34 | 26-32 | 24-34 |
| $V_L$ CDR2 | 50-56 | 50-52 | 50-56 |
| $V_L$ CDR3 | 89-97 | 91-96 | 89-97 |

[1] Việc đánh số tất cả các định nghĩa CDR trong Bảng A là theo các quy ước đánh số được nêu bởi Kabat et al. (xem dưới đây).

[2] "AbM" với ký tự viết thường "b" như được sử dụng trong Bảng A dùng để chỉ các CDR như được xác định bởi phần mềm tạo mô hình kháng thể "AbM" của Oxford Molecular (Oxford Molecular's "AbM" antibody modeling software).

Kabat *et al.* cũng định nghĩa hệ thống đánh số cho trình tự vùng biến đổi mà ứng dụng được vào kháng thể bất kỳ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể quy định rõ ràng hệ thống "đánh số Kabat" này cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không dựa vào dữ liệu thử nghiệm bất kỳ ngoài chính trình tự đó. Như được sử dụng trong bản mô tả, "đánh số Kabat" dùng để chỉ hệ thống đánh số được nêu trong Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, các đề cập liên quan đến việc đánh số các vị trí gốc axit amin cụ thể trong vùng biến đổi của kháng thể là theo hệ thống đánh số Kabat.

Ngoại trừ CDR1 trong VH, các CDR thường bao gồm các gốc axit amin tạo ra vòng siêu biến. Các CDR cũng bao gồm "gốc quyết định tính đặc hiệu," hoặc "SDR," là các gốc tiếp xúc với kháng nguyên. SDR được chứa trong các vùng của CDR gọi là CDR-rút gọn (abbreviated-CDR), hoặc a-CDR. Các a-CDR lấy làm ví dụ (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, và a-CDR-H3) xuất hiện ở các gốc axit

amin từ 31 đến 34 của L1, từ 50 đến 55 của L2, từ 89 đến 96 của L3, từ 31 đến 35B của H1, từ 50 đến 58 của H2, và từ 95 đến 102 của H3. (Xem Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).) Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, gốc FR) được đánh số trong bản mô tả theo Kabat et al.

"Khung làm việc" hoặc "FR" dùng để chỉ các gốc trong miền biến đổi khác với gốc trong vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Khung làm việc ở người của thụ thể" nhằm các mục đích trong bản mô tả là khung làm việc bao gồm trình tự axit amin của khung làm việc trong miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung làm việc trong miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có nguồn gốc từ khung làm việc của globulin miễn dịch ở người hoặc khung làm việc liên ứng ở người, như được định nghĩa dưới đây. Khung làm việc ở người của thụ thể "có nguồn gốc từ" khung làm việc của globulin miễn dịch ở người hoặc khung làm việc liên ứng ở người có thể bao gồm cùng một trình tự axit amin của nó, hoặc nó có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lượng thay đổi axit amin là bằng 10 hoặc thấp hơn, 9 hoặc thấp hơn, 8 hoặc thấp hơn, 7 hoặc thấp hơn, 6 hoặc thấp hơn, 5 hoặc thấp hơn, 4 hoặc thấp hơn, 3 hoặc thấp hơn, hoặc 2 hoặc thấp hơn. Theo một số phương án, khung làm việc ở người của thụ thể trong VL là giống hệt về trình tự với trình tự khung làm việc của globulin miễn dịch ở người trong VL hoặc trình tự khung làm việc liên ứng ở người.

Thuật ngữ kháng thể "khảm" dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ một nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ một nguồn hoặc loài khác.

"Lớp" kháng thể dùng để chỉ loại miền hằng định hoặc vùng hằng định có trong chuỗi nặng của nó. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài trong số các lớp này còn có thể được chia tiếp thành các lớp con (isotyp), ví dụ, $IgG_1$, $IgG_2$, $IgG_3$, $IgG_4$, $IgA_1$, và $IgA_2$. Miền hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác của globulin miễn dịch được gọi là α, δ, ε, γ, và μ một cách tương ứng.

Kháng thể "được nhân hóa" dùng để chỉ kháng thể khảm bao gồm các gốc axit amin từ HVR không phải của người và các gốc axit amin từ FR người. Theo một số

phương án nhất định, kháng thể được nhân hóa bao gồm gần như tất cả của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các HVR (ví dụ, CDR) tương ứng với tất cả hoặc gần như tất cả các HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả các FR tương ứng với tất cả hoặc gần như tất cả các FR của kháng thể người. Kháng thể được nhân hóa tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người. "Dạng được nhân hóa" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, dùng để chỉ kháng thể đã trải qua quá trình nhân hóa. Các dạng khác của "kháng thể được nhân hóa" nằm trong phạm vi của sáng chế là các dạng trong đó vùng hằng định đã được cải biến theo hướng bổ sung hoặc thay đổi so với vùng hằng định của kháng thể ban đầu để tạo ra các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là về phương diện gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc (FcR).

Kháng thể "người" là kháng thể có trình tự axit amin mà tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể được sản sinh ra bởi người hoặc tế bào người hoặc có nguồn gốc từ nguồn không phải người sử dụng danh mục kháng thể người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể người khác. Định nghĩa về kháng thể người này đặc biệt loại trừ kháng thể được nhân hóa bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể gần như đồng nhất, tức là, các cá thể riêng lẻ bao gồm quần thể là giống hệt và/hoặc gắn kết với cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có mặt với các lượng nhỏ. Trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng kháng các thể quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng kháng một thể quyết định duy nhất trên kháng nguyên. Vì vậy, từ bổ nghĩa "đơn dòng" chỉ đặc tính của kháng thể là thu được từ quần thể gồm các kháng thể gần như đồng nhất, và không được hiểu là yêu cầu sản xuất ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần của locus globulin miễn dịch người, các

phương pháp này và các phương pháp được lấy làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "miền Fc" hoặc "vùng Fc" được sử dụng trong bản mô tả để định nghĩa vùng đầu tận C của chuỗi nặng của kháng thể mà chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc biến thể. Cụ thể, vùng Fc chuỗi nặng của IgG người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trình tự axit amin của chuỗi nặng luôn luôn có lysin đầu tận C, tuy nhiên các biến thể không có lysin đầu tận C cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Vùng Fc của IgG bao gồm miền CH2 của IgG và miền CH3 của IgG. "Miền CH2" của vùng Fc của IgG người thường kéo dài từ gốc axit amin ở khoảng vị trí 231 đến gốc axit amin ở khoảng vị trí 340. Theo một phương án, chuỗi hydrat cacbon được gắn vào miền CH2. Miền CH2 trong bản mô tả có thể là miền CH2 trình tự tự nhiên hoặc miền CH2 biến thể. "Miền CH3" bao gồm đoạn duỗi của các gốc từ đầu tận C đến miền CH2 trong vùng Fc (tức là từ gốc axit amin ở khoảng vị trí 341 đến gốc axit amin ở khoảng vị trí 447 của IgG). Vùng CH3 trong bản mô tả có thể là miền CH3 trình tự tự nhiên hoặc miền CH3 biến thể (ví dụ, miền CH3 có "phần lồi" ("phần phình") đã được đưa vào trong một chuỗi của nó và "hốc" ("phần lõm") đã được đưa vào tương ứng trong chuỗi còn lại của nó; xem patent Mỹ số 5,821,333, được kết hợp rõ ràng vào bản mô tả bằng cách viện dẫn). Miền CH3 biến thể như vậy có thể được sử dụng để thúc đẩy quá trình heterodime hóa của hai chuỗi nặng của kháng thể không giống hệt nhau như được mô tả trong bản mô tả. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ thống đánh số theo EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Công nghệ "phần phình vào phần lõm" được mô tả trong, ví dụ, US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Thông thường, phương pháp này bao gồm bước đưa phần lồi ("phần phình") ở mặt giao cắt của polypeptit thứ nhất và hốc ("phần lõm") tương ứng trong mặt giao cắt của polypeptit thứ hai vào, sao cho phần lồi có thể nằm trong hốc sao cho để thúc

đẩy sự hình thành heterodime và cản trở sự hình thành homodime. Phần lồi được xây dựng cấu trúc bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin nhỏ từ mặt giao cắt của polypeptit thứ nhất bằng các chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích thước giống hệt hoặc tương tự với phần lồi được tạo ra trong mặt giao cắt của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin lớn bằng các chuỗi bên nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin). Phần lồi và hốc có thể được tạo ra bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa các polypeptit, ví dụ, bằng kỹ thuật gây đột biến đặc hiệu điểm, hoặc bằng kỹ thuật tổng hợp peptit. Theo một phương án cụ thể, cải biến phần phình bao gồm thay thế axit amin T366W ở một trong hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc, và cải biến phần lõm bao gồm thay thế axit amin T366S, L368A và Y407V ở cấu trúc tiểu đơn vị còn lại trong hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc. Theo một phương án cụ thể khác, cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc bao gồm cải biến phần phình còn bao gồm thay thế axit amin S354C, và cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc bao gồm cải biến phần lõm còn bao gồm thay thế axit amin Y349C. Việc đưa hai gốc xystein này vào dẫn đến việc tạo ra cầu disulfua giữa hai cấu trúc tiểu đơn vị của vùng Fc, vì thế làm ổn định hơn nữa dime (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

"Vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch" được dự định là bao gồm các biến thể alen có trong tự nhiên của vùng Fc của globulin miễn dịch cũng như các biến thể có các thay đổi mà tạo ra các thay thế, bổ sung, hoặc làm khuyết nhưng về cơ bản không làm giảm khả năng của globulin miễn dịch trong việc điều tiết các chức năng tác động (như độc hại tế bào trong tế bào phụ thuộc kháng thể). Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được làm khuyết khỏi đầu tận N hoặc đầu tận C của vùng Fc của globulin miễn dịch mà về cơ bản không làm mất chức năng sinh học. Các biến thể như vậy có thể được chọn lọc theo các quy tắc chung đã biết trong lĩnh vực này sao cho để có tác động đến hoạt tính nhỏ nhất (xem, ví dụ, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)).

Thuật ngữ "chức năng tác động" dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể được quy cho vùng Fc của kháng thể, thay đổi theo isotyp của kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và tính độc hại tế bào phụ thuộc vào thể bổ sung (CDC), gắn kết thụ thể Fc, tính độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào trong tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tiết xytokin, hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức hợp miễn dịch bằng tế bào trình

diện kháng nguyên, điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B), và hoạt hóa tế bào B.

"Thụ thể Fc hoạt hóa" là thụ thể Fc mà sau khi tiếp hợp bởi vùng Fc của kháng thể tạo ra các sự kiện truyền tín hiệu mà kích thích tế bào mang thụ thể thực hiện các chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89). Thụ thể Fc hoạt hóa cụ thể là FcγRIIIa người (xem UniProt số gia nhập P08637, phiên bản 141).

Thuật ngữ "phần tử liên kết peptit" dùng để chỉ peptit bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường từ khoảng 2 đến 20 axit amin. Phần tử liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực này hoặc được mô tả trong bản mô tả này. Thích hợp là, phần tử liên kết peptit không miễn dịch là, ví dụ, phần tử liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$, trong đó "n" thường là số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường nằm trong khoảng từ 2 đến 4, đặc biệt là 2.

Thuật ngữ "được dung hợp" hoặc "được nối" có nghĩa là các thành phần (ví dụ, vị trí gắn kết kháng nguyên và miền Fc) được liên kết bằng liên kết peptit, trực tiếp hoặc thông qua một hoặc nhiều phần tử liên kết peptit.

Thuật ngữ "axit amin" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ nhóm axit carboxy α-amin có trong tự nhiên bao gồm alanin (ký hiệu ba chữ cái: ala, ký hiệu một chữ cái: A), arginin (arg, R), asparagin (asn, N), axit aspartic (asp, D), xystein (cys, C), glutamin (gln, Q), axit glutamic (glu, E), glyxin (gly, G), histidin (his, H), isoleuxin (ile, I), leuxin (leu, L), lysin (lys, K), metionin (met, M), phenylalanin (phe, F), prolin (pro, P), serin (ser, S), threonin (thr, T), tryptophan (trp, W), tyrosin (tyr, Y), và valin (val, V).

"Phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit (protein) chuẩn được định nghĩa là phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà giống hệt với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit chuẩn, sau khi sắp xếp các trình tự và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm đồng nhất trình tự tối đa, và không coi thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp xếp nhằm mục đích xác định phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau thuộc phạm vi hiểu biết trong lĩnh vực này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính bán trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN. SAWI hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể

xác định các thông số thích hợp để sắp xếp trình tự, bao gồm thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp xếp tối đa trên toàn bộ độ dài của các trình tự được so sánh. Tuy nhiên, nhằm các mục đích trong bản mô tả, các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được viết bởi Genentech, Inc., và mã nguồn được nộp với tài liệu sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ, Washington D.C., 20559, ở đó nó được đăng ký dưới đăng ký bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể mua được trên thị trường từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được dịch để sử dụng trên hệ thống vận hành UNIX, bao gồm UNIX số V4.0D. Tất cả các thông số so sánh trình tự được thiết lập bằng chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong các trường hợp mà ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin cho trước A đối với, với, hoặc ngược với trình tự axit amin cho trước B (mà có thể được diễn đạt khác đi là trình tự axit amin cho trước A có hoặc bao gồm % đồng nhất trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc ngược với trình tự axit amin cho trước B) được tính như sau:

100 lần phân số X/Y

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi là kết hợp giống hệt bằng chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 khi sắp xếp theo chương trình giữa A và B, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Hiểu được rằng khi độ dài của trình tự axit amin A không bằng với độ dài của trình tự axit amin B, % đồng nhất trình tự axit amin của A đối với B không bằng % đồng nhất trình tự axit amin của B đối với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác đi, tất cả các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả thu được như được mô tả trong đoạn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất biến thể trình tự axit amin của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế được nêu trong bản mô tả. Ví dụ, có thể mong đợi là cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể đặc hiệu kép. Biến thể trình tự axit amin của kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa phân tử, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, làm khuyết từ, và/hoặc xen vào và/hoặc thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của cải biến làm

khuyết, xen vào, và thay thế có thể được thực hiện để có được cấu tạo cuối cùng, với điều kiện cấu tạo cuối cùng này có các đặc tính mong đợi, ví dụ, gắn kết kháng nguyên. Các vị trí đang quan tâm để gây đột biến thay thế bao gồm các HVR và khung làm việc (FR). Thay thế bảo toàn được nêu trong Bảng B dưới tiêu đề "Thay thế được ưu tiên" và được mô tả thêm dưới đây có tham khảo chuỗi bên axit amin nhóm (1) đến (6). Thay thế axit amin có thể được đưa vào phân tử đang quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc về hoạt tính mong đợi, ví dụ, khả năng gắn kết kháng nguyên giữ được/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm đi, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Bảng B

| Gốc ban đầu | Thay thế lấy làm ví dụ | Thay thế được ưu tiên |
|---|---|---|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile | Val |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln; His; Asp, Lys; Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu; Asn | Glu |
| Cys (C) | Ser; Ala | Ser |
| Gln (Q) | Asn; Glu | Asn |
| Glu (E) | Asp; Gln | Asp |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin | Leu |
| Leu (L) | Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn | Arg |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile | Leu |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr | Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Val; Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin | Leu |

Các axit amin có thể được chia nhóm theo các tính chất chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) axit: Asp, Glu;

(4) bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các thay thế không bảo toàn sẽ tạo ra sự trao đổi một thành viên của một trong các nhóm này với một nhóm khác.

Thuật ngữ "biến thể trình tự axit amin" bao gồm các biến thể quan trọng trong đó có các thay thế axit amin trong một hoặc nhiều gốc của vùng siêu biến của phân tử gắn kết kháng nguyên ban đầu (ví dụ, kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể người). Thông thường, (các) biến thể thu được được chọn lọc để nghiên cứu sâu hơn sẽ có các cải biến (ví dụ, cải thiện) ở một số tính chất sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng lên, tính sinh miễn dịch giảm đi) so với phân tử gắn kết kháng nguyên ban đầu và/hoặc về cơ bản là sẽ giữ được một số tính chất sinh học nhất định của phân tử gắn kết kháng nguyên ban đầu. Biến thể thay thế lấy làm ví dụ là kháng thể đã được làm trưởng thành ái lực, có thể được tạo ra một cách thuận lợi, ví dụ, sử dụng kỹ thuật trưởng thành ái lực dựa trên việc biểu hiện thực khuẩn thể như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Nói một cách ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và phân tử gắn kết kháng nguyên biến thể được biểu hiện trên thực khuẩn thể và được sàng lọc về hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết). Theo một số phương án nhất định, cải biến thay thế, xen vào, hoặc làm khuyết có thể xảy ra trong một hoặc nhiều HVR miễn là các thay đổi như vậy về cơ bản không làm giảm khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên trong việc gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, thay thế bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả) mà về cơ bản không làm giảm ái lực gắn kết có thể được tạo ra trong HVR. Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc hoặc vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để gây đột biến được gọi là "gây đột biến quét alanin" như được mô tả trong Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Trong phương pháp này, gốc hoặc nhóm các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được nhận biết và được thay thế bằng axit amin tích điện trung tính

hoặc âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem tương tác giữa kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các thay thế khác có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin hiểu hiện tính nhạy chức năng với thay thế ban đầu. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-phân tử gắn kết kháng nguyên để nhận biết các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được hướng đích hoặc được loại bỏ để làm ứng viên để thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có chứa các tính chất mong đợi hay không.

Biến thể xen trình tự axit amin vào bao gồm dung hợp đầu tận amin và/hoặc carboxyl nằm trong khoảng độ dài từ một gốc đến polypeptit chứa hàng trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như biến thể xen nội bộ trình tự vào của một hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về biến thể xen vào đầu tận bao gồm kháng thể đặc hiệu kép có gốc metionyl đầu tận N. Các biến thể xen vào khác trong phân tử bao gồm dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C với polypeptit mà làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một số khía cạnh nhất định, kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất trong bản mô tả được làm thay đổi để làm tăng hoặc làm giảm phạm vi mà kháng thể được glycosyl hóa. Biến thể glycosyl hóa của phân tử có thể thu được một cách thuận lợi bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ, ví dụ hydrat cacbon được gắn vào miền Fc có thể được làm thay đổi. Kháng thể tự nhiên được sản xuất bằng tế bào động vật có vú thường bao gồm oligosacarit phân thành hai nhánh thường được gắn bởi liên kết N với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem, ví dụ, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Oligosacarit có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn vào GlcNAc trong "thân" của cấu trúc oligosacarit hai nhánh. Theo một số phương án, các cải biến của oligosacarit trong kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được tạo ra để tạo ra các biến thể có một số tính chất cải thiện nhất định. Theo một khía cạnh, các biến thể của kháng thể đặc hiệu kép được nêu có cấu trúc hydrat cacbon thiếu fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Các biến thể fucosyl hóa như vậy có thể có chức năng ADCC cải thiện, xem ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.) hoặc US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các biến thể khác của kháng

thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các biến thể có oligosacarit đã cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai nhánh được gắn vào vùng Fc được cắt đôi bằng GlcNAc. Các biến thể như vậy có thể có chức năng fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC cải thiện, xem ví dụ WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patent Mỹ số 6,602,684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Các biến thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc cũng được đề xuất. Các biến thể kháng thể như vậy có thể có chức năng CDC cải thiện và được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

Theo một số khía cạnh nhất định, có thể mong đợi là tạo ra biến thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, ví dụ, "thioMAb," trong đó một hoặc nhiều gốc của phân tử này được thay thế bằng gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thay thế xuất hiện ở các vị trí dễ tiếp cận của phân tử đó. Bằng cách thay thế các gốc này bằng xystein, từ đó nhóm thiol dễ phản ứng được đặt nằm ở các vị trí dễ tiếp cận của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể với các gốc khác, như các gốc dược chất hoặc gốc phần tử liên kết-dược chất, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch. Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc sau có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số theo Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số theo EU) của vùng Fc của chuỗi nặng. Phân tử gắn kết kháng nguyên được xử lý kỹ thuật bằng xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,521,541.

Theo một số khía cạnh nhất định, kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất trong bản mô tả còn có thể được cải biến thêm để chứa các gốc không chứa protein bổ sung mà đã biết trong lĩnh vực này và dễ dàng có sẵn. Các gốc thích hợp để dẫn xuất hóa kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở polyme hòa tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về polyme hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, etylen/maleic anhydrit copolyme, polyaminoaxit (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, propropylen glycol homopolyme, prolypropylen oxit/etylen oxit co-polyme, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinylic, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có

ưu điểm trong sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme này có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể được phân nhánh hoặc không được phân nhánh. Số lượng polyme được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn, chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nhìn chung, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để dẫn xuất hóa có thể được xác định dựa trên các yếu tố cần cân nhắc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tính chất cụ thể hoặc các chức năng của kháng thể cần được cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể đặc hiệu kép có được sử dụng trong liệu pháp trị liệu trong các điều kiện được xác định trước hay không, v.v..

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các thể liên hợp của kháng thể và gốc không chứa protein có thể được gia nhiệt theo hướng chọn lọc bằng cách tiếp xúc với bức xạ. Theo một phương án, gốc không chứa protein là ống nano cacbon (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước sóng không gây hại cho các tế bào bình thường, nhưng gia nhiệt gốc không chứa protein đến nhiệt độ mà tại đó các tế bào gần với gốc không chứa protein trong kháng thể bị tiêu diệt.

"Thể liên hợp miễn dịch" là kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều (các) phân tử khác loại, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, chất gây độc tế bào.

Thuật ngữ "polynucleotit" dùng để chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ, ARN thông tin (mRNA), ARN có nguồn gốc từ virut, hoặc ADN trong plasmit (pDNA). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodieste thông thường hoặc liên kết không thông thường (ví dụ, liên kết amit, như được phát hiện trong axit nucleic của peptit (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" dùng để chỉ một hoặc nhiều phần axit nucleic bất kỳ, ví dụ, mảnh ADN hoặc mảnh ARN, có trong polynucleotit.

Thuật ngữ phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit "được phân lập" được dự định là phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, đã được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa polypeptit được chứa trong vectơ được coi là được phân lập theo các mục đích của sáng chế. Các ví dụ khác về polynucleotit được phân lập bao gồm polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong các tế bào chủ khác loại hoặc polynucleotit được tinh chế (một phần hoặc hầu hết) trong dung dịch. Polynucleotit được phân lập bao gồm phân tử polynucleotit được chứa trong các tế bào thường chứa phân tử polynucleotit, nhưng phân tử polynucleotit có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở

vị trí nhiễm sắc thể mà khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó. Phân tử ARN được phân lập bao gồm thể phiên mã ARN in vivo hoặc in vitro theo sáng chế, cũng như dạng chuỗi dương và âm, và dạng chuỗi kép. Polynucleotit được phân lập hoặc axit nucleic được phân lập theo sáng chế còn bao gồm các phân tử được tạo ra bằng cách tổng hợp. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể bao gồm thành phần điều hòa như gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, hoặc gen kết thúc phiên mã.

Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất, ví dụ, 95% "giống hệt" với trình tự nucleotit chuẩn theo sáng chế, dự định rằng trình tự nucleotit của polynucleotit giống hệt với trình tự chuẩn ngoại trừ là trình tự polynucleotit có thể bao gồm lên đến năm đột biến điểm trong mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit chuẩn. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit giống hệt ít nhất 95% so với trình tự nucleotit chuẩn, lên đến 5% nucleotit trong trình tự chuẩn có thể được làm khuyết hoặc được thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc một số nucleotit lên đến 5% trong tổng số nucleotit trong trình tự chuẩn có thể được xen vào trình tự chuẩn. Các thay đổi của trình tự chuẩn này có thể xảy ra ở vị trí tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit chuẩn hoặc ở vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng đó, nằm rải rác riêng lẻ giữa các gốc trong trình tự chuẩn hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự chuẩn. Là một vấn đề thực tiễn, liệu trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ có ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% giống hệt với trình tự nucleotit theo sáng chế có thể thường được xác định bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình nêu trên đối với polypeptit (ví dụ, ALIGN-2).

Thuật ngữ "cát-xét biểu hiện" dùng để chỉ polynucleotit được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc tổng hợp, với dãy thành phần axit nucleic cụ thể mà cho phép phiên mã axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Cát-xét biểu hiện tái tổ hợp có thể được kết hợp vào plasmit, nhiễm sắc thể, ADN ty thể, ADN plastit, virut, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, phần cát-xét biểu hiện tái tổ hợp của vectơ biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần được phiên mã và gen khởi đầu. Theo một số phương án nhất định, cát-xét biểu hiện theo sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "vectơ" hoặc "vectơ biểu hiện" đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và dùng để chỉ phân tử ADN được sử dụng để đưa vào và định hướng sự biểu hiện của gen đặc hiệu mà nó được liên kết điều khiển được trong tế bào đích. Thuật ngữ bao gồm

vectơ dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ mà nó đã được đưa vào. Vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện. Vectơ biểu hiện cho phép phiên mã một lượng lớn ARN thông tin ổn định. Mỗi khi vectơ biểu hiện ở bên trong tế bào đích, phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bằng gen được sản xuất bằng cơ chế phiên mã tế bào và/hoặc dịch mã tế bào. Theo một phương án, vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ," và "môi trường nuôi cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào, bao gồm thế hệ con của các tế bào này. Tế bào chủ bao gồm "thể biến nạp" và "tế bào đã được biến nạp," bao gồm tế bào đã được biến nạp ban đầu và thế hệ con có nguồn gốc từ đó mà không quan tâm đến số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể không hoàn toàn giống hệt về thành phần axit nucleic so với tế bào ban đầu, mà có thể chứa các đột biến. Thế hệ con đột biến có chức năng hoặc hoạt tính sinh học giống như được sàng lọc hoặc được chọn lọc trong tế bào đã được biến nạp ban đầu được bao gồm trong bản mô tả. Tế bào chủ là kiểu hệ tế bào bất kỳ mà có thể được sử dụng để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. Cụ thể, tế bào chủ là tế bào chủ nhân rải rác hoặc nhân điển hình. Tế bào chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ tế bào được nuôi cấy của động vật có vú, như tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào u tủy YO, tế bào u tủy ở chuột nhắt P3X63, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật, chỉ để liệt kê một số ít, mà còn cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật được nuôi cấy hoặc mô động vật.

"Lượng hữu hiệu" của một chất dùng để chỉ lượng cần thiết để có được thay đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà nó được dùng.

"Lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu" của một chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở các liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trị liệu hoặc phòng ngừa mong muốn. Lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của một chất ví dụ, loại bỏ, làm giảm, trì hoãn, tối thiểu hóa hoặc ngăn ngừa các tác động bất lợi của bệnh.

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

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

"Tá dược dược dụng" dùng để chỉ một thành phần trong dược phẩm, khác với thành phần hoạt tính, mà không độc đối với đối tượng. Tá dược dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đệm, chất ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ "tờ rời kèm trong bao gói" được sử dụng để chỉ các chỉ dẫn thường được bao gồm trong các bao gói bán trên thị trường chứa sản phẩm trị liệu, chứa thông tin về các chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

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

Thuật ngữ "bệnh ung thư" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ các bệnh tăng sinh, như u lympho, bệnh bạch cầu lympho bào, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào vách phế nang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u melanin da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng,

bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư vùng dạ dày, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom ống dẫn trứng, caxinom nội mạc tử cung, caxinom cổ tử cung, caxinom âm đạo, caxinom âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacom mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, caxinom tế bào thận, caxinom bể thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư mật, khối u ở hệ thần kinh trung ương (CNS), khối u tủy sống, u thần kinh đệm thân não, u nguyên bào thần kinh đệm đa hình, u não tế bào hình sao, u tế bào schwan, u màng nội tủy, u nguyên bào tủy, u màng não tủy, caxinom tế bào vảy, u tuyến yên và sacom Ewings, bao gồm các phiên bản khó chữa của bệnh ung thư bất kỳ trong số các bệnh ung thư nêu trên, hoặc hỗn hợp của một hoặc nhiều bệnh ung thư nêu trên.

Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3, có các tính chất đặc biệt có lợi như khả năng sản sinh, độ ổn định, ái lực gắn kết, hoạt tính sinh học, sự hướng đích đặc hiệu một số tế bào T nhất định, hiệu suất hướng đích và độ độc giảm. Cụ thể, đây là các kháng thể đặc hiệu kép, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với PD1 với ái lực cao và gắn kết với TIM3 với ái lực thấp.

A. Kháng thể đặc hiệu kép lấy làm ví dụ mà gắn kết với PD1 và TIM-3

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:1,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:12,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6; hoặc

(b) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22; hoặc

(c) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30, và

(iv) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:31; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm

miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:1,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:12,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm:

miền VH bao gồm:

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm:

miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó:

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24, hoặc

(f) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, hoặc

(g) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, hoặc

(h) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 là kháng thể người, kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể khảm. Đặc biệt, đó là kháng thể được nhân hóa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép được nhân hóa bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm

trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm:

miền VH bao gồm:

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm:

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm:

miền VH bao gồm:

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm:

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và

miền VL bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49, và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49, và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 có hóa trị hai. Điều này có nghĩa là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm một vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và một vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3 (mô hình 1+1).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực thấp và gắn kết với PD1 với ái lực cao. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3,

trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 50 lần khi so với mức gắn kết với PD1, đặc biệt hơn là với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 100 lần khi so với mức gắn kết với PD1. Theo một phương án được ưu tiên, ái lực gắn kết (KD) được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (như được mô tả trong ví dụ, Ví dụ 12.)

Vì thế, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó:

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 với ái lực cao bao gồm:

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 với ái lực thấp bao gồm:

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 với ái lực cao bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 với ái lực thấp bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền Fc, mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3.

Cụ thể, miền Fc là miền IgG, cụ thể hơn là, miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, bao gồm:

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:69.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:69.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, bao gồm chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68, chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:69.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 có hóa trị bốn. Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm hai vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và hai vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3 (mô hình 2+2).

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm (a) hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng của kháng thể bao gồm hai mảnh Fab bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3, và

(b) hai mảnh Fab bổ sung bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1, trong đó mỗi một trong các mảnh Fab bổ sung này được nối thông qua phần tử liên kết peptit với đầu tận C của các chuỗi nặng trong mục (a).

Theo một khía cạnh cụ thể, phần tử liên kết peptit là $(G4S)_4$. Theo một khía cạnh khác, hai mảnh Fab bổ sung bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 là các mảnh Fab cắt chéo trong đó miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau và mỗi chuỗi VL-CH được nối thông qua phần tử liên kết peptit với đầu tận C của các chuỗi nặng trong mục (a).

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, bao gồm

(a) hai chuỗi nặng, mỗi chuỗi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 70, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:72, hoặc

(b) hai chuỗi nặng, mỗi chuỗi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 73, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 74, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:75, hoặc

(c) hai chuỗi nặng, mỗi chuỗi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:78.

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

Theo một số khía cạnh nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 ở người) bao gồm cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Đoạn sau đây mô tả các phương án được ưu tiên về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm cải biến miền Fc làm giảm khả năng gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc, đặc biệt là đối với thụ thể Fcγ. Cụ thể, miền Fc thuộc phân nhóm IgG1 người có đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Miền Fc mang lại các tính chất dược động học ưu thế cho kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, bao gồm thời gian bán thải trong huyết thanh lâu mà góp phần vào quá trình tích tụ tốt trong mô đích và tỷ lệ phân bố mô-máu ưu thế. Tuy nhiên, đồng thời nó có thể dẫn đến việc hướng đích không mong đợi của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế đến các tế bào biểu hiện thụ thể Fc thay vì đến các tế bào mang kháng nguyên được ưu tiên. Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm đi và/hoặc chức năng tác động giảm đi, so với miền Fc IgG tự nhiên, đặc biệt là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4. Đặc biệt hơn, miền Fc là miền Fc của IgG1.

Theo một khía cạnh như vậy, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc này) thể hiện ái lực gắn kết đối với thụ thể Fc thấp hơn 50%, tốt hơn là thấp hơn 20%, tốt hơn nữa là thấp hơn 10% và tốt nhất là thấp hơn 5%, so với miền Fc của IgG1 tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc của IgG1 tự nhiên), và/hoặc chức năng tác động thấp hơn 50%, tốt hơn là thấp hơn 20%, tốt hơn nữa là thấp hơn 10% và tốt nhất là thấp hơn 5%, so với miền Fc của IgG1 tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc của IgG1 tự nhiên). Theo một khía cạnh, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc này) về cơ bản không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc cảm ứng chức năng tác động. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ người hoạt tính, cụ thể hơn là FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa người, cụ thể nhất là FcγRIIIa người. Theo một khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc ức chế. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ người ức chế, cụ thể hơn là

FcγRIIB người. Theo một khía cạnh, chức năng tác động là một hoặc nhiều chức năng trong số CDC, ADCC, ADCP, và tiết xytokin. Theo một khía cạnh cụ thể, chức năng tác động là ADCC. Theo một khía cạnh, miền Fc có ái lực gắn kết về cơ bản là tương tự với thụ thể Fc mới sinh (FcRn), so với miền Fc của IgG1 tự nhiên. Đạt được gắn kết về cơ bản là tương tự với FcRn khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc nêu trên) có ái lực gắn kết lớn hơn khoảng 70%, đặc biệt là lớn hơn khoảng 80%, đặc biệt hơn là lớn hơn khoảng 90% ái lực gắn kết của miền Fc của IgG1 tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc của IgG1 tự nhiên) đối với FcRn.

Theo một khía cạnh cụ thể, miền Fc được xử lý kỹ thuật để có ái lực gắn kết giảm với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Theo một khía cạnh cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Thông thường, một hoặc nhiều đột biến axit amin giống nhau có mặt trong mỗi một trong hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc. Theo một khía cạnh, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc. Theo một khía cạnh khác, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất là 2 lần, ít nhất là 5 lần, hoặc ít nhất là 10 lần. Theo một khía cạnh, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc được xử lý kỹ thuật có ái lực gắn kết thấp hơn 20%, đặc biệt là thấp hơn 10%, đặc biệt hơn là thấp hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc so với kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo các khía cạnh khác, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc ức chế. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ người ức chế, cụ thể hơn là FcγRIIB người. Theo một số khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ người hoạt tính, cụ thể hơn là FcγRIIIa người, FcγRI hoặc FcγRIIa, cụ thể nhất là FcγRIIIa người. Tốt hơn là, khả năng gắn kết với mỗi một trong các thụ thể này được làm giảm. Theo một số khía cạnh, ái lực gắn kết với thành phần bổ sung, cụ thể là ái lực gắn kết với C1q, cũng được làm giảm. Theo một khía cạnh, ái lực gắn kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) không được làm giảm. Khả năng gắn kết về cơ bản là tương tự với FcRn, tức là sự duy trì ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể này, đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn

kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc này) có ái lực gắn kết lớn hơn khoảng 70% ái lực gắn kết của dạng không được xử lý kỹ thuật của miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm dạng không được xử lý kỹ thuật này của miền Fc) với FcRn. Miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc này, có thể có ái lực lớn hơn khoảng 80% và thậm chí là lớn hơn khoảng 90% ái lực này. Theo một số phương án nhất định, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế được xử lý kỹ thuật để có chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Chức năng tác động giảm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chức năng trong số sau: tính độc hại tế bào phụ thuộc vào thể bổ sung (CDC) giảm đi, tính độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) giảm đi, thực bào trong tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) giảm đi, tiết xytokin giảm đi, mức hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức hợp miễn dịch bởi các tế bào trình diện kháng nguyên giảm đi, gắn kết với tế bào NK giảm đi, gắn kết với đại thực bào giảm đi, gắn kết với bạch cầu đơn nhân giảm đi, gắn kết với tế bào nhiều dạng nhân giảm đi, mức truyền tín hiệu trực tiếp cảm ứng quá trình chết tế bào theo chương trình giảm đi, mức độ trưởng thành tế bào đuôi gai giảm đi, hoặc mồi tế bào T giảm đi.

Kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm các kháng thể có cải biến thay thế của một hoặc nhiều gốc của vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6,737,056). Các thể đột biến Fc như vậy bao gồm thể đột biến Fc có các cải biến thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin trong số 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến còn gọi là thể đột biến Fc "DANA" có cải biến thay thế của gốc 265 và 297 thành alanin (patent Mỹ số 7,332,581). Một số biến thể kháng thể nhất định có khả năng gắn kết cải thiện hoặc giảm bớt với FcR được mô tả. (ví dụ patent Mỹ số 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

Theo một khía cạnh của sáng chế, miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin ở vị trí của E233, L234, L235, N297, P331 và P329. Theo một số khía cạnh, miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin L234A và L235A ("LALA"). Theo một phương án như vậy, miền Fc là miền Fc của IgG1, đặc biệt là miền Fc của IgG1 ở người. Theo một khía cạnh, miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin ở vị trí P329. Theo một khía cạnh cụ thể hơn, cải biến thay thế axit amin là P329A hoặc P329G, đặc biệt là P329G. Theo một phương án, miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin ở vị trí P329 và cải biến thay

thế axit amin khác được chọn từ nhóm bao gồm E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo các phương án cụ thể hơn, miền Fc bao gồm đột biến axit amin L234A, L235A và P329G ("P329G LALA"). Tổ hợp "P329G LALA" của các cải biến thay thế axit amin gần như loại bỏ hoàn toàn khả năng gắn kết của thụ thể Fcγ với miền Fc của IgG1 ở người, như được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Quốc tế số WO 2012/130831 A1. Tài liệu này cũng mô tả phương pháp tạo ra miền Fc của thể đột biến này và phương pháp xác định các tính chất của nó như gắn kết thụ thể Fc hoặc chức năng tác động. Kháng thể như vậy là IgG1 có đột biến L234A và L235A hoặc có đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số EU trong Kabat et al, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm (tất cả các vị trí theo chỉ số EU của Kabat) (i) vùng Fc homodime thuộc phân nhóm IgG1 người tùy ý có các đột biến P329G, L234A và L235A, hoặc (ii) vùng Fc homodime thuộc lớp con IgG4 người tùy ý có các đột biến P329G, S228P và L235E, hoặc (iii) vùng Fc homodime thuộc phân nhóm IgG1 người tùy ý có các đột biến P329G, L234A, L235A, I253A, H310A, và H435A, hoặc tùy ý có các đột biến P329G, L234A, L235A, H310A, H433A, và Y436A, hoặc (iv) vùng Fc heterodime trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W và Y349C, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W và S354C, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C, hoặc (v) vùng Fc heterodime thuộc phân nhóm IgG1 người trong đó cả hai polypeptit của vùng Fc đều bao gồm đột biến P329G, L234A và L235A và một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W và Y349C, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W và S354C, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C.

Theo một khía cạnh, miền Fc là miền Fc của IgG4. Theo một phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG4 bao gồm cải biến thay thế axit amin ở vị trí S228

(đánh số theo Kabat), đặc biệt là cải biến thay thế axit amin S228P. Theo một phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG4 bao gồm cải biến thay thế axit amin L235E và S228P và P329G. Cải biến thay thế axit amin này làm giảm sự trao đổi nhánh Fab in vivo của kháng thể IgG4 (xem Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép, bao gồm (tất cả các vị trí theo chỉ số EU của Kabat) vùng Fc heterodime thuộc lớp con IgG4 người trong đó cả hai polypeptit của vùng Fc đều bao gồm đột biến P329G, S228P và L235E và một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W và Y349C, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc trong đó một polypeptit của vùng Fc bao gồm đột biến T366W và S354C, và polypeptit còn lại của vùng Fc bao gồm đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C.

Kháng thể có thời gian bán thải gia tăng và khả năng gắn kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) được cải thiện, chịu trách nhiệm việc truyền IgG mẹ sang phôi thai (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, và Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), được mô tả trong US 2005/0014934. Các kháng thể này bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều cải biến thay thế trong đó làm cải thiện khả năng gắn kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm các biến thể có cải biến thay thế ở một hoặc nhiều gốc của vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, cải biến thay thế gốc của vùng Fc 434 (patent Mỹ số 7,371,826). Xem cả trong Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5,648,260; US 5,624,821; và WO 94/29351 đề cập đến các ví dụ khác về biến thể vùng Fc.

Mức gắn kết với thụ thể Fc có thể dễ dàng được xác định, ví dụ, bằng phương pháp ELISA, hoặc bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng công cụ tiêu chuẩn như công cụ BIAcore (GE Healthcare), và thụ thể Fc như có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Thử nghiệm gắn kết thích hợp như vậy được mô tả trong bản mô tả này. Theo một cách khác, ái lực gắn kết của miền Fc hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào bao gồm miền Fc đối với thụ thể Fc có thể được ước lượng bằng cách sử dụng dòng tế bào đã biết để biểu hiện các thụ thể Fc cụ thể, như tế bào NK người biểu hiện thụ thể FcγIIIa. Chức năng tác động của miền Fc,

hoặc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm miền Fc, có thể được đo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Thử nghiệm thích hợp để đo ADCC được mô tả trong bản mô tả này. Các ví dụ khác về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm được mô tả trong patent Mỹ số 5,500,362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) và Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patent Mỹ số 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo một cách khác, các phương pháp trong thử nghiệm không hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm độ độc hại tế bào không hoạt tính phóng xạ ACTI™ để phân tích tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm độ độc hại tế bào không hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Các tế bào tác động hữu ích cho thử nghiệm bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell-PBMC) và tế bào diệt tự nhiên (Natural Killer-NK). Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ trong mô hình động vật như mô hình được đề cập đến trong Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

Cải biến miền Fc thúc đẩy sự heterodime hóa

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm các vị trí gắn kết kháng nguyên khác nhau, được dung hợp với một cấu trúc hoặc cấu trúc còn lại trong số hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc, vì thế hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc có thể được chứa trong hai chuỗi polypeptit không giống hệt. Sự đồng biểu hiện tái tổ hợp của các polypeptit này và sự dime hóa sau đó tạo ra một vài tổ hợp có thể có của hai polypeptit. Do đó, để cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế trong sản xuất tái tổ hợp, thuận lợi là đưa một cải biến thúc đẩy sự kết hợp của các polypeptit được mong đợi vào trong miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế.

Do đó, theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Vị trí của tương tác protein-protein bao quát nhất giữa hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc IgG

người là trong miền CH3 của miền Fc. Vì vậy, theo một khía cạnh, cải biến nêu trên là trong miền CH3 của miền Fc.

Theo một khía cạnh cụ thể, cải biến nêu trên còn được gọi là cải biến "phần phình vào phần lõm", bao gồm cải biến "phần phình" ở một trong hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc và cải biến "phần lõm" ở cấu trúc tiểu đơn vị còn lại trong hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc. Vì vậy, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm các phần phình và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm các phần lõm theo phương pháp phần phình vào phần lõm. Theo một khía cạnh cụ thể, cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin S354C và T366W (đánh số theo EU) và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin Y349C, T366S và Y407V (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Công nghệ phần phình vào phần lõm được mô tả trong, ví dụ, US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Thông thường, phương pháp này bao gồm bước đưa phần lồi ("phần phình") ở mặt giao cắt của polypeptit thứ nhất và hốc ("phần lõm") tương ứng ở mặt giao cắt của polypeptit thứ hai vào, sao cho phần lồi có thể được đặt trong hốc sao cho để thúc đẩy sự hình thành heterodime và cản trở sự hình thành homodime. Phần lồi được xây dựng cấu trúc bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin nhỏ từ mặt giao cắt của polypeptit thứ nhất bằng các chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích thước giống hệt hoặc tương tự với phần lồi được tạo ra ở mặt giao cắt của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin lớn bằng các chuỗi bên nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin).

Do đó, theo một khía cạnh, trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất mà có thể đặt được trong hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai mà phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất có thể đặt được

trong đó. Phần lồi và hốc có thể được tạo ra bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa polypeptit, ví dụ, bằng kỹ thuật gây đột biến đặc hiệu điểm, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Theo một khía cạnh cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Ngoài ra, theo một khía cạnh, trong cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A).

Ngoài ra, theo một khía cạnh khác nữa, trong cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc, gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C), và ngoài ra, trong cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C). Việc đưa hai gốc xystein này vào dẫn đến việc tạo ra cầu disulfua giữa hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc, làm ổn định thêm dime (Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). Theo một khía cạnh cụ thể, cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin S354C và T366W (đánh số theo EU) và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin Y349C, T366S và Y407V (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Nhưng cả các công nghệ phần phình trong phần lõm khác như được mô tả trong EP 1 870 459, có thể được sử dụng theo hướng thay thế hoặc bổ sung. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm đột biến R409D và K370E trong miền CH3 của "chuỗi các phần phình" và đột biến D399K và E357K trong miền CH3 của "chuỗi phần lõm" (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm đột biến T366W trong miền CH3 của "chuỗi các phần phình" và đột biến T366S, L368A và Y407V trong miền CH3 của "chuỗi phần lõm" và còn cả đột biến R409D và K370E trong miền CH3 của "chuỗi các phần phình" và đột biến D399K và E357K trong miền CH3 của "chuỗi phần lõm" (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm đột biến Y349C và T366W trong một trong hai miền CH3 và đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong hai miền CH3, hoặc kháng thể đa đặc hiệu bao gồm đột biến Y349C và T366W trong một trong hai miền CH3 và đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V

trong miền còn lại trong hai miền CH3 và còn cả đột biến R409D và K370E trong miền CH3 của "chuỗi các phần phình" và đột biến D399K và E357K trong miền CH3 của "chuỗi phần lõm" (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh thay thế, cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất và thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến điều tiết các tác dụng điều khiển tĩnh điện, ví dụ như được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Quốc tế số WO 2009/089004. Thông thường, phương pháp này bao gồm bước thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở mặt giao cắt của hai cấu trúc tiểu đơn vị của miền Fc bằng các gốc axit amin tích điện sao cho sự hình thành homodime trở nên không ưu thế về mặt tĩnh điện nhưng sự heterodime hóa lại ưu thế về mặt tĩnh điện.

Ngoài "công nghệ phần phình vào phần lõm", các kỹ thuật khác để cải biến các miền CH3 của chuỗi nặng của kháng thể đa đặc hiệu để thúc đẩy sự heterodime hóa là đã biết trong lĩnh vực này. Các công nghệ này, đặc biệt là các công nghệ được mô tả trong WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 và WO 2013/096291 được dự định trong bản mô tả là các phương án thay thế cho "công nghệ phần phình vào phần lõm" kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một khía cạnh, trong kháng thể đặc hiệu kép, phương pháp được mô tả trong EP 1870459 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Phương pháp này là dựa trên việc đưa các axit amin tích điện với điện tích trái dấu vào ở các vị trí axit amin đặc hiệu trong mặt giao cắt miền CH3/CH3 giữa cả chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai.

Do đó, theo khía cạnh này trong cấu trúc bậc ba của kháng thể đa đặc hiệu, miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH3 của chuỗi nặng thứ hai tạo ra mặt giao cắt được đặt nằm giữa các miền CH3 của kháng thể tương ứng, trong đó mỗi trình tự axit amin tương ứng của miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất và trình tự axit amin của miền CH3 của chuỗi nặng thứ hai bao gồm tập hợp các axit amin được đặt nằm trong mặt giao cắt trong cấu trúc bậc ba của kháng thể, trong đó từ tập hợp các axit amin được đặt nằm trong mặt giao cắt trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin thứ nhất được thay thế bằng axit amin tích điện dương và từ tập hợp các axit amin được đặt nằm trong

mặt giao cắt trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin thứ hai được thay thế bằng axit amin tích điện âm. Kháng thể đặc hiệu kép theo khía cạnh này cũng được đề cập đến trong bản mô tả là "kháng thể đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật CH3(+/-)" (trong đó ký tự viết tắt "+/-" tượng trưng cho các axit amin tích điện dương được đưa vào trong các miền CH3 tương ứng).

Theo một khía cạnh, trong kháng thể đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật CH3(+/-), axit amin tích điện dương được chọn từ K, R và H, và axit amin tích điện âm được chọn từ E hoặc D.

Theo một khía cạnh, trong kháng thể đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật CH3(+/-), axit amin tích điện dương được chọn từ K và R, và axit amin tích điện âm được chọn từ E hoặc D.

Theo một khía cạnh, trong kháng thể đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật CH3(+/-), axit amin tích điện dương là K, và axit amin tích điện âm là E.

Theo một khía cạnh, trong kháng thể đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật CH3(+/-) trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin R ở vị trí 409 được thay thế bằng D và axit amin K ở vị trí được thay thế bằng E, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 399 được thay thế bằng K và axit amin E ở vị trí 357 được thay thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, phương pháp được mô tả trong WO 2013/157953 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng K và axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh khác, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng K và axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Ngoài ra, ít nhất một trong các cải biến thay thế sau được chứa

trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại: axit amin Y ở vị trí 349 được thay thế bằng E, axit amin Y ở vị trí 349 được thay thế bằng D và axit amin L ở vị trí 368 được thay thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án, axit amin L ở vị trí 368 được thay thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, phương pháp được mô tả trong WO 2012/058768 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một khía cạnh, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng Y và axit amin Y ở vị trí 407 được thay thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng A và axit amin K ở vị trí 409 được thay thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, ngoài các cải biến thay thế nêu trên, trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, ít nhất một trong số các axit amin ở vị trí 411 (ban đầu là T), 399 (ban đầu là D), 400 (ban đầu là S), 405 (ban đầu là F), 390 (ban đầu là N) và 392 (ban đầu là K) được thay thế (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Các cải biến thay thế được ưu tiên là:

- thay thế axit amin T ở vị trí 411 bằng axit amin được chọn từ N, R, Q, K, D, E và W (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

- thay thế axit amin D ở vị trí 399 bằng axit amin được chọn từ R, W, Y, và K (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

- thay thế axit amin S ở vị trí 400 bằng axit amin được chọn từ E, D, R và K (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

- thay thế axit amin F ở vị trí 405 bằng axit amin được chọn từ I, M, T, S, V và W (đánh số theo chỉ số Kabat EU;

- thay thế axit amin N ở vị trí 390 bằng axit amin được chọn từ R, K và D (đánh số theo chỉ số Kabat EU; và

- thay thế axit amin K ở vị trí 392 bằng axit amin được chọn từ V, M, R, L, F và E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép được xử lý kỹ thuật theo WO 2012/058768), tức là trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin L ở vị trí 351 được thay thế bằng Y và axit amin Y ở vị trí 407 được thay thế bằng A, và trong miền CH3

của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng V và axit amin K ở vị trí 409 được thay thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin Y ở vị trí 407 được thay thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng A và axit amin K ở vị trí 409 được thay thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án vừa được nêu ở trên, trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin K ở vị trí 392 được thay thế bằng E, axit amin T ở vị trí 411 được thay thế bằng E, axit amin D ở vị trí 399 được thay thế bằng R và axit amin S ở vị trí 400 được thay thế bằng R (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, phương pháp được mô tả trong WO 2011/143545 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một khía cạnh, các cải biến axit amin trong miền CH3 của cả hai chuỗi nặng được đưa vào ở vị trí 368 và/hoặc 409 (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, phương pháp được mô tả trong WO 2011/090762 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép. WO 2011/090762 đề cập đến các cải biến axit amin theo công nghệ "phần phình vào phần lõm" (KiH). Theo một phương án, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng W, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin Y ở vị trí 407 được thay thế bằng A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thay thế bằng Y, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin Y ở vị trí 407 được thay thế bằng T (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, phương pháp được mô tả trong WO 2009/089004 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép. Theo một phương án, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K hoặc N ở vị trí 392 được thay thế bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án là bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên là bằng D), và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 399, axit amin E hoặc D ở vị trí 356 hoặc axit amin E ở vị trí 357 được thay thế bằng axit amin tích điện dương (theo một phương án K hoặc R, theo một phương án được ưu tiên là bằng K, theo một phương án được ưu tiên, axit amin ở vị trí 399 hoặc 356 được thay thế bằng K) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, ngoài các cải biến thay thế nêu trên, trong miền CH3

của một chuỗi nặng, axit amin K hoặc R ở vị trí 409 được thay thế bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án là bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên là bằng D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một khía cạnh khác nữa, ngoài hoặc thay thế cho các cải biến thay thế nêu trên, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K ở vị trí 439 và/hoặc axit amin K ở vị trí 370 được thay thế độc lập với nhau bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án là bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên là bằng D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, phương pháp được mô tả trong WO 2007/147901 được sử dụng để hỗ trợ sự heterodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K ở vị trí 253 được thay thế bằng E, axit amin D ở vị trí 282 được thay thế bằng K và axit amin K ở vị trí 322 được thay thế bằng D, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 239 được thay thế bằng K, axit amin E ở vị trí 240 được thay thế bằng K và axit amin K ở vị trí 292 được thay thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Đầu tận C của chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả có thể là đầu tận C toàn vẹn kết thúc bằng gốc axit amin PGK. Đầu tận C của chuỗi nặng có thể là đầu tận C đã được rút ngắn đi trong đó một hoặc hai trong số các gốc axit amin đầu tận C đã được loại bỏ. Theo một phương án được ưu tiên, đầu tận C của chuỗi nặng là đầu tận C đã được rút ngắn đi kết thúc bằng PG.

Theo một khía cạnh trong số tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng bao gồm miền CH3 đầu tận C như được nêu cụ thể trong bản mô tả, bao gồm glyxin-lysin dipeptit đầu tận C (G446 và K447, đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án trong số tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng bao gồm miền CH3 đầu tận C, như được nêu cụ thể trong bản mô tả, bao gồm gốc glyxin đầu tận C (G446, đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Cải biến trong miền Fab

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong

đó trong một trong các mảnh Fab, miền biến đổi VH và VL hoặc miền hằng định CH1 và CL được trao đổi. Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra theo công nghệ Crossmab.

Kháng thể đa đặc hiệu có thay thế/trao đổi miền trong một nhánh gắn kết (CrossMabVH-VL hoặc CrossMabCH-CL) được mô tả chi tiết trong WO2009/080252 và Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-1191. Chúng làm giảm rõ rệt lượng sản phẩm phụ gây ra bởi ghép đôi không phù hợp của chuỗi nhẹ kháng kháng nguyên thứ nhất với chuỗi nặng sai kháng kháng nguyên thứ hai (so với các phương pháp không có trao đổi miền như vậy).

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó trong một trong các mảnh Fab, miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau sao cho miền VH là một phần của chuỗi nhẹ và miền VL là một phần của chuỗi nặng. Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể, trong đó trong mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1, miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau.

Theo một khía cạnh khác, và để cải thiện hơn nữa sự ghép cặp chính xác, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, có thể chứa các cải biến thay thế axit amin tích điện khác nhau (còn gọi là "gốc tích điện"). Các cải biến này được đưa vào trong miền CH1 và CL cắt chéo hoặc không cắt chéo.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó trong một trong các mảnh Fab trong miền hằng định CL, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể, trong đó trong mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3 của miền hằng định CL, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1, axit

amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó trong một trong các miền CL, axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R) và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) được thay thế bằng lysin (K) và trong đó trong một trong các miền CH1, axit amin ở vị trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) được thay thế bằng axit glutamic (E). Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể, trong đó trong mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3, axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R) và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) được thay thế bằng lysin (K) và trong đó trong một trong các miền CH1, axit amin ở vị trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) được thay thế bằng axit glutamic (E).

Theo một khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị hai bao gồm

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau.

Kháng thể theo mục a) không chứa cải biến như được báo cáo theo mục b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo mục a) là các chuỗi đã được phân lập.

Trong kháng thể theo mục b) bên trong chuỗi nhẹ, miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể này, và bên trong chuỗi nặng, miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể này.

Theo một khía cạnh, (i) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất theo mục a) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo Kabat) được thay thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất theo mục a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo chỉ số Kabat EU) được thay

thế bằng axit amin tích điện âm, hoặc (ii) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai theo mục b) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo Kabat) được thay thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai theo mục b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo chỉ số Kabat EU) được thay thế bằng axit amin tích điện âm.

Theo một khía cạnh khác, (i) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất theo mục a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất theo mục a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), hoặc (ii) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai theo mục b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai theo mục b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thay thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng R và axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, trong miền hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế bằng E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một khía cạnh, trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thay thế bằng K, và trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng R và axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng K, và trong

miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 147 và 213 đều được thay thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thay thế bằng K, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế bằng E, và trong miền biến đổi VL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 38 được thay thế bằng K, trong miền biến đổi VH của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 39 được thay thế bằng E, trong miền biến đổi VL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 38 được thay thế bằng K, và trong miền biến đổi VH của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 39 được thay thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị hai bao gồm

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau, và trong đó miền hằng định CL và CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau.

Kháng thể theo mục a) không chứa cải biến như được báo cáo theo mục b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo mục a) là các chuỗi đã được phân lập. Trong kháng thể theo mục b) bên trong chuỗi nhẹ, miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể này, và miền chuỗi nhẹ hằng định CL được thay thế bằng miền chuỗi nặng hằng định CH1 của kháng thể này; và bên trong chuỗi nặng, miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể này, và miền chuỗi nặng hằng định CH1 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ hằng định CL của kháng thể này.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị hai bao gồm

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền hằng định CL và CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau.

Kháng thể theo mục a) không chứa cải biến như được báo cáo theo mục b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo mục a) là các chuỗi đã được phân lập. Trong kháng thể theo mục b) bên trong chuỗi nhẹ, miền chuỗi nhẹ hằng định CL được thay thế bằng miền chuỗi nặng hằng định CH1 của kháng thể này; và bên trong chuỗi nặng, miền chuỗi nặng hằng định CH1 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ hằng định CL của kháng thể này.

Theo một khía cạnh, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đa đặc hiệu bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) một, hai, ba hoặc bốn mảnh Fab chuỗi đơn gắn kết đặc hiệu với một đến bốn kháng nguyên nữa (tức là kháng nguyên thứ hai và/hoặc thứ ba và/hoặc thứ tư và/hoặc thứ năm, tốt hơn là gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên nữa, tức là kháng nguyên thứ hai),

trong đó mảnh Fab chuỗi đơn nêu trên theo mục b) được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã được nêu theo mục a) thông qua phần tử liên kết peptit ở đầu tận C hoặc đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt nhau gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ thông qua phần tử liên kết peptit ở đầu tận C của các chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt nhau gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ thông qua phần tử liên kết peptit ở đầu tận C của các chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt nhau gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ thông qua phần tử liên kết peptit ở đầu tận C của các chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt nhau gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ thông qua phần tử liên

kết peptit ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt nhau gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ thông qua phần tử liên kết peptit ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt nhau gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ thông qua phần tử liên kết peptit ở đầu tận C của mỗi chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ này.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị ba bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể,

b) polypeptit thứ nhất bao gồm

ba) miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH), hoặc

bb) miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và miền hằng định 1 của kháng thể (CH1),

trong đó polypeptit thứ nhất nêu trên được dung hợp với đầu tận N của miền VH của nó thông qua phần tử liên kết peptit đến đầu tận C của một trong hai chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ này,

c) polypeptit thứ hai bao gồm

ca) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), hoặc

cb) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và miền hằng định chuỗi nhẹ kháng thể (CL),

trong đó polypeptit thứ hai nêu trên được dung hợp với đầu tận N của miền VL thông qua phần tử liên kết peptit đến đầu tận C của chuỗi còn lại trong số hai chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ này, và

trong đó miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) của polypeptit thứ nhất và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) của polypeptit thứ hai cùng nhau tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai.

Theo một khía cạnh, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) của polypeptit theo mục b) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) của polypeptit theo mục c) được liên kết và được làm ổn định thông qua cầu disulfua chuỗi chung bằng cách đưa liên kết disulfua vào giữa các vị trí sau:

(i) miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 44 đến miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100, hoặc

(ii) miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 105 đến miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 43, hoặc

(iii) miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 101 đến miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100 (luôn đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Các kỹ thuật đưa các cầu disulfua không tự nhiên vào để làm ổn định được mô tả trong, ví dụ, WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al., Nucl. Med. Biol. 25 (1998) 387-393; và Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa miền biến đổi của các polypeptit theo mục b) và c) nằm giữa miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 44 và miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa miền biến đổi của các polypeptit theo mục b) và c) nằm giữa miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 105 và miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 43 (luôn đánh số theo Kabat). Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép hóa trị ba không có sự ổn định disulfua tùy ý nêu trên giữa miền biến đổi VH và VL của mảnh Fab chuỗi đơn được ưu tiên.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu, bao gồm

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai (được cải biến) và chuỗi nặng thứ hai (được cải biến) của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và/hoặc trong đó miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, và

c) trong đó một đến bốn peptit gắn kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với một hoặc hai kháng nguyên nữa (tức là gắn kết với kháng nguyên thứ ba và/hoặc thứ tư) được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit đến đầu tận C hoặc đầu tận N của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng theo mục a) và/hoặc b).

Kháng thể theo mục a) không chứa cải biến như được báo cáo theo mục b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo mục a) là các chuỗi đã được phân lập.

Theo một khía cạnh, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo mục c) một hoặc hai peptit gắn kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với một hoặc hai kháng nguyên nữa.

Theo một khía cạnh, peptit gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm mảnh scFv và mảnh scFab.

Theo một khía cạnh, peptit gắn kết kháng nguyên là mảnh scFv.

Theo một khía cạnh, peptit gắn kết kháng nguyên là mảnh scFab.

Theo một khía cạnh, peptit gắn kết kháng nguyên được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng theo mục a) và/hoặc b).

Theo một khía cạnh, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo mục c) một hoặc hai peptit gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên nữa.

Theo một khía cạnh, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo mục c) hai peptit gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ ba. Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau này đều được dung hợp thông qua cùng một phần tử liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi nặng theo mục a) và b). Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit gắn kết kháng nguyên giống hệt nhau là mảnh scFv hoặc mảnh scFab.

Theo một khía cạnh, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo mục c) hai peptit gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ ba và thứ tư. Theo một phương án, hai peptit gắn kết kháng nguyên này đều được dung hợp thông qua cùng một phần tử liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi nặng theo mục a) và b). Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit gắn kết kháng nguyên này là mảnh scFv hoặc mảnh scFab.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể đặc hiệu kép, hóa trị bốn bao gồm

a) hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng của kháng thể, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (và bao gồm hai mảnh Fab),

b) hai mảnh Fab bổ sung của kháng thể, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó các mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit với đầu tận C hoặc đầu tận N của các chuỗi nặng theo mục a), và

trong đó trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện

(i) trong cả hai mảnh Fab theo mục a), hoặc trong cả hai mảnh Fab theo mục b), miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và/hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, hoặc

(ii) trong cả hai mảnh Fab theo mục a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, và trong cả hai mảnh Fab theo mục b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, hoặc

(iii) trong cả hai mảnh Fab theo mục a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, và trong cả hai mảnh Fab theo mục b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, hoặc

(iv) trong cả hai mảnh Fab theo mục a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và trong cả hai mảnh Fab theo mục b) miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, hoặc

(v) trong cả hai mảnh Fab theo mục a) miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, và trong cả hai mảnh Fab theo mục b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau.

Theo một khía cạnh, các mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit với đầu tận C của các chuỗi nặng theo mục a), hoặc với đầu tận N của các chuỗi nặng theo mục a).

Theo một khía cạnh, các mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit với đầu tận C của các chuỗi nặng theo mục a).

Theo một khía cạnh, các mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit với đầu tận N của các chuỗi nặng theo mục a).

Theo một khía cạnh, trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện: trong cả hai mảnh Fab theo mục a), hoặc trong cả hai mảnh Fab theo mục b), miền biến đổi

VL và VH được thay thế cho nhau, và/hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị bốn bao gồm:

a) chuỗi nặng (được cải biến) của kháng thể thứ nhất, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm cặp miền VH-CH1 thứ nhất, trong đó với đầu tận C của chuỗi nặng này, đầu tận N của cặp miền VH-CH1 thứ hai của kháng thể thứ nhất này được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit,

b) hai chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất theo mục a) nêu trên,

c) chuỗi nặng (được cải biến) của kháng thể thứ hai, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai và bao gồm cặp miền VH-CL thứ nhất, trong đó với đầu tận C của chuỗi nặng này, đầu tận N của cặp miền VH-CL thứ hai của kháng thể thứ hai này được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit, và

d) hai chuỗi nhẹ (được cải biến) của kháng thể thứ hai theo mục) nêu trên, mỗi chuỗi bao gồm cặp miền CL-CH1.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thứ hai có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó đầu tận N của chuỗi nặng được nối với đầu tận C của chuỗi nhẹ thông qua phần tử liên kết peptit.

Kháng thể theo mục a) không chứa cải biến như được báo cáo theo mục b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là các chuỗi đã được phân lập.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) mảnh Fv gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai bao gồm miền VH2 và miền VL2, trong đó cả hai miền được nối với nhau thông qua cầu disulfua,

trong đó chỉ có miền VH2 hoặc miền VL2 được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất.

Trong kháng thể đặc hiệu kép, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo mục a) là các chuỗi đã được phân lập.

Theo một khía cạnh, miền còn lại trong số miền VH2 hoặc miền VL2 không được dung hợp thông qua phần tử liên kết peptit với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất.

Theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL và miền CL và chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH, miền CH1, vùng bản lề, miền CH2 và miền CH3.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị ba bao gồm

a) hai mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,

b) một mảnh CrossFab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền CH1 và miền CL được trao đổi với nhau,

c) một vùng Fc bao gồm chuỗi nặng vùng Fc thứ nhất và chuỗi nặng vùng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của hai mảnh Fab được nối với đầu tận N của polypeptit của vùng Fc chuỗi nặng, và trong đó đầu tận C của miền CL của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của miền VH của một trong các mảnh Fab.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể hóa trị ba bao gồm

a) hai mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,

b) một mảnh CrossFab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền CH1 và miền CL được trao đổi với nhau,

c) một vùng Fc bao gồm chuỗi nặng vùng Fc thứ nhất và chuỗi nặng vùng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ nhất được nối với đầu tận N của một trong số các polypeptit của vùng Fc chuỗi nặng và đầu tận C của miền CL của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của polypeptit của vùng Fc chuỗi nặng còn lại,

và trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ hai được nối với đầu tận N của miền VH của mảnh Fab thứ nhất hoặc đầu tận N của miền VH của mảnh CrossFab.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai bao gồm miền VH2 và miền VL2 bao gồm mảnh chuỗi nặng và mảnh chuỗi nhẹ, trong đó trong mảnh chuỗi nhẹ, miền chuỗi nhẹ biến đổi VL2 được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH2 của kháng thể này, và bên trong mảnh chuỗi nặng, miền chuỗi nặng biến đổi VH2 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL2 của kháng thể này

trong đó mảnh Fab của chuỗi nặng được xen vào giữa miền CH1 của một trong các chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ và vùng Fc tương ứng của kháng thể có độ dài đầy đủ, và đầu tận N của mảnh Fab chuỗi nhẹ được liên hợp với đầu tận C của chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ mà được ghép cặp với chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ mà mảnh Fab của chuỗi nặng đã được xen vào đó.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai bao gồm miền VH2 và miền VL2 bao gồm mảnh chuỗi nặng và mảnh chuỗi nhẹ, trong đó trong mảnh chuỗi nhẹ, miền chuỗi nhẹ biến đổi VL2 được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH2 của kháng thể này, và bên trong mảnh chuỗi nặng, miền chuỗi nặng biến đổi VH2 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL2 của kháng thể này và trong đó đầu tận C của mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab được liên hợp với đầu tận N của một trong các chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ và đầu tận C của mảnh chuỗi nhẹ của mảnh Fab được liên hợp với đầu tận N của chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ mà ghép cặp với chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ mà mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab được liên hợp với.

Polynucleotit

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit đã được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu kép như được mô tả ở đây hoặc mảnh của nó.

Theo một số phương án nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, ví dụ, dưới dạng ARN thông tin (mRNA). ARN theo sáng chế có thể là ARN chuỗi đơn hoặc chuỗi kép.

B. Phương pháp tái tổ hợp

Kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất trong bản mô tả có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp và chế phẩm tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số 4,816,567. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và TIM-3, một cách tương ứng (ví dụ, trong chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vectơ (ví dụ, vectơ biểu hiện) bao gồm axit nucleic này. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm axit nucleic này. Theo một khía cạnh như vậy, tế bào chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp bằng): (1) vectơ bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể, hoặc (2) vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể. Theo một khía cạnh, tế bào chủ là tế bào nhân điển hình, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể, như được đề xuất trên đây, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được mô tả ở đây, axit nucleic mã hóa kháng thể đặc hiệu kép, ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và được xen vào một hoặc nhiều vectơ để

tách dòng thêm và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Axit nucleic này có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đầu dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện vectơ mã hóa kháng thể bao gồm tế bào nhân rải rác hoặc tế bào nhân điển hình được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, kháng thể có thể được sản xuất trong vi khuẩn, cụ thể là khi glycosyl hóa và chức năng tác động Fc là không cần thiết. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và polypeptit trong vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5,648,237, US 5,789,199, và US 5,840,523. (Xem cả trong Charlton, K.A., trong tài liệu: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, mô tả sự biểu hiện của các mảnh kháng thể trong E. coli.) Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập khỏi hồ nhão chứa tế bào vi khuẩn trong phần hòa tan và có thể được tinh chế thêm.

Ngoài tế bào nhân rải rác, các vi khuẩn nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã "được nhân hóa," dẫn đến việc sản xuất ra kháng thể có mô hình glycosyl hóa ở người một phần hoặc hoàn toàn. Xem Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; và Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (sinh vật không có xương sống và sinh vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào sinh vật không có xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut đã được nhận biết mà có thể được sử dụng liên hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIESTM để sản xuất kháng thể trong thực vật chuyển gen).

Tế bào sinh vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được biến đổi thích hợp để sinh trưởng trong huyền phù có thể là dòng thích hợp. Các ví dụ khác về dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293

hoặc 293 như được mô tả, ví dụ, trong Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); tế bào thận chuột lang con (BHK); tế bào sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ lông xanh Châu Phi (VERO-76); tế bào caxinom cổ người (HELA); tế bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột bạch (BRL 3A); tế bào phổi người (W138); tế bào gan người (Hep G2); u vú ở chuột nhắt (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc, bao gồm tế bào DHFR- CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); và dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để có nhận xét về một số dòng tế bào chủ động vật có vú thích hợp để sản xuất kháng thể, xem, ví dụ, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Thử nghiệm

Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 được đề xuất trong bản mô tả có thể được nhận biết, được sàng lọc, hoặc được đặc trưng về các tính chất vật lý/hóa học và/hoặc các hoạt tính sinh học của chúng bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực này.

1. Thử nghiệm ái lực

Ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép, kháng thể và mảnh kháng thể được đề xuất trong bản mô tả đối với các kháng nguyên tương ứng có thể được xác định theo phương pháp nêu trong Ví dụ thực hiện sáng chế bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), sử dụng công cụ tiêu chuẩn như công cụ Biacore® (GE Healthcare), và các thụ thể hoặc protein đích như có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Một phương án minh họa và lấy làm ví dụ cụ thể để đo ái lực gắn kết được mô tả trong Ví dụ 1b, 5 hoặc 12. Theo một khía cạnh, $K_D$ được đo bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở nhiệt độ 25°C.

2. Thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, thẩm tách Western, v.v.. Khả năng gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất trong bản mô tả với kháng nguyên tái tổ hợp tương ứng hoặc với tế bào biểu hiện kháng nguyên có thể được ước lượng bằng ELISA như được mô tả trong Ví dụ 12.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thử nghiệm TR-FRET trên cơ sở tế bào để xác định khả năng gắn kết đồng thời của mô hình kháng thể đặc hiệu kép với hai thụ thể khác nhau có mặt trên một tế bào. Công nghệ Tag-lite được chọn là tổ hợp của TR-FRET cổ điển (truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang phân giải theo thời gian) và công nghệ đuôi SNAP (SNAP-tag) (ví dụ New England Biolabs, CISBIO), cho phép kháng nguyên có mặt trên bề mặt tế bào được đánh dấu bằng chất cho huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm thụ thể. Thử nghiệm này được mô tả trong Ví dụ 13.

Theo một khía cạnh khác, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) sạch được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết để thể hiện gắn kết với các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) khác nhau như bạch cầu đơn nhân, tế bào NK và tế bào T.

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận biết kháng thể cạnh tranh với kháng thể hoặc vị trí gắn kết kháng nguyên cụ thể để gắn kết với đích, một cách tương ứng. Theo một số phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (ví dụ, epitop thẳng hoặc epitop cấu dạng) được gắn kết bởi kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 theo sáng chế. Các phương pháp lấy làm ví dụ chi tiết để vẽ bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết với được nêu trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," trong tài liệu *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

Trong thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ, PD1 hoặc TIM3 đã cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất gắn kết với PD1 hoặc TIM3 và kháng thể không được đánh dấu thứ hai được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó với kháng thể thứ nhất để gắn kết với PD1 hoặc TIM3. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong phần dịch nổi trên bề mặt thể lai. Để làm đối chứng, PD1 hoặc TIM3 đã cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không

bao gồm kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép kháng thể thứ nhất gắn kết với PD1 hoặc TIM3, kháng thể không gắn kết dư thừa được loại bỏ, và lượng chất đánh dấu kết hợp với PD1 hoặc TIM3 đã cố định được đo. Nếu lượng chất đánh dấu kết hợp với PD1 hoặc TIM3 đã cố định về cơ bản được làm giảm trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì chỉ ra rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với PD1 hoặc TIM3. Xem Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

3. Thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được cung cấp để nhận biết kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3 có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, khả năng tăng cường sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của các tế bào miễn dịch khác nhau, đặc biệt là tế bào T, sự tiết xytokin điều biến miễn dịch như IFNγ hoặc TNF-alpha, phong bế con đường PD1, phong bế con đường TIM3, tiêu diệt tế bào khối u. Kháng thể có hoạt tính sinh học như vậy in vivo và/hoặc in vitro cũng được đề xuất.

Theo một số khía cạnh nhất định, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thử nghiệm tế bào miễn dịch xác định mức hoạt hóa các tế bào lympho từ một cá thể (đối tượng cho X) đến các tế bào lympho từ một cá thể khác (đối tượng cho Y). Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR) có thể thể hiện tác dụng của việc phong bế con đường PD1 đến các tế bào tác động tế bào lympho. Tế bào T trong thử nghiệm được thử nghiệm về sự hoạt hóa và sự tiết IFN-gama của chúng khi có hoặc không có kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế. Thử nghiệm được mô tả chi tiết hơn trong Ví dụ 16.

D. Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hóa trị hoặc dược chất, chất ức chế sinh trưởng, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố hoạt hóa bằng enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của nó), hoặc chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ.

Theo một khía cạnh, thể liên hợp miễn dịch là thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) trong đó kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều dược chất, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, maytansinoit (xem patent Mỹ số 5,208,020, 5,416,064 và Patent Châu Âu số EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc dược chất monometylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298); dolastatin; calicheamicin hoặc dẫn xuất của nó (xem patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); anthraxyclin như daunomyxin hoặc doxorubixin (xem Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); và patent Mỹ số 6,630,579); metotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả ở đây được liên hợp với độc tố hoạt hóa bằng enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bạch hầu chuỗi A, mảnh hoạt hóa không gắn kết của độc tố bạch hầu, exotoxin chuỗi A (từ Pseudomonas aeruginosa), ricin chuỗi A, abrin chuỗi A, modeccin chuỗi A, alpha-sarcin, Aleurites fordii protein, dianthin protein, Phytolaca americana protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomyxin, enomyxin, và tricothecen.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả ở đây được liên hợp với nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo ra thể liên hợp phóng xạ. Nhiều chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ có sẵn để sản xuất thể liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 và chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu. Khi thể liên hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ dùng cho các nghiên cứu lấp lánh, ví dụ, tc99m hoặc I123, hoặc chất đánh dấu xoay để chụp hình cộng hưởng từ nhân (NMR) (còn được biết đến là chụp hình cộng hưởng từ, mri),

như iot-123 một lần nữa, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Thể liên hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các chất ghép cặp protein hai chức khác nhau như N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), sucxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este hoạt tính (như disucxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất bis-active flo (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch ricin có thể được tạo ra như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaaxetic được đánh dấu Cacbon-14 (MX-DTPA) là chất chelat hóa lấy làm ví dụ cho sự tiếp hợp của nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026. Phần tử liên kết có thể là "phần tử liên kết phân tách được" tạo điều kiện cho việc giải phóng dược chất gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, phần tử liên kết không bền axit, phần tử liên kết nhạy peptidaza, phần tử liên kết không bền quang học, phần tử liên kết dimetyl hoặc phần tử liên kết chứa disulfua (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); patent Mỹ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Thể liên hợp miễn dịch hoặc ADC dự định một cách rõ ràng trong bản mô tả, nhưng không chỉ giới hạn ở các thể liên hợp như vậy được tạo ra bằng chất phản ứng phần tử liên kết chéo bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (sucxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có thể mua được trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Phương pháp và chế phẩm dùng để chẩn đoán và phát hiện

Theo một số khía cạnh nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 được đề xuất trong bản mô tả có thể hữu ích để phát hiện ra sự có mặt của cả PD1 và TIM3 trong mẫu sinh học. Thuật

ngữ "phát hiện ra" như được sử dụng trong bản mô tả bao gồm sự phát hiện về số lượng hoặc chất lượng. Theo một số phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô, như tế bào gốc ung thư AML.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép để sử dụng trong phương pháp chuẩn đoán hoặc phát hiện. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện ra sự có mặt của cả PD1 và TIM3 trong mẫu sinh học. Theo một số phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu kép như được mô tả ở đây trong các điều kiện cho phép sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với cả PD1 và TIM3, và phát hiện ra liệu phức hợp có được tạo ra giữa kháng thể đặc hiệu kép và cả hai kháng nguyên hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp in vitro hoặc in vivo. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép được sử dụng để chọc lọc các đối tượng thích hợp cho liệu pháp trị liệu bằng kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng thể TIM-3, ví dụ khi PD1 và TIM3 là chỉ thị sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể được đánh dấu đặc hiệu kép. Các chất đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đánh dấu hoặc gốc được phát hiện trực tiếp (như chất đánh dấu huỳnh quang, mang màu, tập trung electron, phát quang hóa học, và hoạt tính phóng xạ), cũng như các gốc, như enzym hoặc phối tử, được phát hiện gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ 32P, 14C, 125I, 3H, và 131I, chất phát quang như chelat đất hiếm hoặc fluoresxein và các dẫn xuất của nó, rodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbeliferon, luceriferaza, ví dụ, luciferaza đom đóm và luciferaza vi khuẩn (patent Mỹ số 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophtalazindion, peroxidaza hồi hải mã (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozyme, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, được kết hợp với enzym sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất đánh dấu xoay, chất đánh dấu thực khuẩn thể hoặc các gốc tự do ổn định.

F. Dược phẩm, dạng phối trộn và đường dùng

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 được đề xuất trong bản mô tả, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất trong bản mô tả và ít nhất một tá dược dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép được đề xuất trong bản mô tả và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Dược phẩm theo sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu kép được hòa tan hoặc được phân tán trong tá dược dược dụng. Cụm từ "dược lý hoặc dược dụng" dùng để chỉ các phân tử dược và chế phẩm thường không độc đối với đối tượng nhận ở các liều lượng và nồng độ được sử dụng, tức là không tạo ra phản ứng bất lợi, dị ứng hoặc phản ứng không mong muốn khác khi được dùng cho động vật, như, ví dụ, người, nếu thích hợp. Việc bào chế dược phẩm chứa ít nhất một kháng thể đặc hiệu kép và tùy ý một thành phần hoạt tính bổ sung là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa theo bản mô tả, như được lấy làm ví dụ trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được kết hợp trong bản mô tả bằng cách viện dẫn. Cụ thể, chế phẩm là dạng phối trộn được làm khô lạnh hoặc dung dịch chứa nước. Như được sử dụng trong bản mô tả, "tá dược dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, chất đệm, môi trường phân tán, chất phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất chống nấm), chất đẳng trương, muối, chất ổn định và các hỗn hợp của chúng, như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dược phẩm được thiết kế để dùng bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm dưới da, trong da, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, trong tủy mạc hoặc trong bụng. Để tiêm, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được phối trộn trong dung dịch chứa nước, tốt hơn là trong chất đệm tương thích sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc chất đệm nước muối sinh lý. Dung dịch này có thể chứa chất phối trộn như chất tạo hỗn dịch, chất làm ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo một cách khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể ở dạng bột để hoàn nguyên bằng chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước vô trùng không

chứa pyrogen, trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm vô trùng được điều chế bằng cách kết hợp các protein dung hợp theo sáng chế với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nhau khác được liệt kê dưới đây, nếu cần. Tính vô trùng có thể dễ dàng đạt được, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Thông thường, chất phân tán được điều chế bằng cách kết hợp các thành phần hoạt tính đã vô trùng khác nhau vào chất dẫn vô trùng mà chứa môi trường phân tán bazơ và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng, hỗn dịch hoặc nhũ tương, các phương pháp điều chế được ưu tiên là kỹ thuật làm khô trong chân không hoặc làm đông khô mà tạo ra thành phần hoạt tính ở dạng bột cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô trùng từ trước của nó. Môi trường lỏng này nên được đệm một cách thích hợp nếu cần và chất pha loãng dạng lỏng trước tiên được làm đẳng trương trước khi tiêm với nước muối thích hợp hoặc glucoza. Dược phẩm phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và lưu trữ, và được bảo quản chống lại tác động gây nhiễm bẩn từ vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Hiểu được rằng nhiễm bẩn nội độc tố nên được duy trì tối thiểu ở mức độ an toàn, ví dụ, ít hơn 0,5ng/mg protein. Các tá dược dược dụng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản (như octadecyldimetylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; rượu phenolic, butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (thấp hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manoza, hoặc dextrin; chất chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Hỗn dịch tiêm chứa nước có thể chứa các hợp chất làm tăng độ nhớt của hỗn dịch, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, dextran, hoặc hợp chất tương tự. Tùy ý, hỗn dịch cũng có thể chứa chất ổn định thích hợp hoặc các chất làm tăng độ hòa tan của hợp chất để cho phép điều chế các dung dịch nồng độ cao. Ngoài ra, hỗn dịch của các hợp chất hoạt tính có thể được tạo ra ở dạng hỗn dịch tiêm dạng dầu thích hợp. Các dung môi ưa mỡ hoặc chất

dẫn thích hợp bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom.

Thành phần hoạt tính có thể được hãm trong vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetacylat), một cách tương ứng, trong hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật như vậy được đề cập đến trong Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Chế phẩm giải phóng duy trì có thể được tạo ra. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm cơ chất bán thấm của polyme kỵ nước dạng rắn chứa polypeptit, cơ chất này có dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc vi nang. Theo các phương án cụ thể, sự hấp thụ kéo dài của chế phẩm tiêm có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trong chế phẩm chứa các chất làm chậm sự hấp thụ, như, ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc các hỗn hợp của chúng.

Các tá dược dược dụng lấy làm ví dụ trong bản mô tả còn bao gồm chất phân tán thuốc trong kẽ như hyaluronidaza glycoprotein có hoạt tính trung tính dễ tan (sHASEGP), ví dụ, hyaluronidaza glycoprotein dễ tan của người PH-20, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP lấy làm ví dụ và phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các dạng phối trộn kháng thể được làm khô lạnh lấy làm ví dụ được mô tả trong patent Mỹ số 6,267,958. Dạng phối trộn kháng thể chứa nước bao gồm các dạng phối trộn được mô tả trong patent Mỹ số 6,171,586 và WO2006/044908, dạng phối trộn nêu trong WO2006/044908 bao gồm chất đệm histidin-axetat.

Ngoài chế phẩm được mô tả trước đó, kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được phối trộn dưới dạng chế phẩm giải phóng dần dần. Dạng phối trộn tác động lâu như vậy có thể được dùng bằng cách cấy (ví dụ dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Vì vậy, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép có thể được phối trộn với vật liệu polyme hoặc vật liệu kỵ nước thích hợp (ví dụ dưới dạng dạng nhũ tương trong dầu chấp nhận được)

hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc dưới dạng dẫn xuất tan chậm, ví dụ, dưới dạng muối tan chậm.

Dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các quy trình trộn, hòa tan, nhũ hóa, nang hóa, hãm hoặc làm khô lạnh thông thường. Dược phẩm có thể được phối trộn theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất bổ trợ sinh lý dụng mà tạo điều kiện cho việc xử lý protein thành chế phẩm có thể được sử dụng trong dược phẩm. Dạng phối trộn thích hợp phụ thuộc vào đường dùng được chọn lựa.

Kháng thể đặc hiệu kép có thể được phối trộn vào dược phẩm ở dạng axit hoặc bazơ tự do, trung hòa hoặc muối. Muối dược dụng là các muối về cơ bản là giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm muối cộng axit, ví dụ, muối được tạo ra với các nhóm amin tự do của chế phẩm chứa protein, hoặc được tạo ra với axit vô cơ như ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartric hoặc axit mandelic. Các muối được tạo ra với nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ như ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Muối dược có khuynh hướng dễ tan hơn trong dung môi chứa nước và các dung môi protic khác so với dạng bazơ tự do tương ứng.

Dược phẩm trong bản mô tả cũng có thể chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính nếu cần đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là các thành phần có hoạt tính bổ sung mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Các thành phần hoạt tính như vậy có mặt một cách thích hợp trong hỗn hợp với các lượng hữu hiệu cho mục đích đã định.

Dạng phối trộn được sử dụng để dùng in vivo thường vô trùng. Tính vô trùng có thể dễ dàng đạt được, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng.

G. Phương pháp trị liệu và chế phẩm trị liệu

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 được đề xuất trong bản mô tả có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu.

Để sử dụng trong phương pháp trị liệu, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trên đây có thể được phối trộn, được định liều, và được dùng theo cách phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố cần cân nhắc trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng bệnh lý lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp dùng, lịch trình dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với các bác sĩ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trong bản mô tả để sử dụng làm thuốc chữa bệnh. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trong bản mô tả để sử dụng trong điều trị bệnh, cụ thể là để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được mô tả ở đây để sử dụng trong điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể có bệnh bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của kháng thể đặc hiệu kép. Theo một số phương án nhất định, bệnh cần điều trị là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh khác, bệnh cần điều trị là bệnh nhiễm virut mạn tính như HIV, HBV, HCV, HSV1, CMV, LCMV hoặc EBV. Đối tượng, bệnh nhân, hoặc "cá thể" cần điều trị thường là động vật có vú, cụ thể hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trên đây để sản

xuất hoặc bào chế thuốc chữa bệnh để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một phương án, thuốc chữa bệnh là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm bước cho cá thể có bệnh dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của thuốc chữa bệnh.

Theo một số khía cạnh nhất định, bệnh cần điều trị là rối loạn tăng sinh, đặc biệt là bệnh ung thư. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư niêm mạc tử cung, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư da, caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư xương, và bệnh ung thư thận. Các rối loạn tăng sinh tế bào khác mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở khối u nằm trong bụng, xương, vú, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (tuyến thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung ương và ngoại biên), hệ bạch huyết, xương chậu, da, mô mềm, lách, vùng ngực, và hệ niệu sinh dục. Cũng được bao gồm trong sáng chế là các tình trạng bệnh lý tiền ung thư hoặc thương tổn và ung thư di căn. Theo một số khía cạnh nhất định, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư da, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ. Theo các khía cạnh khác, bệnh ung thư được chọn từ caxinom, u lympho (ví dụ, u lympho Hodgkin và không phải Hodgkin), u nguyên bào, sacom, và bệnh bạch cầu. Theo một khía cạnh khác, bệnh ung thư cần được điều trị được chọn từ bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, caxinom tuyến phổi, caxinom phổi có vảy, bệnh ung thư màng bụng, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư dạ dày-ruột, bệnh ung thư tuyến tụy, u thần kinh đệm, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, ung thư gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư đại trực tràng, caxinom nội mạc tử cung hoặc tử cung, caxinom tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến

giáp, caxinom gan, bệnh bạch cầu và các rối loạn tăng sinh lympho khác, và các dạng bệnh ung thư đầu và cổ khác nhau.

Theo một khía cạnh khác, bệnh cần điều trị là bệnh nhiễm virut mạn tính. Thuật ngữ "bệnh nhiễm virut mạn tính" dùng để chỉ đối tượng chịu đau do virut mạn tính hoặc bị nhiễm virut mạn tính. Các ví dụ về bệnh nhiễm virut mạn tính là virut suy giảm miễn dịch ở người (HIV), bệnh nhiễm virut viêm gan B (HBV), bệnh nhiễm virut viêm gan C (HCV), virut gây rộp môi (herpes simplex virus 1 - HSV1), virut cytomegalo (CMV), virut viêm màng não đám rối màng mạch lympho bào (lymphocytic choriomeningitis virus - LCMV) hoặc virut Epstein-Barr (EBV).

Người có hiểu biết trung bình dễ dàng nhận ra rằng, trong nhiều trường hợp, phân tử đặc hiệu kép có thể không mang lại sự cứu chữa mà chỉ có thể tạo ra lợi ích một phần. Theo một số phương án, thay đổi sinh lý có một số lợi ích cũng được coi là lợi ích trị liệu. Vì vậy, theo một số phương án, lượng kháng thể đặc hiệu kép tạo ra thay đổi sinh lý được coi là "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu".

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 theo sáng chế. Theo một phương án, chế phẩm được dùng cho cá thể này, chứa kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một số phương án nhất định, bệnh cần điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư. Theo một số phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ chất chống ung thư nếu bệnh cần điều trị là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh khác, bệnh này là bệnh nhiễm virut mạn tính. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) tùy thuộc vào kiểu bệnh cần được điều trị, đường dùng, trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, kiểu protein

dung hợp, độ nghiêm trọng và tiến trình bệnh, liệu kháng thể đặc hiệu kép được dùng nhằm mục đích ngăn ngừa hoặc trị liệu, các can thiệp trị liệu trước đó hoặc đồng thời, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với protein dung hợp, và sự thận trọng của bác sĩ theo dõi. Bác sĩ chịu trách nhiệm dùng sẽ, trong sự kiện bất kỳ, xác định nồng độ của (các) thành phần hoạt tính trong chế phẩm và (các) liều lượng thích hợp cho từng đối tượng. Các chế độ dùng liều khác nhau bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở một hoặc nhiều lần dùng ở các thời điểm khác nhau, dùng bolus, và truyền qua mạch được bao gồm trong bản mô tả.

Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trong bản mô tả được dùng một cách thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc trong hàng loạt lần điều trị. Tùy thuộc vào kiểu và độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ, 0,1mg/kg – 10mg/kg) của kháng thể đặc hiệu kép có thể là liều lượng ứng viên ban đầu để dùng cho bệnh nhân, liệu, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hay bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1µg/kg đến 100mg/kg hoặc cao hơn, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập trên đây. Để dùng lặp lại trong một vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh lý, việc điều trị thường được duy trì cho đến khi xuất hiện sự ức chế mong muốn các triệu chứng bệnh. Một liều lượng lấy làm ví dụ của kháng thể đặc hiệu kép là nằm trong khoảng từ khoảng 0,005mg/kg đến khoảng 10mg/kg. Trong các ví dụ khác, liều lượng có thể cũng bao gồm từ khoảng 1µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500µg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 1mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể, đến khoảng 1000mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc cao hơn trong mỗi lần dùng, và khoảng bất kỳ suy ra từ đó. Trong các ví dụ về khoảng suy ra từ các số được liệt kê trong bản mô tả, khoảng từ khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5µg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể v.v., có thể được dùng, dựa trên các số

được mô tả trên đây. Vì vậy, một hoặc nhiều liều lượng bằng khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 5,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được dùng cho bệnh nhân. Các liều lượng này có thể được dùng ngắt quãng, ví dụ cứ mỗi tuần hoặc cứ mỗi ba tuần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều của protein dung hợp). Liều lượng nạp cao hơn ban đầu, sau đó một hoặc nhiều liều lượng thấp hơn có thể được dùng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác có thể cũng hữu ích. Tiến trình của liệu trình này dễ dàng được theo dõi bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trong bản mô tả thường được sử dụng với lượng hữu hiệu để đạt được mục đích đã định. Để sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, hoặc dược phẩm của nó, được dùng hoặc được áp dụng với lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu. Việc xác định lượng hữu hiệu cho tác dụng trị liệu nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, đặc biệt là theo phần mô tả chi tiết được nêu trong bản mô tả.

Để dùng toàn thân, liều hữu hiệu cho tác dụng trị liệu có thể được ước tính từ đầu từ các thử nghiệm in vitro, như thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Sau đó một liều có thể được phối trộn trong mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn mà bao gồm $IC_{50}$ như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin như vậy có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn các liều hữu hiệu ở người.

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

Số lượng liều lượng và khoảng cách dùng liều lượng có thể được điều chỉnh riêng rẽ để tạo ra các nồng độ huyết tương của kháng thể đặc hiệu kép đủ để duy trì tác dụng trị liệu. Liều lượng thường ngày cho bệnh nhân để dùng bằng cách tiêm nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến 50mg/kg/ngày, thường từ khoảng 0,5 đến 1mg/kg/ngày. Nồng độ huyết tương hữu hiệu cho tác dụng trị liệu có thể đạt được bằng cách dùng nhiều liều mỗi ngày. Nồng độ trong huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng HPLC.

Trong trường hợp dùng cục bộ hoặc hấp thụ chọn lọc, nồng độ cục bộ hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép có thể không liên quan đến nồng độ huyết tương. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tối ưu hóa liều lượng cục bộ hữu hiệu cho tác dụng trị liệu mà không có thử nghiệm không đáng.

Liều hữu hiệu cho tác dụng trị liệu của kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này thường tạo ra lợi ích trị liệu mà không gây ra độc tính cơ bản. Độc tính và độ hiệu nghiệm trị liệu của protein dung hợp có thể được xác định bằng các quy trình dược phẩm tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để xác định $LD_{50}$ (liều gây chết 50% quần thể) và $ED_{50}$ (liều hữu hiệu cho tác dụng trị liệu trong 50% quần thể). Tỷ lệ liều lượng giữa độc tố và các tác dụng trị liệu là chỉ số trị liệu, có thể được thể hiện dưới dạng tỷ lệ $LD_{50}/ED_{50}$. Kháng thể đặc hiệu kép biểu hiện các chỉ số trị liệu lớn được ưu tiên. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế biểu hiện chỉ số trị liệu cao. Dữ liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng trong phối trộn khoảng các liều lượng thích hợp để sử dụng ở người. Liều lượng này tốt hơn là nằm trong khoảng các nồng độ tuần hoàn mà bao gồm ED50 với ít độc tính hoặc không có độc tính. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau, ví dụ, dạng liều lượng được sử dụng, đường dùng được sử dụng, tình trạng bệnh lý của đối tượng, và yếu tố tương tự. Dạng phối trộn, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được lựa chọn bởi từng bác sĩ theo tình trạng bệnh lý của bệnh nhân (xem, ví dụ, Fingl et al., 1975, trong tài liệu: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả bằng cách viện dẫn).

Bác sĩ theo dõi của bệnh nhân được điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế sẽ biết cách thức và thời gian để kết thúc, ngắt quãng, hoặc điều chỉnh việc dùng do độc tính, rối loạn chức năng của cơ quan, và yếu tố tương tự. Ngược lại, bác sĩ theo dõi cũng biết cách điều chỉnh việc điều trị sang mức độ cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng là không đủ (trừ độc tính). Biên độ của liều được dùng trong kiểm soát rối loạn đang quan tâm sẽ thay đổi theo độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý cần được điều trị, theo đường dùng, và yếu tố tương tự. Độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý có thể, ví dụ, được ước lượng, một phần, bằng các phương pháp đánh giá tiên lượng tiêu chuẩn. Hơn

nữa, liều lượng và có lẽ là tần suất liều lượng cũng thay đổi theo độ tuổi, trọng lượng cơ thể, và đáp ứng của từng bệnh nhân.

Các chất khác và việc điều trị

Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được mô tả trên đây có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác trong liệu pháp trị liệu. Ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế có thể được dùng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Thuật ngữ "chất trị liệu" bao gồm chất bất kỳ có thể được dùng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh ở cá thể cần điều trị như vậy. Chất trị liệu bổ sung như vậy có thể bao gồm thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp cho chỉ định được điều trị cụ thể, tốt hơn là các thành phần có hoạt tính bổ sung mà không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Theo một số phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là chất chống ung thư khác.

Các chất khác như vậy có mặt một cách thích hợp trong hỗn hợp với lượng hữu hiệu cho mục đích được dự định. Lượng hữu hiệu của các chất khác như vậy phụ thuộc vào lượng protein dung hợp được sử dụng, kiểu rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được mô tả trên đây. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime của phối tử họ TNF thường được sử dụng trong các liều lượng giống nhau và với các đường dùng như được mô tả ở đây, hoặc khoảng từ 1 đến 99% của liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc trong liều lượng bất kỳ và bằng đường bất kỳ được xác định là thích hợp theo kinh nghiệm/lâm sàng.

Các liệu pháp trị liệu kết hợp nêu trên như vậy bao gồm bước dùng kết hợp (khi hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng rẽ), và bước dùng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc dùng kháng thể đặc hiệu kép có thể diễn ra trước khi, đồng thời, và/hoặc sau khi, dùng chất trị liệu bổ sung và/hoặc chất bổ trợ.

H. Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa các chất liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán rối loạn được mô tả trên đây. Vật phẩm bao gồm vật chứa và nhãn dán hoặc tờ rời kèm trong bao gói trên hoặc kết hợp với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, túi dung dịch

truyền IV, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa dẻo. Vật chứa giữ chế phẩm mà chính bản thân chế phẩm đó hoặc được kết hợp với một chế phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ vật chứa có thể là túi dung dịch truyền trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút chặn đâm xuyên qua được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM-3 như được định nghĩa trên đây.

Nhãn dán hoặc tờ rời kèm trong bao gói chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý được lựa chọn. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm chất gây độc tế bào khác hoặc chất trị liệu. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm tờ rời kèm trong bao gói chỉ ra rằng chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể.

Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm dược dụng, như nước kìm khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Vật chứa này có thể còn bao gồm các vật liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, chất lọc, kim, và xi lanh.

Bảng C (trình tự):

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| 1 | chuỗi nặng HVR-H1, Tim3_0016 | GFSLSTSGM |
| 2 | chuỗi nặng HVR-H2, Tim3_0016 | LND |
| 3 | chuỗi nặng HVR-H3, Tim3_0016 | NGYLYALD |
| 4 | chuỗi nhẹ HVR-L1, Tim3_0016 | SSSVNY |
| 5 | chuỗi nhẹ HVR-L2, Tim3_0016 | DAF |
| 6 | chuỗi nhẹ HVR-L3, Tim3_0016 | WSSYPWT |
| 7 | miền biến đổi chuỗi nặng VH, Tim3_0016 | QVTLKESGPG ILQPSQTLRL TCSFSGFSLS TSGMSVGWIR QPSGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ISKDTSNNQV |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | FLQIASVVTA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTSVTVSS |
| 8 | miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, Tim3_0016 | QIVLTQSPAI MSASPGQKVT ITCSASSSVN YTQWYQQKLG SSPKLWIYDA FKLAPGVPAR FSGSGTGTSY SLTISSMEAE DAASYFCHQW SSYPWTFGGG TKLEIK |
| 9 | miền biến đổi chuỗi nặng VH, biến thể Tim3_0016 (0018) | QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLS TSGMSVGWIR QPSGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKRRLT ISKDTSNNQV FLQIASVVTA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGISVTVSS |
| 10 | miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, biến thể Tim3_0016 (0018) | QIVLTQSPAI MSASPGQKVT ITCSASSSVN YTQWYQQKLG SSPKLWIYDA FKLAPGVPAR FSGSGTGTSY SLTISSMEAE DAASYFCHQW SSYPWTFGGG TKLEIK |
| 11 | chuỗi nhẹ HVR-L1, biến thể Tim3_0016_HVR-L1 1_NQ (loại bỏ vị trí glycosyl hóa bằng cách gây đột biến N thành Q) | SSSVQY |
| 12 | chuỗi nhẹ HVR-L1, biến thể Tim3_0016_HVR-L1 2_NS (loại bỏ vị trí glycosyl hóa bằng cách gây đột biến N thành S) | SSSVSY |
| 13 | Phiên bản được nhân hóa VH của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433) | QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMSVGWIR QPPGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTLVTVSS |
| 14 | Phiên bản được nhân hóa VL của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433) | ETTLTQSPAF MSATPGDKVN IACSASSSVS YTQWYQQKPG EAPKLWIYDA FKLAPGIPPR FSGSGYGTDF TLTINNIESE DAAYYFCHQW SSYPWTFGQG TKLEIK |
| 15 | Phiên bản được nhân hóa VH của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434) | QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMSVGWIR QPPGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ITKDTSKNQV |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | VLTMTNMDPV DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTLVTVSS |
| 16 | Phiên bản được nhân hóa VL của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434) | DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCSASSSVS YTQWYQQKPG KAPKLWIYDA FKLAPGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYFCHQW SSYPWTFGQG TKLEIK |
| 17 | chuỗi nặng HVR-H1, Tim3_0028 | GFNIKTT |
| 18 | chuỗi nặng HVR-H2, Tim3_0028 | ADD |
| 19 | chuỗi nặng HVR-H3, Tim3_0028 | FGYVAWFA |
| 20 | chuỗi nhẹ HVR-L1, Tim3_0028 | SQSVDNY |
| 21 | chuỗi nhẹ HVR-L2, Tim3_0028 | YAS |
| 22 | chuỗi nhẹ HVR-L3, Tim3_0028 | HYSSPY |
| 23 | miền biến đổi chuỗi nặng VH, Tim3_0028 | EVQLQQSVAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK TTYMHWVKQR PEQGLEWIGR IDPADDNTKY APKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED AAIYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTFSA |
| 24 | miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, Tim3_0028 | NIVMTPTPKF LPVSSGDRVT MTCRASQSVD NYVAWYQQKP GQSPKLLIYY ASNRYIGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQV EDLAVYFCQQ HYSSPYTFGS GTKLEIK |
| 25 | Phiên bản được nhân hóa VH của Tim3-0028 (= Tim3-0438) | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK TTYMHWVRQA PGKGLEWVGR IDPADDNTKY APKFQGKATI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTVSS |
| 26 | Phiên bản được nhân hóa VL của Tim3-0028 (= Tim3-0438) | DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRASQSVD NYVAWYLQKP GQSPQLLIYY ASNRYIGVPD RFSGSGSGTD FTLKISRVEA EDVGVYYCQQ HYSSPYTFGQ GTKVEIK |
| 27 | Phiên bản được nhân hóa VH của Tim3-0028 (= Tim3-0443) | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK TTYMHWVRQA PGKGLEWVGR IDPADDNTKY APKFQGKATI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTFSS |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| 28 | Phiên bản được nhân hóa VL của Tim3-0028 (= Tim3-0443) | DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRASQSVD NYVAWYLQKP GQSPQLLIYY ASNRYIGVPD RFSGSGSGTD FTLKISRVEA EDVGVYYCQQ HYSSPYTFGQ GTKVEIK |
| 29 | chuỗi nặng HVR-H1, Tim3_0038 | GFNIKDY |
| 30 | chuỗi nặng HVR-H2, Tim3_0038 | EDG |
| 31 | chuỗi nặng HVR-H3, Tim3_0038 | HGYVGWFA |
| 32 | chuỗi nhẹ HVR-L1, Tim3_0038 | ASENVDTY |
| 33 | chuỗi nhẹ HVR-L2, Tim3_0038 | GAS |
| 34 | chuỗi nhẹ HVR-L3, Tim3_0038 | SYSYPW |
| 35 | miền biến đổi chuỗi nặng VH, Tim3_0038 | EVQLQQSGAE PLKPGASVKL TCTTSGFNIK DYYIHWVKQR SDQGLEWIGR IDPEDGELIY APKFQDKATI TVDTSSNIAY LQLNSLTSED TAVYYCSRDH GYVGWFAYWG QGTLVTVSA |
| 36 | miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, Tim3_0038 | NVVMTQSPKS MIMSVGQRVT LNCKASENVD TYVSWYQQKP EQSPKLLIYG ASNRYTGVPD RFTGSRSATD FTLTISSVQA EDLAVYYCGQ SYSYPWTFGG GTKLEFR |
| 37 | chuỗi nặng HVR-H1, PD1-0103 | GFSFSSY |
| 38 | chuỗi nặng HVR-H2, PD1-0103 | GGR |
| 39 | chuỗi nặng HVR-H3, PD1-0103 | TGRVYFALD |
| 40 | chuỗi nhẹ HVR-L1, PD1-0103 | SESVDTSDNSF |
| 41 | chuỗi nhẹ HVR-L2, PD1-0103 | RSS |
| 42 | chuỗi nhẹ HVR-L3, PD1-0103 | NYDVPW |
| 43 | miền biến đổi chuỗi nặng VH, PD1-0103 | EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCA ASGFSFSSYTMSWVRQTPEKRL DWVATISGGGRDIYYPDSVKGR FTISRDNAKNTLYLEMSSLMSED TALYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTSVTVSS |
| 44 | miền biến đổi chuỗi nhẹ VL, PD1-0103 | KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCR ASESVDTSDNSFIHWYQQRPGQ SPKLLIYRSSTLESGVPARFSGSG SRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQ QNYDVPWTFGGGTKLEIK |
| 45 | biến thể được nhân hóa -miền biến đổi chuỗi nặng VH của PD1-0103_01 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSFSSYTMSWVRQAPGKG |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | LEWVATISGGGRDIYYPDSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCVLLTGRVYFALDSW GQGTLVTVSS |
| 46 | biến thể được nhân hóa -miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_01 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVDTSDNSFIHWYQQKPG QSPKLLIYRSSTLESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQNYDVPWTFGQGTKVEIK |
| 47 | biến thể được nhân hóa -miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_02 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC RASESVDTSDNSFIHWYQQRPG QSPRLLIYRSSTLESGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CQQNYDVPWTFGQGTKVEIK |
| 48 | biến thể được nhân hóa -miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_03 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQ SPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ NYDVPWTFGQGTKVEIK |
| 49 | biến thể được nhân hóa -miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_04 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQ SPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ NYDVPWTFGQGTKVEIK |
| 50 | chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028) | KIVLTQSPAS LPVSLGQRAT ISCRASESVD TSDNSFIHWY QQRPGQSPKL LIYRSSTLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDVATY YCQQNYDVPW TFGGGTKLEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK |
| 51 | chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0389 | EVQLQQSVAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK TTYMHWVKQR PEQGLEWIGR IDPADDNTKY APKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED AAIYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTFSAA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVED YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDEKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL GAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSRDEL TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK |
| 52 | chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0389 | EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFSFS SYTMSWVRQT PEKRLDWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLMSED TALYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTSVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| 53 | chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0389 | NIVMTPTPKF LPVSSGDRVT MTCRASQSVD NYVAWYQQKP GQSPKLLIYY ASNRYIGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQV EDLAVYFCQQ HYSSPYTFGS GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC |
| 54 | chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0018) | KIVLTQSPAS LPVSLGQRAT ISCRASESVD TSDNSFIHWY QQRPGQSPKL LIYRSSTLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDVATY YCQQNYDVPW TFGGGTKLEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK |
| 55 | chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0168 | QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLS TSGMSVGWIR QPSGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKRRLT ISKDTSNNQV FLQIASVVTA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGISVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVE DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDEKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LGAPIEKTIS KAKGQPREPQ VCTLPPSRDE LTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNRFT QKSLSLSPGK |
| 56 | chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0168 | EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFSFS SYTMSWVRQT PEKRLDWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLMSED TALYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTSVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 57 | chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0168 | QIVLTQSPAI MSASPGQKVT ITCSASSSVN YTQWYQQKLG SSPKLWIYDA FKLAPGVPAR FSGSGTGTSY SLTISSMEAE DAASYFCHQW SSYPWTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DRKLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC |
| 58 | chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0166: (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0038 | KIVLTQSPAS LPVSLGQRAT ISCRASESVD TSDNSFIHWY QQRPGQSPKL LIYRSSTLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDVATY YCQQNYDVPW |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | TFGGGTKLEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK |
| 59 | chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0166 | EVQLQQSGAE PLKPGASVKL TCTTSGFNIK DYYIHWVKQR SDQGLEWIGR IDPEDGELIY APKFQDKATI TVDTSSNIAY LQLNSLTSED TAVYYCSRDH GYVGWFAYWG QGTLVTVSAA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVED YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDEKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL GAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSRDEL TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK |
| 60 | chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0166 | EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFSFS SYTMSWVRQT |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | PEKRLDWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLMSED TALYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTSVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 61 | chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0166 | NVVMTQSPKS MIMSVGQRVT LNCKASENVD TYVSWYQQKP EQSPKLLIYG ASNRYTGVPD RFTGSRSATD FTLTISSVQA EDLAVYYCGQ SYSYPWTFGG GTKLEFRRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC |
| 62 | chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0476: (dựa trên PD1-0103_0312 được nhân hóa)/ Tim3-0438) | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASESVD TSDNSFIHWY QQKPGQSPKL LIYRSSTLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYDVPW TFGQGTKVEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK |
| 63 | chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0476 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK TTYMHWVRQA PGKGLEWVGR IDPADDNTKY APKFQGKATI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVED YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDEKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL GAPIEKTISK AKGQPREPQV CTLPPSRDEL TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK |
| 64 | chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0476 | EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTLVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 65 | chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0476 | DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRASQSVD NYVAWYLQKP GQSPQLLIYY ASNRYIGVPD RFSGSGSGTD FTLKISRVEA EDVGVYYCQQ HYSSPYTFGQ |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC |
| 66 | chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0477: (dựa trên PD1-0103_0312 được nhân hóa) / Tim3-0434) | DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASESVD TSDNSFIHWY QQKPGQSPKL LIYRSSTLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNYDVPW TFGQGTKVEI KSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK |
| 67 | chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0477 | QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS TSGMSVGWIR QPPGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVE DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDEKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LGAPIEKTIS KAKGQPREPQ VCTLPPSRDE LTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| 68 | chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0477 | EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTLVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 69 | chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0477 | DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCSASSSVS YTQWYQQKPG KAPKLWIYDA FKLAPGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYFCHQW SSYPWTFGQG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DRKLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC |
| 70 | chuỗi nặng của 2+2 PD1TIM3_0358: PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028 | EVQLQQSVAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK TTYMHWVKQR PEQGLEWIGR IDPADDNTKY APKFQGKATI TADTSSNTAY LQLSSLTSED AAIYYCVRDF GYVAWFAYWG QGTLVTFSAA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVED YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | ICNVNHKPSN TKVDEKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL GAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG GGSGGGGSGG GGSGGGGSKI VLTQSPASLP VSLGQRATIS CRASESVDTS DNSFIHWYQQ RPGQSPKLLI YRSSTLESGV PARFSGSGSR TDFTLTIDPV EADDVATYYC QQNYDVPWTF GGGTKLEIKS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCD |
| 71 | chuỗi nhẹ 1 của 2+2 PD1TIM3_0358 | NIVMTPTPKF LPVSSGDRVT MTCRASQSVD NYVAWYQQKP GQSPKLLIYY ASNRYIGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQV EDLAVYFCQQ HYSSPYTFGS GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG |
| 72 | chuỗi nhẹ 2 của 2+2 PD1TIM3_0358 | EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFSFS SYTMSWVRQT PEKRLDWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLMSED TALYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTSVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 73 | chuỗi nặng của 2+2 PD1TIM3_0359: PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0018 | QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLS TSGMSVGWIR QPSGKGLEWL AHIWLNDDVF FNPALKRRLT ISKDTSNNQV FLQIASVVTA DTATYYCVRA NGYLYALDYW GQGISVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVE DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDEKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LGAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSK IVLTQSPASL PVSLGQRATI SCRASESVDT SDNSFIHWYQ QRPGQSPKLL IYRSSTLESG VPARFSGSGS RTDFTLTIDP VEADDVATYY CQQNYDVPWT FGGGTKLEIK SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCD |
| 74 | chuỗi nhẹ 1 của 2+2 PD1TIM3_0359 | QIVLTQSPAI MSASPGQKVT ITCSASSSVN YTQWYQQKLG SSPKLWIYDA FKLAPGVPAR FSGSGTGTSY SLTISSMEAE |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | DAASYFCHQW SSYPWTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DRKLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC |
| 75 | chuỗi nhẹ 2 của 2+2 PD1TIM3_0359 | EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFSFS SYTMSWVRQT PEKRLDWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLMSED TALYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTSVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 76 | chuỗi nặng của 2+2 PD1TIM3_0321: PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0038 | EVQLQQSGAE PLKPGASVKL TCTTSGFNIK DYYIHWVKQR SDQGLEWIGR IDPEDGELIY APKFQDKATI TVDTSSNIAY LQLNSLTSED TAVYYCSRDH GYVGWFAYWG QGTLVTVSAA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVED YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDEKVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL GAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG GGSGGGGSGG GGSGGGGSKI VLTQSPASLP |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | VSLGQRATIS CRASESVDTS DNSFIHWYQQ RPGQSPKLLI YRSSTLESGV PARFSGSGSR TDFTLTIDPV EADDVATYYC QQNYDVPWTF GGGTKLEIKS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCD |
| 77 | chuỗi nhẹ 1 của 2+2 PD1TIM3_0321 | NVVMTQSPKS MIMSVGQRVT LNCKASENVD TYVSWYQQKP EQSPKLLIYG ASNRYTGVPD RFTGSRSATD FTLTISSVQA EDLAVYYCGQ SYSYPWTFGG GTKLEFRRTV AAPSVFIFPP SDRKLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC |
| 78 | chuỗi nhẹ 2 của 2+2 PD1TIM3_0321 | EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFSFS SYTMSWVRQT PEKRLDWVAT ISGGGRDIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LEMSSLMSED TALYYCVLLT GRVYFALDSW GQGTSVTVSS ASVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |
| 79 | vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa ở người | RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| 80 | vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda ở người | QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTH EGSTVEKTVA PTECS |
| 81 | vùng hằng định chuỗi nặng ở người có nguồn gốc từ IgG1 | ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| 82 | vùng hằng định chuỗi nặng ở người có nguồn gốc từ IgG1 có đột biến L234A và L235A | ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| 83 | vùng hằng định chuỗi nặng ở người có nguồn gốc từ IgG1 có đột biến L234A, L235A và P329G | ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LGAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| 84 | vùng hằng định chuỗi nặng ở người có nguồn gốc từ IgG4 | ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK |
| 85 | trình tự TIM3 ở người lấy làm ví dụ | SEVEYRAEVG QNAYLPCFYT PAAPGNLVPV CWGKGACPVF ECGNVVLRTD ERDVNYWTSR YWLNGDFRKG DVSLTIENVT LADSGIYCCR IQIPGIMNDE KFNLKLVIKP AKVTPAPTRQ RDFTAAFPRM LTTRGHGPAE TQTLGSLPDI NLTQISTLAN ELRDSRLAND LRDSGATIRI GIYIGAGICA GLALALIFGA LIFKWYSHSK EKIQNLSLIS LANLPPSGLA NAVAEGIRSE ENIYTIEENV YEVEEPNEYY CYVSSRQQPS QPLGCRFAMP |
| 86 | Miền ngoại bào (ECD) TIM3 ở người | SEVEYRAEVG QNAYLPCFYT PAAPGNLVPV CWGKGACPVF |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | ECGNVVLRTD ERDVNYWTSR YWLNGDFRKG DVSLTIENVT LADSGIYCCR IQIPGIMNDE KFNLKLVIKP AKVTPAPTRQ RDFTAAFPRM LTTRGHGPAE TQTLGSLPDI NLTQISTLAN ELRDSRLAND LRDSGATIRI G |
| 87 | trình tự PD1 người lấy làm ví dụ | PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL |
| 88 | Miền ngoại bào (ECD) PD1 người | PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV |
| 89 | Miền ngoại bào (ECD) PD1 người bao gồm peptit tín hiệu | MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRP GWFLDSPDRPWNPPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQ PGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYLCGAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAH PSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLL GSLVLLVWVLAVICSRAARGTI GARRTGQPLKEDPSAVPVFSVD YGELDFQWREKTPEPPVPCVPE QTEYATIVFPSGMGTSSPARRGS ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL |
| 90 | Đoạn đệm GGGGS | GGGGS |
| 91 | Đuôi SNAP | DKDCEMKRTTLDSPLGKLELSG CEQGLHEIKLLGKGTSAADAVE |

| SEQ ID NO: | Tên | Trình tự |
|---|---|---|
| | | VPAPAAVLGGPEPLMQATAWL NAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVF QQESFTRQVLWKLLKVVKFGEV ISYQQLAALAGNPAATAAVKTA LSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVG GYEGGLAVKEWLLAHEGHRLG KPGLGPAGGSPGLEVN |
| 92 | Đuôi Flag | DYKDDDDK |
| 93 | Miền ngoại bào (ECD) TIM3 ở người bao gồm peptit tín hiệu | MFSHLPFDCVLLLLLLLLTRSSE VEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAP GNLVPVCWGKGACPVFECGNV VLRTDERDVNYWTSRYWLNGD FRKGDVSLTIENVTLADSGIYCC RIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPAK VTPAPTRQRDFTAAFPRMLTTR GHGPAETQTLGSLPDINLTQISTL ANELRDSRLANDLRDSGATIRIG IYIGAGICAGLALALIFGALIFKW YSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGL ANAVAEGIRSEENIYTIEENVYE VEEPNEYYCYVSSRQQPSQPLG CRFAM |
| 94 | Đuôi Clip | DKDCEMKRTTLDSPLGKLELSG CEQGLHRIIFLGKGTSAADAVEV PAPAAVLGGPEPLIQATAWLNA YFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQ ESFTRQVLWKLLKVVKFGEVISE SHLAALVGNPAATAAVNTALD GNPVPILIPCHRVVQGDSDVGPY LGGLAVKEWLLAHEGHRLGKP GLG |

Theo các phương án cụ thể sau của sáng chế được liệt kê:

1. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm:

miền VH bao gồm:

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm:

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:1,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:12,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6; hoặc

(b) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22; hoặc

(c) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:31; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34.

2. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 50 lần khi so với mức gắn kết với PD1, đặc biệt hơn là với ái lực gắn kết thấp hơn ít nhất 100 lần khi so với mức gắn kết với PD1.

3. Kháng thể đặc hiệu kép theo như được định nghĩa trên đây, trong đó:

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm:

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm:

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24, hoặc

(f) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, hoặc

(g) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, hoặc

(h) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36.

4. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

5. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

6. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này là kháng thể người, kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể khảm.

7. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này bao gồm miền Fc, mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3.

8. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó miền Fc là IgG, đặc biệt là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4.

9. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin mà làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc, đặc biệt là đối với thụ thể Fcγ.

10. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó miền Fc thuộc phân nhóm IgG1 người có đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

11. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

12. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm các phần phình và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm các phần lõm theo phương pháp phần phình vào phần lõm.

13. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin S354C và T366W (đánh số theo EU) và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin Y349C, T366S và Y407V (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

14. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó trong một trong các mảnh Fab, miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau sao cho miền VH là một phần của chuỗi nhẹ và miền VL là một phần của chuỗi nặng.

15. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó trong mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1, miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau.

16. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó trong một trong các mảnh Fab trong miền hằng định CL, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền

hằng định CH1, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

17. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, trong đó trong mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3 miền hằng định CL, axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

18. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:69.

19. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:69.

20. Polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây.

21. Vectơ, đặc biệt là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit như được định nghĩa trên đây.

22. Tế bào chủ nhân rải rác hoặc nhân điển hình bao gồm polynucleotit như được định nghĩa trên đây hoặc vectơ như được định nghĩa trên đây.

23. Phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây, bao gồm các bước là a) biến nạp tế bào chủ bằng vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể đặc hiệu kép nêu trên, b) nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép và c) thu hồi kháng thể đặc hiệu kép từ môi trường nuôi cấy.

24. Dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây và ít nhất một tá dược dược dụng.

25. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây hoặc dược phẩm như được định nghĩa trên đây để sử dụng làm thuốc chữa bệnh.

26. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây hoặc dược phẩm như được định nghĩa trên đây để sử dụng

i) trong điều biến các đáp ứng miễn dịch, như khôi phục hoạt tính tế bào T,

ii) trong kích thích đáp ứng hoặc chức năng miễn dịch,

iii) trong điều trị các bệnh lây nhiễm,

iv) trong điều trị bệnh ung thư,

v) trong trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư,

vi) trong kéo dài sự sống của bệnh nhân mắc bệnh ung thư.

27. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây hoặc dược phẩm như được định nghĩa trên đây để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.

28. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây hoặc dược phẩm như được định nghĩa trên đây để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virut mạn tính.

29. Kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây hoặc dược phẩm như được định nghĩa trên đây để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này được dùng kết hợp với chất hóa trị, bức xạ và/ hoặc các chất khác để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch ung thư.

30. Phương pháp ức chế sự phát triển của tế bào khối u ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép như được định nghĩa trên đây để ức chế sự phát triển của tế bào khối u.

**Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sau đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Nên hiểu rằng các phương án khác nhau khác có thể được thực hiện, tạo ra phần mô tả tổng quát được đề cập trên đây.

Vật liệu & phương pháp tổng quát

Thông tin tổng quát về các trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch người được nêu trong: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Các axit amin của chuỗi kháng thể được đánh số và được đề cập đến theo các hệ thống đánh số theo Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) như được định nghĩa ở trên.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng để thao tác thủ công ADN như được mô tả trong Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Các chất phản ứng sinh phân tử được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra từ oligonucleotit được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học. Đoạn gen dài 600 - 1800 bp, được đặt bên sườn bởi các vị trí phân tách endonucleaza giới hạn đơn lẻ, được lắp ghép bằng cách gắn và buộc các oligonucleotit bao gồm khuếch đại PCR và sau đó tách dòng thông qua các vị trí giới hạn được chỉ định ví dụ KpnI/ SacI hoặc AscI/PacI vào vectơ tách dòng pGA4 dựa trên pPCRScript (Stratagene). Trình tự ADN của các đoạn gen được phân dòng được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Các đoạn tổng hợp gen được sắp xếp thứ tự theo đặc điểm được nên tại Geneart (Regensburg, Germany).

Xác định trình tự ADN

Trình tự ADN được xác định bằng cách giải trình tự vạch kép được thực hiện tại MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) hoặc Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Germany).

Phân tích trình tự ADN và trình tự protein và quản lý dữ liệu trình tự

Gói phần mềm của GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) phiên bản 10.2 và Infomax's Vector NT1 Advance suite phiên bản 8.0 được sử dụng để tạo trình tự, vẽ sơ đồ, phân tích, chú thích và minh họa trình tự.

Vectơ biểu hiện

Để biểu hiện các kháng thể được mô tả, các biến thể của plasmit biểu hiện để biểu hiện thoáng qua các tế bào (ví dụ, trong HEK293) dựa trên việc bố trí ADN bổ sung có hoặc không có gen khởi đầu CMV-Intron A hoặc bố trí bộ gen có gen khởi đầu CMV được áp dụng.

Ngoài cát-xét biểu hiện kháng thể thì vectơ còn chứa:

- gốc sao chép cho phép sao chép plasmit này trong *E. coli*, và
- gen ß-lactamaza mang lại tính kháng ampixilin trong *E. coli*.

Đơn vị phiên mã của gen kháng thể gồm có các thành phần sau:

- (các) vị trí giới hạn độc nhất ở đầu 5'
- gen tăng cường rất sớm và gen khởi đầu rất sớm từ cytomegalovirut người,
- sau đó là trình tự Intron A trong trường hợp bố trí ADN bổ sung,

- vùng không dịch mã 5' của gen kháng thể người,

- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,

- chuỗi kháng thể người (loại dại hoặc có trao đổi miền) dưới dạng ADN bổ sung hoặc dưới dạng bố trí bộ gen có bố trí exon-intron globulin miễn dịch

- vùng không dịch mã 3' có trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, và

- (các) vị trí giới hạn độc nhất ở đầu 3'.

Gen dung hợp bao gồm các chuỗi kháng thể như được mô tả dưới đây được tạo ra bằng kỹ thuật PCR và/hoặc tổng hợp gen và được lắp ghép bằng các phương pháp và kỹ thuật tái tổ hợp đã biết bằng cách nối các đoạn axit nucleic tương ứng, ví dụ, bằng cách sử dụng các vị trí giới hạn độc nhất trong vectơ tương ứng. Trình tự axit nucleic đã được phân dòng được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Để chuyển nhiễm tạm thời, các lượng plasmit lớn hơn được tạo ra bằng cách tạo ra plasmit từ môi trường nuôi cấy *E. coli* được biến nạp (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn được sử dụng như được mô tả trong Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm tạm thời các plasmit biểu hiện tương ứng trong HEK293-EBNA sinh trưởng theo hướng bám dính hoặc trong các tế bào HEK29-F sinh trưởng trong hỗn dịch như được mô tả dưới đây.

Chuyển nhiễm tạm thời trong hệ HEK293

Tất cả các kháng thể và kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tạm thời tế bào 293F bằng cách sử dụng hệ thống Freestyle (ThermoFisher). Tại đây các tế bào 293F được canh trường trong môi trường F17, được chuyển nhiễm bằng 293Free (Novagene) và được cho ăn sau 4 giờ với VPA 4mM và Feed 7 và 0,6% Glucoza sau 16 giờ. Ngoài ra, bộ kit chứa hệ biểu hiện Expi293F™ (ThermoFisher) được sử dụng. Tại đây tế bào Expi293F™ được canh trường trong môi trường biểu hiện Expi293™ và được chuyển nhiễm bằng cách sử dụng bộ kit chuyển nhiễm ExpiFectamine™ 293 theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Do độ ổn định và độ tinh khiết được cải thiện và xu hướng kết tụ giảm của kháng thể đặc hiệu kép *CrossMAb*$^{Vh\text{-}VL}$ có

các cặp axit amin tích điện được đưa vào theo cách bổ sung trong mặt giao cắt CH1/CL (xem các vị trí trong trình tự tương ứng để có thông tin chi tiết) không có sự điều chỉnh tỷ lệ plasmit nào được sử dụng. Do đó tỷ lệ plasmit tương ứng là 1:1:1:1 cho 1+1 CrossMab hoặc 1:1:1 cho 2+2 CrossMab được sử dụng để đồng chuyển nhiễm plasmit LC, HC, LC cắt chéo và HC cắt chéo. Các phần dịch nổi trên bề mặt tế bào được thu gom sau 7 ngày và được tinh chế bằng các phương pháp tiêu chuẩn.

Xác định protein

Nồng độ protein của các kháng thể được tinh chế và các dẫn xuất được xác định bằng cách xác định mật độ quang học (OD) ở 280 nm, sử dụng hệ số hấp thụ phân tử được tính trên cơ sở trình tự axit amin theo Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Xác định nồng độ kháng thể trong phần dịch nổi trên bề mặt

Nồng độ của kháng thể và các dẫn xuất trong phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được ước tính bằng cách kết tủa miễn dịch với hạt Protein A Agaroza (Roche). 60µL hạt Protein A Agaroza được rửa ba lần trong TBS-NP40 (Tris 50mM, độ pH = 7,5, NaCl 150mM, Nonidet-P40 1%). Sau đó, 1 -15mL phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được áp dụng vào hạt Protein A Agaroza đã được cân bằng từ trước trong TBS-NP40. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các hạt được rửa trên cột lọc Ultrafree-MC (Amicon) một lần với 0,5mL TBS-NP40, hai lần với 0,5mL 2x nước muối đệm phosphat (2xPBS, Roche) và nói một cách ngắn gọn là bốn lần với 0,5mL Na-xitrat 100mM độ pH = 5,0. Kháng thể gắn kết được rửa giải bằng cách bổ sung 35µl chất đệm mẫu NuPAGE® LDS (Invitrogen). Một nửa mẫu được kết hợp với chất khử mẫu NuPAGE® hoặc để yên không khử, một cách tương ứng, và được làm nóng trong 10 phút ở nhiệt độ 70°C. Sau đó, 5-30µl được áp dụng vào 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (với chất đệm MOPS cho SDS-PAGE không được khử và chất đệm MES với chất chống oxy hóa NuPAGE® vận hành chất phụ gia đệm (Invitrogen) cho SDS-PAGE không được khử) và được nhuộm bằng Coomassie Blue.

Nồng độ của kháng thể và các dẫn xuất trong phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được đo số lượng bằng sắc ký HPLC ái lực. Nói một cách ngắn gọn, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào chứa kháng thể và các dẫn xuất mà gắn kết với Protein A được áp dụng vào cột Applied Biosystems Poros A/20 trong $KH_2PO_4$ 200mM, natri

xitrat 100mM, độ pH = 7,4 và được rửa giải khỏi cơ chất bằng NaCl 200mM, axit xitric 100mM, độ pH = 2,5 trên hệ thống Agilent HPLC 1100. Protein đã được rửa giải được định lượng bằng mức hấp thụ UV và tích phân các diện tích đỉnh. Kháng thể IgG1 tinh khiết chuẩn được nhằm làm tiêu chuẩn.

Theo một cách khác, nồng độ của kháng thể và các dẫn xuất trong phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được đo bằng Sandwich-IgG-ELISA. Nói một cách ngắn gọn, các đĩa vi chuẩn có 96 giếng StreptaWell High Bind Strepatavidin A (Roche) được phủ 100µL/giếng phân tử bắt kháng IgG người được biotinyl hóa F(ab')2<h-Fcγ> BI (Dianova) ở 0,1µg/mL trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc theo cách khác là qua đêm ở nhiệt độ 4°C và sau đó rửa ba lần bằng PBS 200µL/giếng, Tween 0,05% (PBST, Sigma). 100µL/giếng của dãy pha loãng trong PBS (Sigma) của phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào chứa kháng thể tương ứng được bổ sung vào các giếng và được ủ trong từ 1 đến 2 giờ trên thiết bị lắc dạng đĩa vi chuẩn ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa ba lần bằng PBST 200µL/giếng và kháng thể gắn kết được phát hiện ra bằng 100µl F(ab')2<hFcγ>POD (Dianova) ở 0,1µg/mL dưới dạng kháng thể phát hiện trong từ 1 đến 2 giờ trên thiết bị lắc dạng đĩa vi chuẩn ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không gắn kết được rửa sạch ba lần bằng PBST 200µL/giếng và kháng thể phát hiện gắn kết được phát hiện ra bằng cách bổ sung 100µL ABTS/giếng. Bước xác định mức hấp thụ được thực hiện trên phổ kế Tecan Fluor ở số đo bước sóng là 405nm (bước sóng chuẩn là 492nm).

Tinh chế protein

Protein được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào đã được lọc có tham khảo các phương pháp tiêu chuẩn. Nói một cách ngắn gọn, các kháng thể được áp dụng vào cột Protein A Sepharoza (GE healthcare) và được rửa bằng PBS. Đạt được việc rửa giải kháng thể ở độ pH = 2,8 sau đó là sự trung hòa ngay lập tức của mẫu. Protein đã được kết tụ được tách khỏi các kháng thể monome bằng sắc ký loại trừ kích cỡ (Superdex 200, GE Healthcare) trong PBS hoặc trong Histidin 20mM, NaCl 150mM độ pH = 6,0. Các phần kháng thể monome được tập hợp, được cô (nếu cần) bằng cách sử dụng ví dụ, thiết bị cô ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), được làm đông và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C hoặc -80°C. Một phần các mẫu được cung cấp cho các phân tích protein và đặc trưng hóa phân tích sau đó bằng, ví dụ, SDS-PAGE, sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) hoặc phép đo phổ khối.

SDS-PAGE

Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 10% hoặc 4-12% gel NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (độ pH = 6,4) và NuPAGE® MES (gel được khử, với chất chống oxy hóa NuPAGE® vận hành chất phụ gia đệm) hoặc chất đệm vận hành MOPS (gel không được khử) được sử dụng.

Sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích

Sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) để xác định sự kết tụ và tốc độ oligome của kháng thể được thực hiện bằng sắc ký HPLC. Nói một cách ngắn gọn, các kháng thể được tinh chế Protein A được áp dụng vào cột Tosoh TSKgel G3000SW trong NaCl 300mM, $KH_2PO_4$ 50mM/$K_2HPO_4$, độ pH = 7,5 trên hệ thống Agilent HPLC 1100 hoặc áp dụng vào cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2 x PBS trên hệ thống HPLC Dionex. Protein đã được rửa giải được định lượng bằng mức hấp thụ UV và tích phân các diện tích đỉnh. Chất chuẩn lọc gel BioRad 151–1901 được nhằm làm tiêu chuẩn.

Phép đo phổ khối

Phần này mô tả đặc trưng của kháng thể đa đặc hiệu có sự trao đổi VH/VL (VH/VL CrossMabs) nhấn mạnh sự lắp ráp chính xác của chúng. Các cấu trúc sơ cấp được mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của các CrossMab nguyên vẹn được khử glycosyl hóa và các CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân hủy plasmin hoặc theo một cách khác được khử glycosyl hóa/được phân hủy LysC giới hạn.

VH/VL CrossMab được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidaza F trong phosphat hoặc chất đệm Tris ở nhiệt độ 37°C trong lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Việc phân hủy plasmin hoặc LysC giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100µg VH/VL CrossMab được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, một cách tương ứng. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được loại muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ thống maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Xác định khả năng gắn kết và ái lực gắn kết của kháng thể đa đặc hiệu với các kháng nguyên tương ứng bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (BIACORE)

Khả năng gắn kết của các kháng thể đã được tạo ra với kháng nguyên tương ứng được nghiên cứu bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng công cụ BIAcore (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Nói một cách ngắn gọn, để đo ái lực, kháng thể JIR 109-005-098, IgG dê kháng người được cố định trên chíp CM5 thông qua kỹ thuật ghép cặp amin để trình diện kháng thể kháng kháng nguyên tương ứng. Khả năng gắn kết được đo trong chất đệm HBS (HBS-P (HEPES 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,005%, độ pH = 7,4), 25°C (hoặc theo một cách khác ở nhiệt độ 37°C). Kháng nguyên (hệ thống R&D hoặc được tinh chế trong điều kiện trong nhà) được bổ sung ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch. Mức kết hợp được đo bằng cách tiêm kháng nguyên trong từ 80 giây đến 3 phút; mức phân ly được đo bằng cách rửa bề mặt chíp bằng chất đệm HBS trong từ 3 đến 10 phút và giá trị KD được ước tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir 1:1. Dữ liệu đối chứng âm (ví dụ đường cong đệm) trừ đi đường cong mẫu để hiệu chuẩn độ lệch đường cơ sở bên trong hệ thống và để giảm tín hiệu tiếng ồn. Phần mềm đánh giá Biacore tương ứng được sử dụng để phân tích biểu đồ cảm ứng và để tính dữ liệu ái lực.

Kháng thể TIM3

Ví dụ 1a: tạo ra kháng thể kháng TIM3

Miễn dịch hóa chuột nhắt

Chuột nhắt NMRI được miễn dịch di truyền, sử dụng vectơ biểu hiện plasmit mã hóa Tim-3 người có độ dài đầy đủ bằng cách áp dụng trong da 100ug vectơ ADN (plasmit 15304_hTIM3-fl), sau đó là điện di (2 xung vuông là 1000V/cm, thời gian 0,1 ms, khoảng cách 0,125 giây; sau đó 4 xung vuông là 287,5V/cm, thời gian 10 ms, khoảng cách 0,125 giây. Chuột nhắt nhận 6 miễn dịch hóa liên tiếp vào ngày 0, 14, 28, 42, 56, 70, và 84. Máu được lấy vào ngày 36, 78 và 92 và huyết thanh được chuẩn bị, được sử dụng để xác định oChuẩn bằng ELISA (xem dưới đây). Các con chuột có oChuẩn cao nhất được chọn lọc để thử nghiệm nâng cao vào ngày 96, bằng cách tiêm trong tĩnh mạch 50ug Fc người dạng khảm của Tim-3 người tái tổ hợp, và kháng thể đơn dòng

được phân lập bằng công nghệ lai, bằng cách dung hợp các tế bào lách với dòng tế bào u tủy 3 ngày sau khi thử nghiệm nâng cao.

Xác định oChuẩn huyết thanh (ELISA)

Fc người dạng khảm của Tim-3 người tái tổ hợp được cố định trên đĩa có 96 giếng NUNC Maxisorp ở 0,3ug/ml, 100µl/giếng, trong PBS, sau đó: phong bế đĩa bằng Crotein C 2% trong PBS, 200µl/giếng; áp dụng các phần kháng huyết thanh pha loãng theo dãy, hai lần, trong Crotein C 0,5% trong PBS, 100µl/giếng; phát hiện ra bằng kháng thể chuột nhắt kháng dê được liên hợp HRP (Jackson Immunoresearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000). Đối với tất cả các bước, đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Giữa tất cả các bước, đĩa được rửa 3 lần bằng Tween 20 0,05% trong PBS. Tín hiệu được phát triển bằng cách bổ sung cơ chất hòa tan BM Blue POD (Roche), 100 ul/giếng; và ngừng bằng cách bổ sung HCl 1M, 100 ul/giếng. Mức hấp thụ được ghi lại ở 450nm, dựa trên 690nm làm chuẩn. OChuẩn được xác định dưới dạng phần pha loãng kháng kháng nguyên dẫn đến tín hiệu nửa tối đa.

Ví dụ 1b: Đặc trưng hóa kháng thể kháng TIM3

ELISA cho TIM3

Đĩa Nunc-Maxi Sorp Streptavidine (MicroCoat #11974998/MC1099) được phủ 25µl/giếng bằng Tim3-ECD-His-Biotin (được biotinyl hóa bằng BirA Ligaza) và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trong khi lắc ở tốc độ xoay 400 vòng/phút. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu aTim3 hoặc kháng thể chuẩn đã được pha loãng (1:2 bước) aTim3 F38-2E2 (Biolegend) được bổ sung và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng POD của chuột nhắt kháng cừu (GE NA9310V) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:9000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trong khi lắc ở tốc độ xoay 400 vòng/phút. Sau khi rửa (4x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Calbiochem, #CL07) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 1,5 – 2,5. Sau đó phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 25µl/giếng dung dịch HCL 1N. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị $EC_{50}$ [ng/ml] trong Bảng tóm tắt 1 dưới đây.

ELISA tế bào cho TIM3

Dòng tế bào CHO-K1 bám dính được chuyển nhiễm ổn định bằng plasmit 15312_hTIM3-fl_pUC_Neo mã hóa TIM3 ở người có độ dài đầy đủ và chọn lọc với G418 (chỉ thị kháng Neomyxin trên plasmit) được gieo cấy ở nồng độ bằng 1,2x10E6 tế bào/ml vào đĩa đáy phẳng có 384 giếng và sinh trưởng qua đêm.

Vào ngày tiếp theo, 25µl/giếng mẫu Tim3 hoặc kháng thể chuẩn aTim3 F38-2E2 Azide tự do (Biolegend, 354004) được bổ sung và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C (để tránh hòa lẫn). Sau khi rửa (3x90µl/giếng PBST (BIOTEK Washer: Prog. 29, 1 x 90) các tế bào được cố định bằng cách loại bỏ chất đệm dư và bổ sung 50µl/giếng Glutaraldehyt 0,05%: phần pha loãng theo tỷ lệ 1:500 của Glutaraldehyt 25% (Sigma Cat.No: G5882) trong 1xchất đệm PBS và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3x90µl/giếng PBST (BIOTEK Washer: Prog. 21, 3x90 GreinLysin) 25µl/giếng kháng thể thứ cấp được bổ sung để phát hiện ra (POD của chuột nhắt kháng cừu; mảnh $F(ab')_2$ được liên kết POD hồi hải mã; GE NA9310) sau đó ủ 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong khi lắc ở 400 vòng/phút. Sau khi rửa (3x90µl/giếng PBST (BIOTEK Washer: Prog. 21, 3x90 GreinLysin) 25µl/giếng dung dịch nền TMB (Roche 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 1,5 – 2,5. Sau đó phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 25µl/giếng dung dịch HCL 1N. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA tế bào được liệt kê dưới dạng giá trị "$EC_{50}$ CHO-Tim3" [ng/ml] trong bảng tóm tắt 1 dưới đây.

Bảng 1: Các ái lực gắn kết của các kháng thể lấy làm ví dụ (ELISA và BIACORE)

| Thử nghiệm | Tim3_0018 | Tim3_0021 | Tim3_0028 | Tim3_0026 | Tim3_0033 | Tim3_0038 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ái lực KD [nM] monome / dime Tim3 | 3,4 / 1,1 | 204 / 4,1 | 173 / 2,8 | 6,2 / 1,5 | n.f. / 3,1 | 7,6 / 0,6 |
| $EC_{50}$ ELISA [nM] | 0,56 | | 0,22 | | | 0,501 |
| $EC_{50}$ ELISA [ng/ml] | 94 | 47 | 37 | 47 | 1321 | 83 |
| $EC_{50}$ CHO-Tim3 [nM] | 0,52 | | 0,32 | | | 0,17 |
| $EC_{50}$ CHO-Tim3 [ng/ml] | 87 | 73 | 53 | 69 | 3710 | 29 |

Đặc trưng theo BIAcore của kháng thể TIM3

Thử nghiệm dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để xác định các thông số động học của gắn kết giữa một vài chất gắn kết Tim3 của chuột cũng như đối chứng gắn kết TIM3 ở người bán trên thị trường. Do đó, IgG kháng chuột nhắt được cố định bằng cách ghép cặp amin với bề mặt của chíp cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó các mẫu được bắt và hu/cy Tim3-ECD dạng monome cũng như TIM3 ở người-ECD dime đuôi Fc được gắn kết với chúng. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Hằng số cân bằng $K_D$ cuối cùng đạt được bằng cách khớp dữ liệu với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1.

Khoảng 12000 đơn vị đáp ứng (RU) của 30µg/ml IgG kháng chuột nhắt (GE Healthcare #BR-1008-38) được ghép cặp lên trên vị trí 1,2,4 và 5 của tế bào dòng chảy 1-4 (vị trí 1,5 có hoạt tính và vị trí 2,4 là vị trí đối chiếu) của chíp cảm biến CM5 trong BIAcore B4000 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare.

Mẫu và chất đệm vận hành là HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH = 7,4). Nhiệt của tế bào dòng chảy được thiết lập là 25°C và nhiệt của gian chứa mẫu là 12°C. Hệ thống này được mồi bằng chất đệm vận hành.

Các mẫu được tiêm trong 30 giây với nồng độ bằng 200µg/ml và được gắn với vị trí 1 và 5 của mỗi tế bào dòng chảy, cho phép đo tám mẫu song song. Sau đó tập hợp hoàn chỉnh của các nồng độ khác nhau (TIM3 ở người-ECD dạng dime được dung hợp của khỉ đầu chó dạng monome, người dạng monome và huFc) được tiêm trên mỗi mẫu trong 240 giây sau đó thời gian phân ly là 30/1800 giây. Mỗi chu kỳ phân tích (bắt mẫu, vị trí 1 và 5 – tiêm Tim3 ECD) sau đó được tái tạo với việc tiêm Glyxin-HCl độ pH = 1,7 trong thời gian 30 giây. Tốc độ dòng chảy được thiết lập là 30µl/phút đối với toàn bộ vận hành.

Cuối cùng, dữ liệu đối chiếu kép được khớp với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1 bằng phần mềm đánh giá Biacore B4000. Các ái lực thu được đối với TIM3 ở người dạng dime Tim3 và huFc người, cyno dạng monome được dung hợp được thể hiện trong Bảng 2a. Ái lực đối với hu Tim3 dime gần như có thể bị ảnh hưởng bởi ái lực và do đó mạnh hơn một cách rõ rệt so với ái lực đối với huTim3 dạng monome.

Bảng 2a: Các ái lực gắn kết được xác định bằng giá trị BIAcore-KD đạt được bằng phép đo SPR động học.-n.f. có nghĩa là không thể khớp, gần như có thể do không gắn kết hoặc gắn kết yếu.

| Mẫu | huTim3 $K_D$ (25°C) [M] | huTim3Fc $K_D$ (25°C) [M] | cyTim3 $K_D$ (25°C) [M] |
|---|---|---|---|
| TIM3-0016 | 3,29E-09 | 1,09E-09 | 2,16E-08 |
| Biến thể TIM3-0016 | 3,40E-09 | 1,11E-09 | 4,19E-08 |
| TIM3-0021 | 2,04E-07 | 4,07E-09 | n.f. |
| TIM3-0022 | 1,26E-07 | 1,52E-09 | 2,84E-08 |
| TIM3-0026 | 6,23E-09 | 1,52E-09 | n.f. |
| TIM3-0028 | 1,73E-07 | 2,77E-09 | n.f. |
| TIM3-0030 | 3,11E-09 | 1,28E-09 | n.f. |
| TIM3-0033 | n.f. | 3,05E-09 | n.f. |
| TIM3-0038 | 7,56E-09 | 5,69E-10 | n.f. |
| Kháng thể chuẩn Biolegend F38-2E2 | 1,36E-08 | 7,50E-09 | 1,68E-07 |
| Kháng thể chuẩn USB 11E365 | 1,34E-08 | 7,73E-09 | 1,41E-07 |

Xác định ái lực đối với Tim3 thông qua SPR (Biến thể TIM3-0016 dạng khảm (0018) và phiên bản được nhân hóa)

Protein A được cố định bằng cách ghép cặp amin với bề mặt của chíp cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó các mẫu được bắt và hu Tim3-ECD được gắn với chúng. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Hằng số cân bằng và hằng số tốc độ động học cuối cùng đạt được bằng cách khớp dữ liệu với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1.

Khoảng 2000 đơn vị đáp ứng (RU) của 20µg/ml Protein A được ghép cặp lên trên vị trí 1, 2, 4 và 5 của tất cả các tế bào dòng chảy của chíp cảm biến CM5 trong công cụ Biacore B4000 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare.

Mẫu và chất đệm vận hành là HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH = 7,4). Nhiệt của tế bào dòng chảy được thiết lập là 25°C và nhiệt của gian chứa mẫu là 12°C. Hệ thống được mồi bằng chất đệm vận hành.

Các mẫu khác nhau được tiêm trong 30 giây với nồng độ bằng 10nM và được gắn kết liên tiếp với vị trí 1 và 5 trong tất cả các tế bào dòng chảy. Sau đó tập hợp hoàn chỉnh của các phần pha loãng TIM3 ở người-ECD dạng monome (600nM, 200nM, 66,7nM, 2 × 22,2nM, 7,4nM, 2,5nM và 2 × 0nM) được tiêm liên tiếp trên mỗi mẫu trong 300 giây. Mỗi lần tiêm kháng nguyên sau đó là thời gian phân ly là 12 giây/1000 giây và hai bước tái tạo 30 giây với dung dịch Glyxin-HCl độ pH = 1,5, trong đó bước tái tạo sau cùng chứa giai đoạn ổn định sau khi tiêm 20 giây.

Cuối cùng, dữ liệu đối chiếu kép được khớp với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore B4000. Các giá trị $K_D$ thu được được thể hiện trong Bảng 2b.

Xác định ái lực đối với Tim3 thông qua SPR ((TIM3-0028 dạng khảm và các phiên bản được nhân hóa))

Fc IgG kháng người được cố định bằng cách ghép cặp amin với bề mặt của chíp cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó các mẫu được bắt và hu Tim3-ECD được gắn với chúng. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Hằng số cân bằng và hằng số tốc độ động học cuối cùng đạt được bằng cách khớp dữ liệu với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1.

Khoảng 2500 đơn vị đáp ứng (RU) của 10µg/ml Fc IgG kháng người (GE Healthcare #BR-1008-39) được ghép cặp lên trên vị trí 1, 2, 4 và 5 của tất cả các tế bào dòng chảy của chíp cảm biến CM5 trong công cụ Biacore B4000 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare.

Mẫu và chất đệm vận hành là HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH = 7,4). Nhiệt của tế bào dòng chảy được thiết lập là 25°C và nhiệt của gian chứa mẫu là 12°C. Hệ thống được mồi bằng chất đệm vận hành.

Các mẫu khác nhau được tiêm trong 30 giây với nồng độ bằng 10nM và được gắn kết liên tiếp với vị trí 1 và 5 trong tất cả các tế bào dòng chảy. Sau đó tập hợp hoàn chỉnh của các phần pha loãng TIM3 ở người-ECD dạng monome (600nM, 200nM, 66,7nM, 2 × 22,2nM, 7,4nM, 2,5nM và 2 × 0nM) được tiêm liên tiếp trên mỗi mẫu trong 300 giây. Mỗi lần tiêm kháng nguyên thì sau đó là thời gian phân ly là 12 giây/700 giây và hai

bước tái tạo 30 giây với dung dịch $MgCl_2$ 3M, trong đó bước tái tạo cuối cùng chứa việc "rửa thêm sau khi tiêm" bằng chất đệm vận hành.

Cuối cùng dữ liệu đối chiếu kép được khớp với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore B4000. Các giá trị $K_D$ thu được được thể hiện trong Bảng 2b.

Bảng 2b: Các ái lực gắn kết được xác định bằng giá trị BIAcore-KD đạt được bằng phép đo SPR động học

| Mẫu | huTim3 $K_D$ (25°C) [M] |
|---|---|
| Biến thể TIM3-0016 dạng khảm (0018) | 2,78E-09 |
| TIM3-0433 | 5,74E-09 |
| TIM3-0434 | 5,76E-09 |
| TIM3-0028 dạng khảm | 2,35E-07 |
| TIM3-0438 | 3,05E-07 |
| TIM3-0443 | 2,87E-07 |

Ví dụ 2: Tạo ra dẫn xuất kháng thể kháng TIM3

Dẫn xuất kháng thể dạng khảm

Kháng thể TIM3 dạng khảm được tạo ra bằng cách khuếch đại vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể chuột nhắt kháng TIM3 Tim3-0016, biến thể TIM3-0016 (0018), Tim3-0021, Tim3-0022, Tim3-0026, Tim3-0028, Tim3-0030, và Tim3-0033, Tim3-0038 thông qua PCR và tách dòng chúng vào vectơ biểu hiện của chuỗi nặng dưới dạng protein dung hợp với mạch chính IgG1 người/CH1-bản lề-CH2-CH3 người với đột biến LALA và PG (Leuxin 234 thành Alanin, Leuxin 235 thành Alanin, Prolin 329 thành Glyxin) phá hủy các chức năng tác động và vectơ biểu hiện của chuỗi nhẹ dưới dạng protein dung hợp với C-kappa người. LC và HC Plasmit sau đó được đồng chuyển nhiễm vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ phần dịch nổi trên bề mặt bằng các phương pháp tiêu chuẩn dùng để tinh chế kháng thể.

Loại bỏ vị trí glycosyl hóa NYT: cải biến vị trí 1 HVR-L1 trong Tim3-0016, biến thể Tim3_0016 (gọi là 0018 hoặc Tim3_0018) bằng cách thay thế N bằng Q hoặc S

Các đột biến trong vùng chuỗi nhẹ biến đổi của Tim3_0016 và biến thể Tim3_0016 (0018) được tạo ra bằng cách tạo đột biến in vitro bằng cách sử dụng bộ kit tạo đột biến

định hướng điểm Agilent "Quick Change Lightning Site-directed Mutagenesis Kit" theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Bằng phương pháp này, asparagin (N) của vị trí glycosyl hóa motip NYT trong chuỗi nhẹ HVR-L1 (SEQ ID NO: 4) được thay thế bằng glutamin (Q) (dẫn đến SEQ ID NO: 11 = biến thể Tim3_0016_HVR-L1 1_ NQ) hoặc, theo một cách khác, asparagin (N) được thay thế bằng serin (S) (dẫn đến SEQ ID NO: 12 = biến thể Tim3_0016_HVR-L1 2_ NS). Trong cả hai trường hợp, vị trí glycosyl hóa motip NYT được cải biến một cách thành công. LC và HC plasmit mã hóa các biến thể sau đó được đồng chuyển nhiễm vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ các phần dịch nổi trên bề mặt bằng các phương pháp tiêu chuẩn để tinh chế kháng thể.

Các đột biến đã được tạo ra được thử nghiệm bằng ELISA trên TIM3 ở người, ELISA trên Tim3 khỉ đầu chó và ELISA tế bào trên tế bào CHO-K1 bám dính biểu hiện TIM3 ở người có độ dài đầy đủ.

Bảng 3:

| Kháng thể và kháng thể đột biến được thử nghiệm | Biochem người | | Biochem Cyno | | CHO-TIM3 gắn kết tế bào | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Giá trị $EC_{50}$ [ng/ml] trong mối liên hệ với giá trị tối đa của các mẫu | Điểm uốn [ng/ml] | Giá trị $EC_{50}$ [ng/ml] trong mối liên hệ với giá trị tối đa của các mẫu | Điểm uốn [ng/ml] | Giá trị $EC_{50}$ [ng/ml] trong mối liên hệ với giá trị tối đa của các mẫu | Điểm uốn [ng/ml] |
| Kháng Tim3 F38-2E2 | 73,2 | 88,3 | 423,0 | 209871,3 | 150,2 | 224,3 |
| Tim3_0018 (Biến thể TIM3-0016) | 15,1 | 15,3 | 14,6 | 14,6 | 26,4 | 29,4 |
| Tim3_0018MutNQ | 12,0 | 10,8 | 13,2 | 10,8 | 13,4 | 12,8 |
| Tim3_0018MutNS | 10,3 | 6,5 | 11,9 | 6,5 | 11,2 | 11,1 |
| Tim3_0016MutNQ | 7,6 | 5,7 | 8,3 | 5,7 | 6,3 | 5,4 |
| Tim3_0016MutNS | 8,5 | 5,5 | 9,7 | 5,5 | 9,1 | 8,5 |

Tất cả các thể đột biến đã được tạo ra được phát hiện ra là thể hiện khả năng gắn kết với TIM3 ở người (người), cyno TIM3 (cyno) hoặc TIMR người trên tế bào CHO thậm chí nhiều hơn so với kháng thể ban đầu Tim3_0016 hoặc biến thể kháng thể Tim3_0016 Tim3_0018 một cách tương ứng.

Dẫn xuất kháng thể được nhân hóa

Nhân hóa miền VH và miền VL của biến thể kháng TIM3-0016 của chuột (0018) và kháng Tim3_0028

Dựa trên trình tự axit amin của miền VH và miền VL theo mục a) biến thể Tim3_0016 của kháng thể kháng TIM3 (0018) (với trình tự axit amin của 6 HVR trong đó trong chuỗi nhẹ, biến thể HVR-L1 2_NS (loại bỏ vị trí glycosyl hóa bằng cách gây đột biến N thành S) được sử dụng, các biến thể kháng thể được nhân hóa kháng TIM3 Tim3-0433 và Tim3-0434 được tạo ra và dựa trên trình tự axit amin của miền VH và miền VL theo mục b) kháng thể kháng TIM3 Tim3_0028, biến thể kháng thể được nhân hóa kháng TIM3 Tim3-0438 và Tim3-0443 được tạo ra.

Trình tự axit amin được nhân hóa đối với vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được dịch mã ngược vào ADN và cADN thu được được tổng hợp (GenArt) và sau đó được tách dòng vào vectơ biểu hiện của chuỗi nặng dưới dạng protein dung hợp với mạch chính IgG1 người/CH1-bản lề-CH2-CH3 người có đột biến LALA và PG (Leuxin 234 thành Alanin, Leuxin 235 thành Alanin, Prolin 329 thành Glyxin) phá hủy các chức năng tác động hoặc tách dòng vào vectơ biểu hiện của chuỗi nhẹ dưới dạng protein dung hợp với C-kappa người. LC và HC Plasmit sau đó được đồng chuyển nhiễm vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ các phần dịch nổi trên bề mặt bằng các phương pháp tiêu chuẩn để tinh chế kháng thể. Kháng thể Tim3 đã nhân hóa thu được được đặt tên như sau:

Bảng 4: Trình tự VH và VL của kháng thể được nhân hóa

| Kháng thể được nhân hóa của biến thể Tim3_0016 (0018) | VH/SEQ ID NO: | VL/SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| Tim3-0433 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 14 |
| Tim3-0434 | SEQ ID NO: 15 | SEQ ID NO: 16 |
| Kháng thể được nhân hóa của Tim3_0028 | VH/SEQ ID NO: | VL/SEQ ID NO: |
| Tim3-0438 | SEQ ID NO: 25 | SEQ ID NO: 26 |
| Tim3-0443 | SEQ ID NO: 27 | SEQ ID NO: 28 |

Bảng 5: Trình tự HVR của kháng thể được nhân hóa

| Kháng thể được nhân hóa của biến thể Tim3_0016 (0018) | HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 /SEQ ID NO: | HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 t/SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| Tim3-0433 | SEQ ID NO: 1, 2 và 3 | SEQ ID NO: 12, 5 và 6 |
| Tim3-0434 | SEQ ID NO: 1, 2 và 3 | SEQ ID NO: 12, 5 và 6 |
| Kháng thể được nhân hóa của Tim3_0028 | HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 /SEQ ID NO: | HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 /SEQ ID NO: |

| | | |
|---|---|---|
| Tim3-0438 | SEQ ID NO: 17, 18 và 19 | SEQ ID NO: 20, 21 và 22 |
| Tim3-0443 | SEQ ID NO: 17, 18 và 19 | SEQ ID NO: 20, 21 và 22 |

Ví dụ 3: Tác dụng của kháng thể người kháng TIM-3 đến sản sinh xytokin trong Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR)

Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp được sử dụng để thể hiện tác dụng phong bế con đường TIM-3 đến tế bào tác động lympho. Các tế bào T trong thử nghiệm được thử nghiệm về sự hoạt hóa và tiết IFN-gama khi có hoặc không có mAb kháng TIM-3.

Tế bào lympho người được phân lập khỏi máu ngoại biên của đối tượng cho khỏe mạnh bằng cách ly tâm có gradien mật độ bằng cách sử dụng Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). Nói một cách ngắn gọn, máu được heparin hóa được pha loãng với PBS có thể tích gấp ba lần và 25ml phần phân ước của máu đã pha loãng được xếp từng lớp trong ống Leukosep có dung tích 50ml. Sau khi ly tâm ở tốc độ 8000 $m/s^2$ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (không nghỉ) các phần chứa tế bào lympho được thu gom, được rửa trong PBS và được sử dụng trực tiếp trong thử nghiệm chức năng hoặc được tạo lại huyền phù trong môi trường đông lạnh (DMSO 10%, FCS 90%) ở 1,0E+07 tế bào/ml và được bảo quản trong nitơ lỏng. Tỷ lệ tế bào đích/đáp ứng 1:1 được sử dụng trong thử nghiệm MLR (tức là mỗi môi trường nuôi cấy MLR chứa - 2,0E+05 PBMC từ mỗi đối tượng cho trong tổng thể tích là 200µl. Kháng thể đơn dòng kháng TIM3 Tim3_0016, biến thể Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0021, Tim3_0022, Tim3_0026, Tim3_0028, Tim3_0030, Tim3_0033, Tim3_0038 và F38-2E2 (BioLegend), được bổ sung vào mỗi môi trường nuôi cấy ở các nồng độ kháng thể khác nhau. Không kháng thể hoặc kháng thể đối chứng isotyp nào được sử dụng làm đối chứng âm và rec hu IL-2 (20 EU/ml) được sử dụng làm đối chứng dương. Các tế bào được nuôi cấy trong 6 ngày ở nhiệt độ 37°C. Sau ngày 6, 100µl môi trường được lấy từ mỗi môi trường nuôi cấy để đo xytokin. Nồng độ IFN-gama được đo bằng cách sử dụng bộ kit OptEIA ELISA (BD Biosciences).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6 (Tiết/giải phóng IFN-g). Kháng thể đơn dòng kháng TIM-3 thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết IFN-gama theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Kháng thể kháng TIM3 Tim3_0021, Tim3_0022, Tim3_0028, và Tim3_0038 làm giảm sự giải phóng xytokin IFN-gama viêm) nhiều hơn so với kháng thể F38-2E2. Tim3_0016, biến thể Tim3_0016 (Tim3_0018), Tim3_0033 và Tim3_0038 cho thấy sự giải phóng tương tự khi so sánh với kháng thể F38-2E2. Ngược

lại, môi trường nuôi cấy chứa kháng thể đối chứng isotyp không thể hiện sự tiết IFN-gama gia tăng.

Bảng 6a: Phần trăm kháng thể kháng TIM3 được cảm ứng sự giải phóng IFNgama so với rec hu IL-2 (20 EU/ml) (= 100%) làm đối chứng dương và không kháng thể nào làm đối chứng âm

| Nồng độ hợp chất | MLR +IL-2 20U/ml | Isotyp IgG2a | F38-2E2 | Tim3 0016 | Tim3 0018 | Tim3 0021 | Tim3 0022 | Tim3 0026 | Tim3 0028 | Tim3 0030 | Tim3 0033 | Tim3 0038 | Isotyp hIgG1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40µg/ml | | 2 | 36 | 33 | 36 | 112 | 58 | 25 | 40 | 14 | 35 | 51 | 0 |
| 10µg/ml | 100 | 0 | 26 | 22 | 30 | 108 | 38 | 16 | 38 | 4 | 30 | 38 | 5 |
| 1µg/ml | | 0 | 7 | 7 | 12 | 101 | 18 | 18 | 12 | 3 | 0 | 1 | 0 |

Trong các thử nghiệm khác, giá trị EC50 của kháng thể khảm và kháng thể được nhân hóa sau đây (được tạo ra như được mô tả trên đây) kết hợp với 0,1µg/ml mAb kháng PD1 được đo: kháng thể khảm chi_Tim3_018 và các phiên bản được nhân hóa của nó Tim3-433 và Tim3-434, kháng thể khảm chi_Tim3_028 và các phiên bản được nhân hóa của nó Tim3-438 và Tim3-443 được đo với các hỗn hợp cho tế bào lympho khác nhau (D2 và D3, hoặc D1 và D5, một cách tương ứng). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6b.

Bảng 6b: $EC_{50}$ của kháng thể kháng TIM3 được cảm ứng (Tiết/giải phóng IFN-g)

| Kháng thể | $EC_{50}$ [nM] Với đối tượng cho D2+D3 | $EC_{50}$ [nM] Với đối tượng cho D1+D5 |
|---|---|---|
| chi_Tim3_018 | 3,1 | 4,2 |
| Tim3-433 | 3,0 | 2,4 |
| Tim3-434 | 1,7 | 2,6 |
| chi_Tim3_028 | 2,9 | 6,4 |
| Tim3-438 | 1,9 | 2,7 |
| Tim3-443 | 3,0 | 4,7 |

Kháng thể PD1

Ví dụ 4: Tạo ra kháng thể kháng PD-1

Miễn dịch hóa chuột nhắt

Chuột nhắt NMRI được miễn dịch di truyền, bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện plasmit mã hóa PD-1 người có độ dài đầy đủ bằng cách áp dụng trong da 100ug vectơ

ADN (plasmit15300_hPD1-fl), sau đó điện di (2 xung vuông là 1000V/cm, thời gian 0,1 ms, khoảng cách 0,125 giây; sau đó 4 xung vuông là 287,5V/cm, thời gian 10 ms, khoảng cách 0,125 giây. Chuột nhắt nhận 6 đợt miễn dịch hóa liên tiếp vào ngày 0, 14, 28, 42, 56, 70, và 84. Máu được lấy vào ngày 36, 78 và 92 và huyết thanh được tạo ra, được sử dụng để xác định oChuẩn bằng ELISA (xem dưới đây). Các con chuột có oChuẩn cao nhất được chọn lọc để thử nghiệm nâng cao vào ngày 96, bằng cách tiêm trong tĩnh mạch 50ug Fc người dạng khảm của PD1 người tái tổ hợp, và kháng thể đơn dòng được phân lập bằng công nghệ lai, bằng cách dung hợp các tế bào lách với dòng tế bào u tủy 3 ngày sau khi thử nghiệm nâng cao.

Xác định oChuẩn huyết thanh (ELISA)

Fc người dạng khảm của PD1 tái tổ hợp của người được cố định trên đĩa có 96 giếng NUNC Maxisorp ở 0,3ug/ml, 100 ul/giếng, trong PBS, sau đó: phong bế đĩa bằng Crotein C 2% trong PBS, 200 ul/giếng; áp dụng các phần kháng huyết thanh pha loãng theo dãy, hai lần, trong Crotein C 0,5% trong PBS, 100 ul/giếng; phát hiện ra bằng kháng thể chuột nhắt kháng dê được liên hợp HRP (Jackson Immunoresearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000). Đối với tất cả các bước, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Giữa tất cả các bước, các đĩa được rửa 3 lần bằng Tween 20 0,05% trong PBS. Tín hiệu được phát triển bằng cách bổ sung chất hòa tan BM Blue POD (Roche), 100 ul/giếng; và dừng bằng cách bổ sung HCl 1M, 100 ul/giếng. Mức hấp thụ được ghi lại ở 450nM, dựa vào 690nm làm chuẩn. OChuẩn được xác định dưới dạng phần pha loãng kháng huyết thanh thu được tín hiệu nửa tối đa.

Ví dụ 5: Đặc trưng hóa kháng kháng thể PD1/khả năng gắn kết của kháng kháng thể PD1 với PD1 người

ELISA đối với hu PD1

Đĩa đã phủ Nunc maxisorp streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ 25µl/giếng PD1-ECD-AviHis được biotinyl hóa và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể chuẩn (kháng PD1 của người; Roche/kháng PD1 của chuột nhắt; Biolegend; cat.:329912) được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng H+L-POD dê kháng người (JIR, JIR109-036-088)/ POD của chuột nhắt kháng cừu (GE Healthcare; NA9310) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ

lệ 1:2000/1:1000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche Catalogue No. 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 2 – 3. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng các giá trị $EC_{50}$ [ng/ml] trong bảng tóm tắt 7 và 8 dưới đây.

ELISA tế bào đối với PD1

Dòng tế bào CHO-K1 bám dính được chuyển nhiễm ổn định bằng plasmit 15311_hPD1-fl_pUC_Neo mã hóa PD1 người có độ dài đầy đủ và chọn lọc bằng G418 (chỉ thị kháng Neomyxin trên plasmit) được gieo cấy ở nồng độ bằng 0,01x10E6 tế bào/giếng trong đĩa đáy phẳng có 384 giếng và sinh trưởng qua đêm.

Ngày tiếp theo 25µl/giếng mẫu PD1 hoặc kháng thể chuẩn kháng PD1 của người (Roche)/kháng PD1 của chuột nhắt (Biolegend; cat.:329912) được bổ sung và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C (để tránh hòa lẫn). Sau khi rửa cẩn thận (1x90µl/giếng PBST) các tế bào được cố định bằng cách bổ sung 30µl/giếng Glutaraldehyt 0,05% (Sigma, Cat.No: G5882, 25%) được pha loãng trong 1xchất đệm PBS và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3x90µl/giếng PBST) 25µl/giếng kháng thể thứ cấp được bổ sung để phát hiện: H+L-POD dê kháng người (JIR, JIR109-036-088)/POD của chuột nhắt kháng cừu (GE NA9310) sau đó ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng PBST) 25µl/giếng dung dịch nền TMB (Roche 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 1,0 – 2,0. Các đĩa được đo ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA tế bào được liệt kê dưới dạng giá trị "EC50 CHO-PD1" [ng/ml] trong bảng tóm tắt Bảng 8 dưới đây.

ELISA đối với cyno PD1

Đĩa đã phủ Nunc maxisorp streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ 25µl/giếng cynoPD1-ECD-Biotin được biotinyl hóa và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể chuẩn (kháng PD1 của người; Roche) được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng

H+L-POD dê kháng người (JIR, JIR109-036-088) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:1000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche, 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 2 – 3. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng các giá trị $EC_{50}$ [ng/ml] trong bảng tóm tắt 7 và 8 dưới đây.

Thử nghiệm thay thế phối tử PD 1

Đĩa đã phủ Nunc maxisorp streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ 25µl/giếng PD1-ECD-AviHis được biotinyl hóa và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể chuẩn (kháng PD1 của chuột nhắt; Biolegend; cat.:329912) được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng PD-L1 (Fc khảm B7-H1/PD-L1 tái tổ hợp ở người; 156-B7, R&D) được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng H+L-POD dê kháng người (JIR, 109-036-088) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:1000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche, 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 2 – 3. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị $IC_{50}$ [ng/ml] trong bảng tóm tắt 7 dưới đây.

Thử nghiệm thay thế phối tử PD 2

Đĩa đã phủ Nunc maxisorp streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ 25µl/giếng PD1-ECD-AviHis được biotinyl hóa và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu kháng PD1 hoặc kháng thể chuẩn (kháng huPD1 chuột nhắt; Roche) được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng PD-L2 (Fc khảm B7-DC/PD-L2 người tái tổ hợp; 1224-PL-100, R&D) được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng H+L-POD dê kháng người (JIR, 109-036-088) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:2000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị

lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche, 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 2 – 3. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị $IC_{50}$ [ng/ml] trong bảng tóm tắt 7 dưới đây.

ELISA tạo bản đồ epitop/thử nghiệm cạnh tranh gắn kết

Đĩa Nunc maxisorp (Nunc #464718) được phủ 25µl/giếng kháng thể bắt (IgG dê kháng chuột nhắt; JIR; 115-006-071) và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) các đĩa được phong bế trong 1 giờ với BSA 2% chứa chất đệm PBS ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu kháng PD1 chuột nhắt được bổ sung và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) kháng thể bắt được phong bế bằng 30µl/giếng IgG chuột nhắt (JIR; 015-000-003) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Tại thời điểm đó, PD1-ECD-AviHis được biotinyl hóa được ủ từ trước với kháng thể mẫu thứ hai trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên thiết bị lắc. Sau khi rửa đĩa thử nghiệm (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) hỗn hợp kháng thể PD1 được chuyển vào đĩa thử nghiệm và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng streptavidin POD (Roche, #11089153001) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:4000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche, #11089153001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 1,5 – 2,5. Bước đo diễn ra ở 370/492nm. Các nhóm epitop được xác định bằng cách tụ hợp phân cấp dựa trên kháng thể chuẩn.

Bảng 7: Khả năng gắn kết, ức chế PD-L1 và các nhóm vùng epitop của các kháng thể lấy làm ví dụ (ELISA)

| Kháng thể | ELISA huPD1 $EC_{50}$ [ng/ml] | ELISA cyPD1 $EC_{50}$ [ng/ml] | ức chế ELISA PD-L1 $IC_{50}$ [ng/ml] | ức chế ELISA PD-L2 $IC_{50}$ [ng/ml] | Nhóm vùng epitop bằng thử nghiệm cạnh tranh) |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| PD1- 0050 | 17,9 | 9,8 | 128 | 34 | 1 |
| PD1- 0069 | 45,7 | 22,7 | 225 | 89 | 6 |
| PD1- 0073 | 15,1 | 8,3 | 124 | 65 | 5 |
| PD1- 0078 | 26,3 | 22,4 | x | 86 | 2 |
| PD1- 0098 | 50,8 | 54,6 | 174 | 45 | 5 |
| PD1- 0102 | 34,2 | 52,7 | >35,5µg/ml | 140 | 4 |
| PD1-0103 | 33,7 | 36,9 | 182 | 51 | 5 |

Bảng 8: khả năng gắn kết sinh hóa và gắn kết tế bào của kháng thể được nhân hóa PD1 có nguồn gốc từ kháng thể chuột nhắt PD1-0103 ban đầu (ELISA).

| Kháng thể được nhân hóa | ELISA huPD1 $EC_{50}$ [ng/ml] | ELISA cyPD1 $EC_{50}$ [ng/ml] | ELISA CHO-PD1 $EC_{50}$ [ng/ml] |
|---|---|---|---|
| PD1-103-0312 | 11 | 8,3 | 10,1 |
| PD1-103-0313 | 15 | 11 | 10,8 |
| PD1-103-0314 | 11 | 8,3 | 7,7 |
| PD1-103-0315 | 10 | 7,9 | 7,3 |

Đặc tính Biacore của kháng thể kháng PD-1 được nhân hóa

Thử nghiệm dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để xác định các thông số động học của khả năng gắn kết giữa một vài chất gắn kết PD1 chuột cũng như các chất chuẩn gắn kết PD1 người bán trên thị trường. Do đó, IgG kháng người được cố định bằng cách ghép cặp amin với bề mặt của chíp cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó các mẫu được bắt và hu PD1-ECD được gắn với chúng. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Hằng số cân bằng và hằng số tốc độ động học cuối cùng đạt được bằng cách khớp dữ liệu với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1.

Khoảng 2000 đơn vị đáp ứng (RU) của 20µg/ml IgG kháng người (GE Healthcare #BR-1008-39) được ghép cặp lên trên các tế bào dòng chảy 1 và 2 (theo một cách khác:

3 và 4) của chíp cảm biến CM5 trong Biacore T200 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare.

Mẫu và chất đệm vận hành là HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH = 7,4). Nhiệt của tế bào dòng chảy được thiết lập là 25°C và nhiệt của gian chứa mẫu là 12°C. Hệ thống được mồi bằng chất đệm vận hành.

Các mẫu được tiêm trong 20 giây với nồng độ bằng 10nM và được gắn với tế bào dòng chảy thứ hai. Sau đó tập hợp hoàn chỉnh của các nồng độ PD1 người-ECD (144nM, 48nM, 16nM, 5,33nM, 1,78nM, 0,59nM, 0,20nM và 0nM) được tiêm trên mỗi mẫu trong 120 giây sau đó là thời gian phân ly 30/300 giây và hai bước tái tạo 20 giây với $MgCl_2$ 3M, trong đó bước tái tạo cuối cùng chứa giai đoạn "rửa thêm sau tiêm" bằng chất đệm vận hành.

Cuối cùng, dữ liệu đối chiếu kép được khớp với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1 bằng phần mềm đánh giá Biacore T200. Các giá trị $K_D$, $k_a$ và $k_d$ thu được được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9: Hằng số tốc độ động học và hằng số cân bằng đối với PD1-0103 dạng khảm và PD1-Ab được nhân hóa được xác định bằng Biacore.

| Phối tử | $k_a$ [$M^{-1}s^{-1}$] | $k_d$ [$s^{-1}$] | $K_D$ [nM] |
|---|---|---|---|
| PD1-0103 dạng khảm | 3,86E+05 | 3,07E-04 | 0,8 |
| PD1-0103-0312 | 1,95E+05 | 3,45E-04 | 1,8 |
| PD1-0103-0313 | 1,60E+05 | 3,67E-04 | 2,3 |
| PD1-0103-0314 | 1,87E+05 | 2,79E-04 | 1,5 |
| PD1-0103-0315 | 1,89E+05 | 2,91E-04 | 1,5 |

Như được thể hiện trong Bảng 9, tất cả các phiên bản được nhân hóa của PD1-0103 dạng khảm (quá trình tạo ra xem Ví dụ 6) biểu hiện các tính chất động học tương tự với kháng thể ban đầu (PD1-0103 dạng khảm).

Động học

Cảm biến CM5 dãy S được lắp vào hệ thống Biacore 4000 và các vị trí dò được chỉ định đến địa chỉ theo phương pháp thủy động học theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Kháng thể IgG đa dòng của thỏ <IgGFCγM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) được cố định ở 10 000 Ru trên các vị trí dò 1 và 5 trong tế bào dòng

chảy 1,2,3 và 4. Thực hiện ghép cặp thông qua hóa học EDC/NHS theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các vị trí còn lại trong tế bào dòng chảy được nhằm làm vị trí chuẩn. Chất đệm mẫu là chất đệm trong trong hệ thống được bổ sung 1mg/ml carboxymetyldextran.

Theo một phương án, thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Theo một phương án khác, thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. 50nM mỗi kháng thể đơn dòng của chuột được bắt trên bề mặt cảm biến bằng cách tiêm trong 1 phút ở 10µl/phút. Sau đó các kháng nguyên tương ứng được tiêm trong dãy nồng độ là 100nM, 2x 33nM, 11nM, 4nM, 1nM và chất đệm trong trong hệ thống 0nM ở 30µl/phút trong thời gian 4 phút pha kết hợp. Sự phân ly được theo dõi trong 4 phút nữa. Hệ thống bắt được tái tạo bằng cách sử dụng bước tiêm glyxin 10mM độ pH = 1,5 trong 3 phút ở tốc độ 30µl/phút. Dữ liệu động học tương đối được tính bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tạo bản đồ epitop

Công cụ Biacore 4000 được lắp cảm biến Biacore CAP và được tạo ra như được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Chất đệm trong công cụ là HBS-ET (HEPES 10mM độ pH = 7,4, NaCl 150mM, EDTA 3mM, Tween 20 0,005% trọng lượng/thể tích). Công cụ này được vận hành ở nhiệt độ 25°C.

Tất cả các mẫu được pha loãng trong chất đệm trong trong hệ thống. PD1-ECD-AviHis kháng nguyên được biotinyl hóa 35kDa được bắt ở 200 RU trên bề mặt cảm biến CAP bằng cách tiêm trong 1 phút ở tốc độ 30µl/phút trong tế bào dòng chảy 1, 2, 3 và 4 ở vị trí 1 và 5. Vị trí 2, 3 và 4 được nhằm làm vị trí chuẩn. Theo một phương án khác, PD1-ECD-AviHis kháng nguyên được biotinyl hóa 35 kDa được bắt ở 200 RU trên cảm biến CAP theo cách giống như trên.

Sau đó kháng thể sơ cấp được tiêm ở 100nM trong 3 phút ở tốc độ 30µl/phút sau đó tiêm kháng thể thứ cấp ở 100nM trong 3 phút ở tốc độ 30µl/phút. Kháng thể sơ cấp được tiêm cho đến khi bão hòa hoàn toàn kháng nguyên có trên bề mặt. Ở cuối pha tiêm kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp, các điểm báo cáo "gắn kết muộn" (BL) được thiết lập để theo dõi đáp ứng gắn kết của các kháng thể tương ứng. Tỷ lệ mol, thương số giữa đáp ứng gắn kết kháng thể thứ cấp "BL2" và đáp ứng kháng thể sơ cấp "BL1" được tính. Tỷ lệ mol được sử dụng làm chỉ thị về khả năng tiếp cận kháng nguyên của kháng thể thứ cấp, khi kháng nguyên đã được tạo phức bằng kháng thể sơ cấp.

Các phức này được loại bỏ hoàn toàn khỏi bề mặt cảm biến bằng cách tiêm trong 2 phút ở tốc độ 30µl/phút chất đệm tái tạo 2M guanidin-HCL 250mM NaOH như được khuyến cáo bởi nhà sản xuất, sau đó tiêm trong 1 phút chất đệm trong trong hệ thống ở tốc độ 30µl /phút.

Ví dụ 6: Tác dụng của các kháng thể kháng PD-1 khác nhau đến sự sản sinh xytokin trong phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR)

3A) Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR) là thử nghiệm tế bào miễn dịch đo mức hoạt hóa của các tế bào lympho từ một cá thể (đối tượng cho X) đối với các tế bào lympho từ một cá thể khác (đối tượng cho Y). Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp được sử dụng để biểu hiện tác dụng phong bế con đường PD1 đến tế bào tác động lympho. Các tế bào T trong thử nghiệm được thử nghiệm về sự hoạt hóa và sự tiết IFN-gama của chúng khi có hoặc không có mAb kháng PD1.

Để thực hiện MLR dị sinh, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ ít nhất bốn đối tượng cho khỏe mạnh có kiểu HLA chưa biết được phân lập bằng cách ly tâm có gradien mật độ bằng cách sử dụng Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). Nói một cách ngắn gọn, các mẫu máu được heparin hóa được pha loãng với PBS có thể tích gấp ba lần và 25ml phần phân ước của máu đã pha loãng được xếp từng lớp trong ống Leukosep có dung tích 50ml. Sau khi ly tâm ở tốc độ 8000 $m/s^2$ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (không nghỉ) các phần chứa tế bào lympho được thu gom, được rửa trong PBS và được sử dụng trực tiếp trong thử nghiệm chức năng hoặc được tạo lại huyền phù trong môi trường đông lạnh (DMSO 10%, FCS 90%) ở 1,0E+07 tế bào/ml và được bảo quản trong nitơ lỏng. Các phản ứng MLR 2 đường riêng rẽ được thiết lập bằng cách trộn PBMC từ hai đối tượng cho khác nhau ở tỷ lệ tế bào chất kích thích/chất đáp ứng 1:1 và các bước nuôi cấy đồng thời được thực hiện ít nhất hai lần trong đĩa đáy phẳng có 96 giếng trong 6 ngày ở nhiệt độ 37°C, 5% $CO_2$, khi có hoặc không có khoảng nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng kháng PD1 đã được tinh chế PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103. Để làm kháng thể kháng PD1 chuẩn, các kháng thể bao gồm miền VH và miền VL của nivolumab (còn được biết đến là MDX-5C4 hoặc MDX-1106) hoặc pembrolizumab (còn được biết đến là MK-3475 hoặc Org 1,09A) được tổng hợp và được tách dòng với các mạch chính của IgG1 người (có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)). Không kháng thể hoặc kháng thể đối chứng isotyp nào được sử dụng làm đối chứng âm và rec hu IL-

2 (20 EU/ml) được sử dụng làm đối chứng dương. Sau ngày 6, 100µl môi trường được lấy từ mỗi môi trường nuôi cấy để đo xytokin. Nồng độ IFN-gama được đo bằng cách sử dụng bộ kit OptEIA ELISA (BD Biosciences).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10 (tiết/giải phóng IFN-g). Kháng thể đơn dòng kháng PD1 thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết IFN-gama theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Giá trị gia tăng % tiết IFNg được tính trong mối liên hệ với sản sinh IFN-g của MLR mà không bổ sung mAb phong bế bất kỳ (kích thích dị sinh cơ bản cảm ứng giá trị IFNg dưới dạng E-c) và MLR có bổ sung 20 EU/ml rec hu IL-2 (đối chứng dương = 100% giá trị IFNg dưới dạng E+c) và được tính theo công thức: kích thích tương đối [%] = ((Esampel - E-c)/(E+c - E-c)*100

Bảng 10: Phần trăm tiết IFN gama sau khi kích thích dị sinh và điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 so với tác dụng của việc điều trị bằng IL-2 người tái tổ hợp (20EU/ml) (= 100% giá trị tăng) làm đối chứng dương

| | Nồng độ (µg/ml) | 1:12 | 1:120 | 1:1200 | Tác dụng trong MLR |
|---|---|---|---|---|---|
| PD1-0050 | 44 | 136 | 96 | 33 | +++ |
| PD1-0069 | 60 | 76 | 71 | 55 | +++ |
| PD1-0073 | 43 | 103 | 63 | 38 | ++ |
| PD1-0078 | 64 | 99 | 72 | 21 | ++ |

Một vài kháng thể phong bế PD1 PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103 cho thấy hoạt tính điều biến miễn dịch mạnh bằng cách tăng cường tiết interferon gama (IFN-g) (dữ liệu không được thể hiện đối với tất cả các kháng thể).

3B) Trong một thử nghiệm khác, PD1-0103 dạng khảm (Isotyp IgG1 người có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) được đánh giá. Sự phong bế PD1 bằng PD1-0103 dạng khảm làm tăng mạnh sự tiết IFN-gama bằng tế bào T người sơ cấp đã được kích thích dị sinh. PD1-0103 dạng khảm có hoạt lực nhiều hơn so với kháng thể kháng PD1 chuẩn (xem Fig.1).

Để so sánh, kháng thể kháng PD1 chuẩn bao gồm miền VH và miền VL của nivolumab (còn được biết đến là MDX5C4 hoặc MDX-1106) và pembrolizumab (còn được biết đến là MK-3475 hoặc Org 1,09A) được tổng hợp và được tách dòng với các

mạch chính của IgG1 người (có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) được sử dụng.

3C) Trong các thử nghiệm bổ sung, hoạt tính điều biến miễn dịch của các biến thể được nhân hóa của kháng thể kháng PD-1 PD1-0103 (kháng thể được nhân hóa PD1-0103-0312, PD1-0103-0314, trên Fig.2 và 3, xem cả Ví dụ 9 dưới đây) a) mức độ giải phóng (tiết) IFN b) mức độ giải phóng (tiết) TNF-alpha được đánh giá trong MLR như được mô tả trên đây. Tác dụng của kháng thể PD1-0103 dạng khảm và các phiên bản được nhân hóa của nó được so sánh với kháng thể kháng PD1 chuẩn bao gồm miền VH và miền VL của nivolumab (còn được biết đến là MDX5C4 hoặc MDX-1106) và pembrolizumab (còn được biết đến là MK-3475 hoặc Org 1,09A) với các mạch chính của IgG1 người (có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)). Sau 6 ngày nuôi cấy MLR, 50µl phần dịch nổi trên bề mặt được lấy và nhiều xytokin được đo trong môi trường nuôi cấy đơn lẻ bằng cách sử dụng thử nghiệm Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Th1/Th2 (Bio-Rad Laboratories Inc.). (dữ liệu không được thể hiện đối với tất cả các xytokin).

Kháng thể PD1-0103 dạng khảm và các phiên bản được nhân hóa của nó (PD1-0103_0312 và PD1-0103_0314) có hoạt lực lớn hơn so với kháng thể kháng PD1 chuẩn trong việc tăng cường sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết IFN-gama (xem Fig.2).

Hơn nữa, kháng thể PD1-0103 dạng khảm và các biến thể nhân hóa của nó làm tăng yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) (xem Fig.3) và sự tiết IL-12 (dữ liệu không được thể hiện) bởi các tế bào trình diện kháng nguyên và tăng cường khả năng của bạch cầu đơn nhân/đại thực bào hoặc tế bào trình diện kháng nguyên trong việc kích thích tế bào T.

Ví dụ 7: Tác dụng của việc phong bế kháng PD-1 đến sự giải phóng Granzyme B gây độc tế bào và sự tiết IFN-γ bởi tế bào T CD4 của người được nuôi cấy đồng thời với các tế bào đuôi gai trưởng thành dị sinh

Để nghiên cứu sâu hơn tác dụng của việc điều trị kháng PD-1 trong thiết lập dị sinh, các tác giả sáng chế nghiên cứu thử nghiệm trong đó tế bào T CD4 mới được tinh chế được nuôi cấy đồng thời trong 5 ngày trong sự có mặt của tế bào đuôi gai trưởng thành dị sinh có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân (mDC). Bạch cầu đơn nhân được phân lập khỏi PBMC mới một tuần trước đó nhờ sự bám dính dẻo sau đó loại bỏ các tế bào

không bám dính. Sau đó các tác giả sáng chế tạo ra DC không trưởng thành từ bạch cầu đơn nhân bằng cách nuôi cấy chúng trong 5 ngày trong môi trường chứa GM-CSF (50 ng/ml) và IL-4 (100 ng/ml). Để cảm ứng sự trưởng thành của iDC, các tác giả sáng chế bổ sung TNF-α, IL-1β và IL-6 (50 ng/ml mỗi loại) vào môi trường nuôi cấy trong 2 ngày nữa. Các tác giả sáng chế sau đó đánh giá sự trưởng thành của DC bằng cách đo sự biểu biện của phức hợp tương thích mô chính nhóm II (MHCII), CD80, CD83 và CD86 trên bề mặt chúng thông qua phân tích tế bào theo dòng chảy (LSRFortessa, BD Biosciences).

Vào ngày phản ứng tế bào lympho hỗn hợp nhỏ nhất (mMLR), tế bào T CD4 được làm giàu thông qua bộ kit vi hạt (Miltenyi Biotec) từ $10^8$ PBMC thu được từ đối tượng cho không liên quan. Trước khi nuôi cấy, các tế bào T CD4 được đánh dấu bằng 5μM Carboxy-Fluorescein-Sucxinimidyl Este (CFSE). $10^5$ tế bào T CD4 sau đó được dàn trên đĩa trong đĩa 96 giếng cùng với allo-DC trưởng thành (5:1) khi có hoặc không có sự phong bế kháng thể kháng PD1 (PD1-0103, PD1-0103 dạng khảm, hoặc kháng thể được nhân hóa PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, được viết tắt là 0312, 0313, 0314, 0315 trên Fig.4A và 4 B), ở nồng độ bằng 10μg/ml nếu không chỉ ra khác đi trong các hình vẽ.

Năm ngày sau đó các tác giả sáng chế gom các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào, được sử dụng sau đó để đo nồng độ IFN-γ bằng ELISA (R&D systems), và để yên các tế bào ở 37°C trong 5 giờ nữa trong sự có mặt của Golgi Plug (Brefeldin A) và Golgi Stop (Monensin). Sau đó các tế bào này được rửa, được nhuộm trên bề mặt với kháng thể kháng CD4 người và thuốc nhuộm có thể gắn chặt sống/chết (Live/Dead fixable dye Aqua) (Invitrogen) trước khi được gắn chặt/thấm bằng chất đệm Fix/Perm (BD Bioscience). Các tác giả sáng chế thực hiện bước nhuộm nội bào cho Granzyme B (BD Bioscience), IFN-γ và IL-2 (cả hai đều từ eBioscience).

Các tác giả sáng chế cũng thử nghiệm các nồng độ khác nhau của các biến thể được nhân hóa PD1-0103 (kháng thể được nhân hóa PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, được viết tắt là 0312, 0313, 0314, 0315 trong các hình vẽ, xem cả Ví dụ 9 dưới đây) và phát hiện ra chúng đều tốt như nhau trong việc tăng cường granzyme B và interferon gama. DP47 là IgG người không gắn kết có đột biến LALA trong phần Fc để tránh sự nhận diện bởi FcγR và được sử dụng làm đối chứng âm. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4A và 4 B.

Ví dụ 8: Dẫn xuất kháng thể khảm

Kháng thể PD1 dạng khảm được tạo ra bằng cách khuếch đại vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của kháng thể chuột nhắt kháng PD1 PD1-0098, PD1-0103 thông qua PCR và tách dòng chúng vào vectơ biểu hiện của chuỗi nặng dưới dạng protein dung hợp có mạch chính IgG1 người/CH1-bản lề-CH2-CH3 người có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) (Leuxin 234 thành Alanin, Leuxin 235 thành Alanin, Prolin 329 thành Glyxin) phá hủy các chức năng tác động và vectơ biểu hiện của chuỗi nhẹ dưới dạng protein dung hợp với C-kappa người. LC và HC Plasmit sau đó được đồng chuyển nhiễm vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ các phần dịch nổi trên bề mặt bằng các phương pháp tiêu chuẩn để tinh chế kháng thể. Kháng thể PD1 dạng khảm được đặt lại tên là chiPD1-0098 dạng khảm (chiPD1-0098) và PD1-0103 dạng khảm (chiPD1-0103). Để so sánh, kháng thể kháng PD1 chuẩn bao gồm miền VH và miền VL của nivolumab (còn được biết đến là MDX-5C4 hoặc MDX-1106) và pembrolizumab (còn được biết đến là MK-3475 hoặc Org 1,09A) được tổng hợp và được tách dòng với mạch chính của IgG1 người (có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)) được sử dụng.

Ví dụ 9: Tạo ra, biểu hiện và tinh chế các biến thể được nhân hóa của kháng thể kháng PD1 PD-0103 (huMab PD-0103) và đặc trưng hóa

Nhân hóa miền VH và miền VL của kháng thể kháng PD1 chuột 0103

Dựa trên trình tự axit amin của miền VH và miền VL ở chuột của kháng thể kháng PD1 chuột PD1-0103 (SEQ ID NO: 43 và 44), các biến thể kháng thể kháng PD1 được nhân hóa được tạo ra.

Biến thể VH được nhân hóa dựa trên dòng mầm ở người IMGT_hVH_3_23 kết hợp với dòng mầm thành tố J ở người IGHJ5-01 có một vài đột biến. (dẫn đến SEQ ID NO: 45).

Các biến thể được nhân hóa của VL là dựa trên các dòng mầm ở người IMGT_hVK_4_1, IMGT_hVK_2_30, IMGT_hVK_3_11 và IMGT_hVK_1_39 kết hợp với dòng mầm thành tố J ở người IGKJ1-01. Các đột biến khác nhau tạo ra các biến thể được nhân hóa của SEQ ID NO: 46 đến SEQ ID NO: 49.

Trình tự axit amin được nhân hóa đối với vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của PD1-0103 được dịch mã ngược vào ADN và cADN thu được được tổng hợp (GenArt) và sau đó được tách dòng vào vectơ biểu hiện của chuỗi nặng dưới dạng protein dung hợp với mạch chính IgG1 người/CH1-bản lề-CH2-CH3 người có đột biến LALA và PG (Leuxin 234 thành Alanin, Leuxin 235 thành Alanin, Prolin 329 thành Glyxin) phá hủy các chức năng tác động hoặc tách dòng vào vectơ biểu hiện của chuỗi nhẹ dưới dạng protein dung hợp với C-kappa người. LC và HC Plasmit sau đó được đồng chuyển nhiễm vào HEK293 và được tinh chế sau 7 ngày từ các phần dịch nổi trên bề mặt bằng các phương pháp tiêu chuẩn để tinh chế kháng thể. Các kháng thể PD1 đã nhân hóa thu được được đặt tên như sau:

Bảng 11: Trình tự VH và VL của các kháng thể biến thể được nhân hóa của PD1-0103

| Kháng thể được nhân hóa của PD1-0103 | Biến thể được nhân hóa của VH/SEQ ID NO: | Biến thể được nhân hóa của VL/SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| PD1-0103-0312 | SEQ ID NO: 45 | SEQ ID NO: 46 |
| PD1-0103-0313 | SEQ ID NO: 45 | SEQ ID NO: 47 |
| PD1-0103-0314 | SEQ ID NO: 45 | SEQ ID NO: 48 |
| PD1-0103-0315 | SEQ ID NO: 45 | SEQ ID NO: 49 |

Bảng 12: Trình tự HVR của các kháng thể biến thể được nhân hóa của PD1-0103

| Kháng thể được nhân hóa của PD1-0103 | HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 của biến thể được nhân hóa/SEQ ID NO: | HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 của biến thể được nhân hóa/SEQ ID NO: |
|---|---|---|
| PD-0103-0312 | SEQ ID NO: 37, 38 và 39 | SEQ ID NO: 40, 41 và 42 |
| PD-0103-0313 | SEQ ID NO: 37, 38 và 39 | SEQ ID NO: 40, 41 và 42 |
| PD-0103-0314 | SEQ ID NO: 37, 38 và 39 | SEQ ID NO: 40, 41 và 42 |
| PD-0103-0315 | SEQ ID NO: 37, 38 và 39 | SEQ ID NO: 40, 41 và 42 |

Các biến thể kháng thể PD1-0103 được nhân hóa và PD1-0103 dạng khảm ban đầu được đặc trưng hóa như được mô tả trên đây. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 13.

Bảng 13: Tóm tắt các kết quả cho biến thể kháng thể PD1-0103 được nhân hóa và PD1-0103 dạng khảm ban đầu

| Thử nghiệm | PD1-0103 dạng khảm | PD-0103-0312 | PD-0103-0313 | PD-0103-0314 | PD-0103-0315 |
|---|---|---|---|---|---|

| Ái lực $K_{D\ 37°C}$ [nM] *) | 2,0 / 0,8 | 1,5 / 1,8 | 1,9 / 2,3 | 1,6 / 1,5 | 1,7 / 1,5 |
|---|---|---|---|---|---|
| ELISA $EC_{50}$ [nM] | 0,2 | 0,1 | 0,07 | 0,07 | 0,06 |
| CHO-PD1 $EC_{50}$ | + | + | + | + | + |
| $IC_{50}$ PD-L1, 2 [nM] | 1,35 | tbd | tbd | tbd | tbd |
| Thử nghiệm phản ứng tế bào lympho hỗn hợp | +++ | +++ | +++ | ++++ | ++ |
| Độ phản ứng chéo ở khỉ đầu chó ($EC_{50}$ [nm]) | + | 0,08 | 0,06 | 0,05 | 0,04 |

Ví dụ 10: Hoạt lực trung hòa của kháng thể PD-1

Để thử nghiệm hoạt lực trung hòa của kháng thể PD-1 đã được tạo ra điều kiện trong nhà trong việc bắt chước sự khôi phục đáp ứng tế bào T đã được ức chế in vitro, thử nghiệm báo cáo PD1/PD-L1 bán trên thị trường (Promega) được sử dụng. Hệ thống này bao gồm tế bào $PD1^+$ NFAT Jurkat và tế bào PD-L1+ CHO đối chiếu mà cũng tạo ra tín hiệu hoạt hóa. Về mặt nguyên tắc, hệ thống báo cáo này dựa trên ba bước: (1) hoạt hóa NFAT qua trung gian TCR, (2) ức chế tín hiệu NFAT khi hoạt hóa bằng trục PD-1/PD-L1 và (3) phục hồi tín hiệu NFAT bằng kháng thể phong bế PD-1.

Vật liệu và phương pháp:

- Môi trường PD-L1: PAN Biotech (#P04-03609); FBS (10%) và L-Gln (4mM)
- Môi trường thử nghiệm: RPMI 1640 (#31870; Invitrogen), HEPES 25mM, L-Gln 2mM, FBS (2%)
- Các tế bào được sử dụng cho thử nghiệm này (cả hai loại tế bào đều được mua của Promega):

  Tế bào PD-L1+ CHO (mẻ số #139147): 2-3x104 tế bào/96 giếng

  Tế bào PD-1+ NFAT Jurkat (mẻ số #133024: 3,5x104 tế bào/giếng

Vào ngày 1, tế bào PD-L1+ được rã đông, được gieo cấy ở nồng độ tế bào được chỉ định trong môi trường được đề cập ở trên và được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C và 5% $CO_2$. Vào ngày tiếp theo, môi trường được loại bỏ và các tế bào PD-L1+ được ủ với các kháng thể đã chuẩn bị ở các nồng độ được chỉ định (trong Môi trường thử nghiệm). Song song với đó, tế bào PD-1+ NFAT Jurkat được rã đông và số lượng tế bào nêu trên được chuyển vào và được nuôi cấy đồng thời với tế bào PD-L1+. Sau khi ủ

trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% $CO_2$, cơ chất Bio-Glo được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng (1-2 giờ trước khi bổ sung). Đĩa nuôi cấy tế bào được loại bỏ khỏi tủ ủ và được điều chỉnh đến nhiệt độ trong phòng (10 phút) trước khi bổ sung 80µl dung dịch Bio-Glo trong mỗi giếng, được ủ trong 5-10 phút trước khi độ phát quang được đo ở bộ đọc Tecan Infinite theo khuyến cáo của nhà sản xuất bộ kit. Các kết quả có thể được xem trên Fig.5A và 5B trong đó việc khôi phục sự ức chế qua trung gian PD-1/PD-L1 của tín hiệu NFAT bằng kháng thể PD-1 khác nhau khi kích thích TCR được thể hiện: Fig.5A: PD1_0103 dạng khảm cho thấy tác dụng ưu việt về mặt tái sinh khi so với kháng thể chuẩn. Để làm chuẩn, kháng thể kháng PD1 bao gồm miền VH và miền VL nivolumab (còn được biết đến là MDX-5C4 hoặc MDX-1106) được tổng hợp và được tách dòng với mạch chính của IgG1 người (có đột biến L234A, L235A và P329G (chỉ số EU của Kabat)). Fig.5B: bốn biến thể được nhân hóa của PD1_0103 cho thấy hoạt lực in vitro tương tự với kháng thể và cũng ưu việt hơn một chút so với kháng thể chuẩn.

Kháng thể PD1/TIM3 đặc hiệu kép

Ví dụ 11A

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết với PD1 và TIM3 có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (*CrossMAb*$^{Vh\text{-}VL}$) trong một nhánh gắn kết và có các cải biến thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong mặt giao cắt CH1/CL

Trong một ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết với PD1 người và TIM3 ở người đã được tạo ra được mô tả trong phần phương pháp tổng quát bằng các kỹ thuật sinh học phân tử truyền thống và được biểu hiện thoáng qua trong 293F của tế bào Expi293F như được mô tả trên đây. Kháng thể 1+1 *CrossMAb*$^{Vh\text{-}Vl}$ đa đặc hiệu cũng được mô tả trong WO 2009/080252. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmit biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong Bảng 14a.

Bảng 14a: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (1+1 *CrossMAb$^{Vh-V)}$*

| Kháng thể 1+1 | HC1 | HC2 | LC1 | LC2 |
|---|---|---|---|---|
| PD1TIM3_0389 | SEQ ID NO:50 | SEQ ID NO:51 | SEQ ID NO:52 | SEQ ID NO:53 |
| PD1TIM3-0168 | SEQ ID NO:54 | SEQ ID NO:55 | SEQ ID NO:56 | SEQ ID NO:57 |
| PD1TIM3-0476 | SEQ ID NO:62 | SEQ ID NO:63 | SEQ ID NO:64 | SEQ ID NO:65 |
| PD1TIM3-0477 | SEQ ID NO:66 | SEQ ID NO:67 | SEQ ID NO:68 | SEQ ID NO:69 |
| PD1TIM3_0166 | SEQ ID NO:58 | SEQ ID NO:59 | SEQ ID NO:60 | SEQ ID NO:61 |

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ heterodime hóa phần phình vào phần lõm được sử dụng có thay thế phần phình điển hình (T366W) trong miền CH3 thứ nhất và thay thế phần lõm tương ứng (T366S, L368A và Y410V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein được đưa thêm vào S354C/Y349'C) (được chứa trong trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng được mô tả trên đây).

Ví dụ 11B

Sản xuất và biểu hiện kháng thể đa đặc hiệu gắn kết với PD1 và TIM3 có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (2+2 *CrossMAb$^{Vh-VL}$*) trong hai nhánh gắn kết và có các cải biến thay thế axit amin tích điện đơn lẻ trong mặt giao cắt CH1/CL

Trong một ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết với PD1 người và TIM3 ở người được tạo ra như được mô tả trong phần phương pháp tổng quát bằng các kỹ thuật sinh học phân tử truyền thống và được biểu hiện thoáng qua trong 293F của tế bào Expi293F như được mô tả trên đây. Kháng thể 2+2 *CrossMAb$^{VH-VL}$* đa đặc hiệu cũng được mô tả trong WO 2010/145792. Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện bằng cách sử dụng plasmit biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong Bảng 14b.

Bảng 14b: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), có sự trao đổi/thay thế miền VH/VL (2+2 *CrossMAb$^{Vh-VL}$*)

| Kháng thể 2+2 | HC | LC1 | LC2 |
|---|---|---|---|
| PD1TIM3_0358 | SEQ ID NO:70 | SEQ ID NO:71 | SEQ ID NO:72 |
| PD1TIM3_0359 | SEQ ID NO:73 | SEQ ID NO:74 | SEQ ID NO:75 |
| PD1TIM3_0321 | SEQ ID NO:76 | SEQ ID NO:77 | SEQ ID NO:80 |

Ví dụ 11C

Tinh chế và đặc trưng hóa kháng thể đa đặc hiệu gắn kết với PD1 và TIM3

Kháng thể đa đặc hiệu được biểu hiện trên đây được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt bằng tổ hợp của sắc ký ái lực Protein A và sắc ký loại trừ kích cỡ. Tất cả các kháng thể đa đặc hiệu có thể được sản xuất với hiệu suất tốt và ổn định. Các sản phẩm thu được được đặc trưng về độ đồng nhất bằng phép đo phổ khối và các tính chất phân tích như độ tinh khiết bằng SDS-PAGE, hàm lượng monome và độ ổn định

Phép đo phổ khối

Các cấu trúc sơ cấp được mong đợi được phân tích bằng phép đo phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của các CrossMab nguyên vẹn được khử glycosyl hóa và CrossMab được khử glycosyl hóa/được phân hủy plasmin hoặc theo một cách khác được khử glycosyl hóa/được phân hủy LysC giới hạn.

VH/VL CrossMab được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidaza F trong phosphat hoặc chất đệm Tris ở nhiệt độ 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1mg/ml. Bước phân hủy plasmin hoặc LysC giới hạn (Roche) được thực hiện bằng 100µg VH/VL CrossMab được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris có độ pH = 8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, một cách tương ứng. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được loại muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định thông qua ESI-MS trên hệ thống maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Độ ổn định của kháng thể đa đặc hiệu

Để đánh giá độ ổn định của các cấu trúc kháng thể, độ ổn định nhiệt cũng như nhiệt độ bắt đầu kết tụ được đánh giá theo quy trình sau. Các mẫu của các kháng thể đã được chỉ định được tạo ra ở nồng độ bằng 1mg/mL trong Histidin 20mM/Histidin clorua, NaCl 140mM, độ pH = 6,0, được chuyển vào mảng vi thủy tinh 10µL và dữ liệu phân tán ánh sáng tĩnh cũng như dữ liệu huỳnh quang khi thích thích với laze 266nm được ghi lại bằng công cụ Optim1000 (Avacta Inc.), trong khi các mẫu được gia nhiệt ở tốc độ 0,1°C/phút từ 25°C đến 90°C.

Nhiệt độ bắt đầu kết tụ ($T_{agg}$) được định nghĩa là nhiệt độ mà tại đó cường độ ánh sáng phân tán bắt đầu gia tăng. Nhiệt độ nóng chảy ($T_m$) được định nghĩa là điểm uốn trong cường độ huỳnh quang đối với biểu đồ bước sóng. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 15.

Bảng 15

| | ProtA | | | ProtA + prep SEC | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kháng thể | Hiệu suất [mg/L] | CE-SDS đỉnh chính | SEC monome | Hiệu suất [mg/L] | CE-SDS đỉnh chính | SEC monome | T-agg | MS |
| PD1TIM3-0389 | 21 | 88,9 | 97,6 | 19 | 92,1% | 100% | | được xác nhận |
| PD1TIM3-0168 | 48 | 87,3 | 88,9 | 42 | 98,4% | 95,2% | | được xác nhận |
| PD1TIM3-0476 | 271 | 100 | 97,8 | 230 | 98,9% | 100% | | được xác nhận |
| PD1TIM3-0477 | 211 | 94,3 | 85,3 | 159 | 97,4% | 94,7% | | được xác nhận |

Ví dụ 12

Đặc trưng hóa kháng thể đa đặc hiệu kháng *PD1-TIM3*

Elisa gắn kết

ELISA đối với hu PD1

Đĩa đã phủ Nunc maxisorp streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ 25µl/giếng PD1-ECD-AviHis được biotinyl hóa ở nồng độ bằng 500ng/ml và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl các mẫu kháng thể kháng PD1 được bổ sung ở các nồng độ gia tăng và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng H+L-POD dê kháng người (JIR, JIR109-036-098) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:5000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche, 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 2 – 3. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

ELISA đối với hu TIM3

Đĩa đã phủ Nunc maxisorp streptavidin (MicroCoat #11974998001) được phủ 25µl/giếng TIM3-ECD-AviHis được biotinyl hóa ở nồng độ bằng 60ng/ml và được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl mẫu kháng thể kháng PD1 được bổ sung ở các nồng độ gia tăng và được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng H+L-POD dê kháng người (JIR, JIR109-036-098) được bổ sung trong phần pha loãng tỷ lệ 1:5000 và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên thiết bị lắc. Sau khi rửa (3x90µl/giếng bằng chất đệm PBST) 25µl/giếng cơ chất TMB (Roche, 11835033001) được bổ sung và được ủ cho đến khi OD 2 – 3. Bước đo diễn ra ở 370/492nm.

Các kết quả ELISA được liệt kê dưới dạng giá trị $EC_{50}$ [nM] trong Bảng 16.

Bảng 16: Gắn kết sinh hóa và gắn kết tế bào của kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1-TIM3 (ELISA)

| Kháng thể | Mẫu | huPD1 $EC_{50}$ [nM] | huTIM3 $EC_{50}$ [nM] |
|---|---|---|---|
| PD1 IgG (hóa trị hai) | PD1-0103 dạng khảm | 0,12 | không gắn kết |
| TIM3 IgG (hóa trị hai) | TIM3-0018 dạng khảm | không gắn kết | 0,15 |
| 1+1 (hóa trị hai) | 1+1 PD1TIM3-0168 | 0,11 | 0,41 |
| 2+2 (hóa trị bốn) | 2+2 PD1TIM3-0359 | 0,09 | 0,11 |
| TIM3 IgG (hóa trị hai) | TIM3-0028 dạng khảm | không gắn kết | 0,29<br>cận ổn định trên ở 66% |
| 1+1 (hóa trị hai) | 1+1 PD1TIM3_0389 | 0,13 | không gắn kết |
| 2+2 (hóa trị bốn) | 2+2 PD1TIM3-0358 | 0,08 | 0,19<br>cận ổn định trên ở 65% |

Khả năng gắn kết ái lực Avid (tức là gắn kết với cả hai nhánh) có thể được phát hiện ra đối với các kháng thể có hóa trị hai đối với Tim3 (TIM3-0018 dạng khảm, 2+2 PD1TIM3-0359, TIM3-0028 dạng khảm, 2+2 PD1TIM3-0358). Các giá trị EC50 cao hơn đối với 1+1 CrossMabs do hóa trị một (đối với Tim3), không gắn kết ái lực avid với kháng nguyên được phủ. Tác dụng ái lực không được phát hiện ra đối với gắn kết PD1. Các giá trị EC50 có thể so sánh được đối với mô hình hóa trị hai và hóa trị bốn.

Biacore gắn kết

Các tính chất gắn kết kháng nguyên của kháng thể đa đặc hiệu gắn kết với PD1 và TIM3

Khả năng gắn kết của kháng thể đa đặc hiệu với các kháng nguyên đích tương ứng của chúng, tức là PD1 và TIM3, được đánh giá bằng Biacore®.

Khả năng gắn kết với PD1 được đánh giá theo quy trình sau:

Fc IgG kháng người được cố định bằng cách ghép cặp amin với bề mặt của chíp cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó các mẫu được bắt và hu PD1-ECD được gắn với chúng. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Hằng số cân bằng và hằng số tốc độ động học cuối cùng đạt được bằng cách khớp dữ liệu với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1.

Khoảng 10000 đơn vị đáp ứng (RU) của 20µg/ml IgG kháng người (GE Healthcare #BR-1008-39) được ghép cặp lên trên tất cả các tế bào dòng chảy của chíp cảm biến CM5 trong Biacore T200 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare. Mẫu và chất đệm vận hành là HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH = 7,4). Nhiệt của tế bào dòng chảy được thiết lập là 25°C và nhiệt của gian chứa mẫu là 12°C. Hệ thống được mồi bằng chất đệm vận hành.

Các mẫu khác nhau được tiêm trong 15 giây với nồng độ bằng 10nM và được gắn liên tiếp với tế bào dòng chảy 2, 3 và 4. Sau đó tập hợp hoàn chỉnh của các nồng độ PD1 người-ECD (300nM, 100nM, 2 × 33,3nM, 11,1nM, 3,7nM, 1,2nM và 2 × 0nM) được tiêm trên mỗi mẫu trong 300 giây sau đó là thời gian phân ly 10/600 giây và hai bước tái tạo 30 giây với $MgCl_2$ 3M, trong đó bước tái tạo cuối cùng chứa giai đoạn "rửa thêm sau tiêm" bằng chất đệm vận hành. Cuối cùng dữ liệu đối chiếu kép được khớp với mô

hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1 bằng phần mềm đánh giá Biacore T200. Các giá trị $K_D$, $k_a$ và $k_d$ thu được được thể hiện trong Bảng 17.

Khả năng gắn kết với TIM3 được đánh giá theo quy trình sau:

Fab IgG kháng người được cố định bằng cách ghép cặp amin với bề mặt của chíp cảm biến CM5 (Biacore). Sau đó các mẫu được bắt và hu Tim3-ECD được gắn với chúng. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo sau mỗi chu kỳ phân tích. Hằng số cân bằng và hằng số tốc độ động học cuối cùng đạt được bằng cách khớp dữ liệu với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1.

Khoảng 10000 đơn vị đáp ứng (RU) của 20µg/ml Fab IgG kháng người (GE Healthcare #28-9583-25) được ghép cặp lên trên tất cả các tế bào dòng chảy của chíp cảm biến CM5 trong Biacore T200 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin được cung cấp bởi GE Healthcare. Mẫu và chất đệm vận hành là HBS-EP+ (HEPES 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, độ pH = 7,4). Nhiệt của tế bào dòng chảy được thiết lập là 25°C và nhiệt của gian chứa mẫu là 12°C. Hệ thống được mồi bằng chất đệm vận hành.

Các mẫu khác nhau được tiêm trong 30 giây với nồng độ bằng 10nM và được gắn kết liên tiếp với tế bào dòng chảy 2, 3 và 4. Sau đó tập hợp hoàn chỉnh của các nồng độ TIM3 ở người-ECD (600nM, 200nM, 2 × 66,7nM, 22,2nM, 7,4nM và 2 × 0nM) được tiêm trên mỗi mẫu trong 200 giây sau đó thời gian phân ly là 10/600 giây và hai bước tái tạo 30 giây với Glyxin HCl độ pH = 2,1, trong đó bước tái tạo cuối cùng chứa giai đoạn "rửa thêm sau tiêm" bằng chất đệm vận hành. Cuối cùng dữ liệu đối chiếu kép được khớp với mô hình tương tác Langmuir tỷ lệ 1:1 bằng phần mềm đánh giá Biacore T200. Các giá trị $K_D$, $k_a$ và $k_d$ thu được được thể hiện trong Bảng 17.

Các kết quả được nêu trong Bảng 17.

Bảng 17: Ái lực đối với kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3

| Mẫu | Nhánh PD1 KD [nM] | Nhánh Tim3 KD [nM] |
|---|---|---|
| PD1TIM3-0389 (0357) | 1,3 | 245 |
| PD1TIM3-0358 (2+2) | 0,3 | 240 |
| PD1TIM3-0168 | 1,2 | 10,3 |

| | | |
|---|---|---|
| PD1TIM3-0359 (2+2) | 1,8 | 2,3 |
| PD1TIM3-0476 | 0,1 | 332 |
| PD1TIM3-0477 | <0,1 | 12 |

Tất cả các kháng thể thử nghiệm gắn kết đặc hiệu với cả hai đích, PD1 và TIM3, và biểu hiện ái lực kháng nguyên trong khoảng nanomol.

Ví dụ 13: Thử nghiệm FRET về khả năng gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1/Tim3 với tế bào tái tổ hợp

Ví dụ này mô tả quá trình nghiên cứu của thử nghiệm TR-FRET trên cơ sở tế bào để xác định khả năng gắn kết đồng thời của mô hình kháng thể đặc hiệu kép với hai thụ thể khác nhau có mặt trên một tế bào. Công nghệ Tag-lite được chọn là hỗn hợp của TR-FRET cổ điển (truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang phân giải theo thời gian) và công nghệ SNAP-tag (ví dụ New England Biolabs, CISBIO), cho phép kháng nguyên có mặt trên bề mặt tế bào được đánh dấu bằng chất cho huỳnh quang hoặc thuốc nhuộm thụ thể.

Mục đích của việc đánh giá bằng công nghệ này

Thử nghiệm này được dự định để làm rõ khả năng gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1/Tim3 với các tế bào biểu hiện cả thụ thể PD1 và Tim3 dưới dạng protein dung hợp tái tổ hợp bao gồm miền ngoại bào (ECD) của thụ thể đã nêu và một đuôi, thuốc nhuộm huỳnh quang có thể gắn kết với nó. Trong sự có mặt của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3, mà có thể gắn kết cả hai thụ thể được đánh dấu, các protein sẽ trở nên gần nhau để cho phép truyền năng lượng giữa hai thuốc nhuộm FRET (xem Fig.6).

Tạo ra tế bào $PD1^{+}Tim3^{+}$ HEK tái tổ hợp

Phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng để tạo ra ADN như được mô tả trong Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Để tách dòng biến thể PD1 và TIM3, SNAP hoặc CLIP được xen vào gần với vùng TM của thụ thể và miền bào tương được loại bỏ ngoại trừ 7 aa và được thay thế bằng đuôi Flag.

Chuyển nhiễm tạm thời

Tế bào HEK293 được chuyển nhiễm đồng thời bằng chất phản ứng chuyển nhiễm 293free (Novagen) và môi trường giảm huyết thanh Opti-MEM® I (Life Technologies) trong 30ml thể tích nuôi cấy bằng cách sử dụng hai plasmit đồng thời với 15µg tổng lượng ADN. Nói một cách ngắn gọn, tế bào HEK293 được chuyển nhiễm tạm thời bằng các plasmit sau đây mà mã hóa protein dung hợp bao gồm PD1 hoặc Tim3 ECD và đuôi SNAP hoặc CLIP như được mô tả trong bản mô tả:

Plasmit ID và ID chuẩn ví dụ, PD1-SNAP, Tim3-CLIP (tổ hợp PD1-CLIP và Tim3-SNAP cũng được xây dựng cấu trúc và được biểu hiện, nhưng chỉ thu được tín hiệu FRET thấp).

Plasmit:

a) PD1-SNAP (theo chiều từ 5' đến 3'):

- axit nucleic mã hóa PD1 người-miền ngoại bào bao gồm peptit tín hiệu (gốc 1-170 của SEQ ID NO: 89 (30),
- axit nucleic mã hóa đoạn đệm GGGGS (SEQ ID NO: 90),
- axit nucleic mã hóa SNAP từ đuôi pSNAP(T7)2 (không có gốc metionin đầu tận N) là dạng đột biến của gen người đối với O6-alkylguanin-ADN-alkyltransferaza (hAGT). (So với hAGT loại dại, protein đuôi SNAP chứa đột biến C26A, K125A, A127T, R128A, G131K, G132T, M134L, R135S, C150S, N157G, S159E, và được cắt cụt sau G182) (SEQ ID NO: 91),
- axit nucleic mã hóa đoạn đệm GGGGS (SEQ ID NO: 90),
- axit nucleic mã hóa PD1 người-xuyên màng và miền bào tương (gốc 171-191 của SEQ ID NO: 89),
- axit nucleic mã hóa đoạn đệm GGGGS (SEQ ID NO: 90),
- axit nucleic mã hóa đuôi Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 92).

b) Tim3-CLIP (theo chiều từ 5' đến 3'):

- axit nucleic mã hóa TIM3 ở người-miền ngoại bào bao gồm peptit tín hiệu (gốc 1-202 của SEQ ID NO: 93)
- axit nucleic mã hóa đoạn đệm GGGGS (SEQ ID NO: 90),

- axit nucleic mã hóa CLIP từ pCLIPf (không có gốc metionin đầu tận N), là dạng đột biến của gen người đối với O6-alkylguanin-ADN-alkyltransferaza (hAGT) (SEQ ID NO: 94),
- axit nucleic mã hóa đoạn đệm GGGGS (SEQ ID NO: 90),
- axit nucleic mã hóa TIM3 ở người xuyên màng và miền bào tương (gốc 203-230 của SEQ ID NO: 93)
- axit nucleic mã hóa đoạn đệm GGGGS (SEQ ID NO: 90),
- axit nucleic mã hóa đuôi Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 92).

Khi chuyển nhiễm, các tế bào được ủ trong bình lắc cho đến khi sử dụng cuối cùng cho FACS (24-48 giờ sau chuyển nhiễm) hoặc thử nghiệm FRET (sau 48 giờ).

Xác nhận sự biểu hiện của PD1 và Tim3 trên tế bào HEK293 được chuyển nhiễm tạm thời (FACS)

24-48 giờ sau khi chuyển nhiễm tạm thời các tế bào HEK293, các tế bào này được phân tích về sự biểu hiện PD1 và Tim3: thông thường, 1-3x105 tế bào chuyển nhiễm đơn hoặc kép được nhuộm 30 phút trên đá ở 10µg/ml, được rửa hai lần bằng PBS/2% FCS và được phân tích trên FacsCanto II bằng cách sử dụng

- PD1-FITC Biolegend 329904, dòng vô tính EH12,2H7) hoặc PD1-PE (R&D #FAB1086P) và/hoặc
- Tim3-PE (R&D FAB2365P dòng vô tính 344823) và/hoặc

Đánh dấu tế bào mô tả và thử nghiệm FRET với kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1/Tim3

Đánh dấu tế bào mô tả và thử nghiệm FRET với kháng thể đặc hiệu kép kháng PD1/Tim3:

Các tế bào đã được chuyển nhiễm được lắng cặn và được tạo lại huyền phù ở mật độ 1x106 tế bào/ml trong chất đệm Tag-Lite (Cisbio). Sau đó, các tế bào được nhuộm bằng SNAP-Lumi4-Tb 100nM (Cisbio) và Clip-Red 100nM (Cisbio) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong chất đệm Tag-Lite (Cisbio). Sau khi rửa và tạo lại huyền phù trong PBS/2% FCS, khoảng 50.000 tế bào (trong 50µl thể tích) được gieo cấy vào đĩa màu trắng đáy phẳng có 96 giếng (Costar) đối chứng bevor (ví dụ độ đặc hiệu đơn, isotyp chuẩn) hoặc kháng thể đặc hiệu kép được bổ sung vào các tế bào ở nồng độ cuối cùng

từ 0,001 đến 10nM. Trong một số thử nghiệm, kháng thể đơn dòng ban đầu được liên kết chéo thông qua Fc dê kháng người (nồng độ cuối cùng 20nM, dữ liệu không được thể hiện). Sau khi ủ 1 giờ ở nhiệt độ 4°C hoặc nhiệt độ trong phòng, huỳnh quang phân giải theo thời gian được đo ở tỷ lệ là 665/620nm với bộ đọc BMG Pherastar hoặc Tecan Infinite M1000 Pro bằng cách sử dụng các cài đặt tiêu chuẩn được cung cấp bởi bên bán hàng. Tùy ý, SNAP-Lumi4-Tb và tế bào được đánh dấu Clip-Red 100nM được bảo quản ở nhiệt độ -80°C hoặc trong nitơ lỏng và được rã đông ngay cho thử nghiệm FRET.

Kết quả:

Đặc trưng hóa các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau và các mô hình kháng thể để đồng thời gắn kết thụ thể và liên kết chéo như được thể hiện bởi sự cảm ứng FRET.

Tế bào HEK biểu hiện PD1 và TIM3 được xử lý như được mô tả trên đây để đo tín hiệu FRET khi gắn kết thụ thể đồng thời bằng cách ủ với các lượng đã được chuẩn độ của các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau (0,12-10nM).

Tất cả các kháng thể đặc hiệu kép cảm ứng tín hiệu FRET trong các tế bào biểu hiện PD-1-TIM3 theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Không có sự chênh lệch đột ngột giữa mô hình 1+1 (kháng thể #389 và 168) so với cấu trúc 2+2 (358+359) như có thể được thấy trên Fig 7A.

Ngoài ra, hai mô hình đặc hiệu kép dựa trên kháng thể PD1 TIM3 đã được nhân hóa (#476 và 477) cũng được đánh giá về khả năng của chúng trong việc cảm ứng FRET trong các tế bào khi xử lý. Như được thể hiện trên Fig.7B, cả hai cấu trúc đều cảm ứng tín hiệu FRET ý nghĩa trong tế bào $PD1^{+}Tim3^{+}$ HEK mà tăng cường sự gắn kết đồng thời theo cách chức năng.

Để thể hiện độ đặc hiệu của tín hiệu FRET được cảm ứng bởi khả năng gắn kết đồng thời của kháng thể đặc hiệu kép, IgG đơn dòng chỉ có một độ đặc hiệu được bổ sung để cạnh tranh.

Tế bào PD1 đuôi SNAP và TIM3 đuôi CLIP (như được mô tả ở trên) được đánh dấu bằng SNAP-Lumi4-Tb 100nM và Clip-Red 100nM. Sau khi rửa, các tế bào đã được đánh dấu được ủ với kháng thể kháng PD1/TIM3 đặc hiệu kép #0168 [ở các nồng độ được chỉ định] trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trước khi huỳnh quang phân giải theo thời gian được đo ở 665/620nm với bộ đọc BMG Pherastar (đường màu đen). Để tăng cường

độ đặc hiệu của tín hiệu FRET sau khi xử lý kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đơn dòng kháng PD1 (#0165, Fig.8A, đường cong màu xám) hoặc kháng thể đơn dòng kháng Tim-3 (#0018, Fig.8B, đường cong màu xám) được bổ sung để cạnh tranh dẫn đến sự ngăn chặn gần như hoàn toàn tín hiệu FRET. Một mình kháng thể kháng PD-1 (đặc hiệu đơn) ban đầu không cảm ứng FRET (đường chấm chấm).

Việc cảm ứng tín hiệu FRET cũng được ngăn chặn trong sự có mặt của kháng thể ban đầu TIM3 (0018; đường cong màu xám) được bổ sung đồng thời với kháng thể đặc hiệu kép (Fig 8B).

Ví dụ 14: khả năng gắn kết của kháng thể với các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) khác nhau

Thử nghiệm gắn kết

PBMC mới được phân lập hoặc tế bào T CD4 được hoạt hóa đa dòng 3 ngày (kháng thể kháng CD3 gắn kết trong đĩa và kháng thể kháng CD28 dễ tan, 1ug/ml mỗi kháng thể, cả hai kháng thể đều từ BD Pharmingen) được nhuộm bằng kháng thể đặc hiệu kép kháng TIM-3 hoặc kháng TIM-3/kháng PD-1 được liên hợp trực tiếp Alexa 647 trong 1 giờ ở 4°C. Tế bào này sau đó được rửa để loại bỏ kháng thể không gắn kết và được nhuộm đối với chỉ thị bề mặt trong 30 phút ở 4°C để phân biệt bạch cầu đơn nhân (dương tính với CD14 (BD Pharmingen)), tế bào NK (dương tính với CD16 (eBioscience), dương tính với CD56 (BioLegend) và âm tính với CD3) và tế bào T (dương tính với CD3 (eBioscience)) trước khi được cố định bằng thiết bị cố định tế bào BD Cell Fix. Các tế bào thu được tại LSRFortessa, BD Biosciences. Các kết quả của kháng thể đặc hiệu kép so với kháng thể kháng TIM3 được thể hiện trên Fig.9A đến 9H.

Ví dụ 15: Tiếp nhận

Ví dụ 15A) Tế bào T CD4 được hoạt hóa đa dòng ba ngày, được nuôi cấy từ trước với 1mg/ml kháng CD3 gắn kết trong đĩa và 1mg/ml kháng thể kháng CD28 dễ tan, được ủ trong sự có mặt của kháng thể đặc hiệu kép kháng TIM-3 hoặc kháng TIM-3/kháng PD-1 (hai lần) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào này sau đó được rửa, được chia vào hai nhóm, một trong hai nhóm được ủ trong 3 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C và nhóm còn lại được nhuộm ngay bằng kháng thể thứ cấp được đánh dấu (eBioscience) trước khi được cố định bằng thiết bị cố định tế bào BD Cell Fix. Sau 3 giờ ủ cả nhóm tế bào thứ hai được nhuộm bằng kháng thể thứ cấp được đánh dấu trước khi cố định.

Các tế bào thu được tại LSRFortessa (BD Biosciences) và mức độ biểu hiện của kháng thể dễ phát hiện trên bề mặt tế bào được so sánh giữa hai nhóm. Các kết quả được thể hiện trên Fig.10A đến 10D. 1+1 PD1TIM3-0166 đặc hiệu kép (dựa trên PD1-0103 dạng khảm/TIM3-0038) thể hiện mức tiếp nhận giảm so với 2+2 PD1TIM3-0321 đặc hiệu kép (cũng dựa trên PD1-0103 dạng khảm/TIM3-0038, nhưng có hai vị trí gắn kết kháng nguyên cho PD và hai cho TIM3) và so với kháng thể TIM3-0038 ban đầu trên tế bào T $CD4^+$ đã được hoạt hóa và trên tế bào NK đã được hoạt hóa.

Ví dụ 15B) quan sát bằng mắt thường sự khu trú và tiếp nhận của kháng thể bằng kính hiển vi đồng tiêu huỳnh quang

Tế bào dương tính với CD4 đã được hoạt hóa được nhuộm bằng CMFDA (Molecular Probes, Life technologies), ngoại trừ khi được nhuộm bằng kháng thể a-PD1, và được dàn trên đĩa trên lá kính đậy hình tròn được xử lý bằng Poly-L-Lysin (Sigma). Các tế bào được cho phép bám dính trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C trước khi các kháng thể có đuôi huỳnh quang (1ug/mL: a-TIM3 (chi18-A647 = cimeric Tim3_0018 được đánh dấu bằng AlexaA647), a-TIM3 (chi28-A647 = cimeric Tim3_0028 được đánh dấu bằng AlexaA647), Bispec (0168-A647 =1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0018) được đánh dấu bằng AlexaA647) và Bispec (0389-A647= 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028) được đánh dấu bằng Alexa 647) và a-PD1 (0165-A488 = PD1-0103 dạng khảm được đánh dấu bằng Alexa488) được bổ sung trực tiếp vào môi trường sinh trưởng trong các khoảng thời gian khác nhau (15 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ). PBS lạnh (Lonza) được sử dụng để dừng phản ứng và để rửa sạch các kháng thể không gắn kết. Sau đó các tế bào được cố định (BD Cytofix) trong 20 phút và được rửa hai lần bằng chất đệm rửa (Chất đệm nhuộm BD). Sau khi chuyển lá kính đậy đến bề mặt khô, sau đó chúng được lắp trên rãnh trượt làm bằng thủy tinh với môi trường lắp ráp (Fluoromount G, eBioscience) và giữ trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C trước khi chụp ảnh. Cường độ của tín hiệu huỳnh quang từ ROI màng, của tế bào được hướng đích ở mức độ cao, được chia cho Cường độ của tín hiệu huỳnh quang từ ROI bào tương của cùng các tế bào đó, thu được tỷ lệ được thể hiện trong các biểu đồ hình hộp. Để so sánh các mẫu, phân tích ANOVA một chiều được sử dụng (* = $p<0,05$; **=$p<0,001$). Kính hiển vi đồng tiêu huỳnh quang được thực hiện với LSM 700 nghịch chuyển từ Zeiss với 60x thấu kính dầu. Các ảnh chụp được gom bằng cách sử dụng phần mềm Zen (Zeiss) kết hợp với kính hiển vi. Việc phân tích các

ảnh chụp được thực hiện bằng phần mềm Imaris (Bitplane; Oxford Instrument) và việc phân tích thống kê được thực hiện bằng GraphPad Prism (phần mềm Graphpad). Việc phân tích theo thời gian cho thấy sự khu trú màng ở mức độ cao hơn ở cả kháng thể đặc hiệu kép và kháng thể PD1 khi so sánh với tụ hợp nội bào của kháng thể TIM3 được thể hiện trên Fig.11A và 11B. Kháng PD1 và Bispec 0389 chỉ cho thấy sự tiếp nhận rất chậm, thậm chí sau là 3 giờ, trong khi đó sự tiếp nhận đối với Bispec 0168 còn lại là mạnh hơn. Sự tiếp nhận mạnh hơn được thể hiện bởi aTim3 Ab 0028, sự tiếp nhận mạnh nhất được thể hiện bởi aTim3-0018.

Ví dụ 16: Sự hoạt hóa tế bào T thông qua thử nghiệm phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR)

Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp (MLR) là thử nghiệm tế bào miễn dịch xác định sự hoạt hóa của các tế bào lympho từ một cá thể (đối tượng cho X) đối với tế bào lympho từ một cá thể khác (đối tượng cho Y). Phản ứng tế bào lympho hỗn hợp được sử dụng để làm rõ tác dụng phong bế con đường PD1 đến các tế bào tác động lympho. Các tế bào T trong thử nghiệm được thử nghiệm về sự hoạt hóa và sự tiết IFN-gama của chúng khi có hoặc không có các mAb kháng PD1/TIM3 đặc hiệu kép.

Để thực hiện MLR dị sinh, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ ít nhất bốn đối tượng cho khỏe mạnh có kiểu HLA chưa biết được phân lập bằng cách ly tâm có gradien mật độ bằng cách sử dụng Leukosep (Greiner Bio One, 227 288). Nói một cách ngắn gọn, các mẫu máu được heparin hóa được pha loãng với PBS có thể tích gấp ba lần và 25ml phần phân ước của máu đã pha loãng được xếp từng lớp trong ống Leukosep có dung tích 50ml. Sau khi ly tâm ở tốc độ 8000 $m/s^2$ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (không nghỉ) các phần chứa tế bào lympho được thu gom, được rửa trong PBS và được sử dụng trực tiếp trong thử nghiệm chức năng hoặc được tạo lại huyền phù trong môi trường đông lạnh (DMSO 10%, FCS 90%) ở 1,0E+07 tế bào/ml và được bảo quản trong nitơ lỏng. Các phản ứng MLR 2 đường riêng rẽ được thiết lập bằng cách trộn PBMC từ hai đối tượng cho khác nhau ở tỷ lệ tế bào chất kích thích/chất đáp ứng 1:1 và việc nuôi cấy đồng thời được thực hiện ít nhất hai lần trong đĩa đáy phẳng có 96 giếng trong 6 ngày ở nhiệt độ 37°C, 5% $CO_2$, khi có hoặc không có khoảng nồng độ khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép đã được tinh chế PD1-TIM3 hoặc kháng thể đặc hiệu đơn ban đầu của chúng (một mình hoặc trong tổ hợp). Không kháng thể hoặc kháng thể đối chứng isotyp nào được sử dụng làm đối chứng âm và rec hu IL-2 (20

EU/ml) được sử dụng làm đối chứng dương. Sau ngày 6 100µl môi trường được lấy từ mỗi môi trường nuôi cấy để đo xytokin. Nồng độ IFN-gama được đo bằng cách sử dụng bộ kit OptEIA ELISA (BD Biosciences).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 18A đến 18D (tiết/giải phóng IFN-γ). Kháng thể PD1TIM3 đặc hiệu kép thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết IFN-gama theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Các giá trị % tăng tiết IFNγ được tính trong mối liên hệ với sự sản sinh IFNγ của MLR mà không bổ sung mAb phong bế bất kỳ (kích thích dị sinh cơ bản cảm ứng giá trị IFNγ dưới dạng E-c) và MLR với việc bổ sung 20EU/ml rec hu IL-2 (đối chứng dương = 100% giá trị IFNγ dưới dạng E+c) và được tính theo công thức: kích thích tương đối [%] = ((Ví dụ - E-c)/(E+c - E-c)*100.

Bốn thử nghiệm riêng rẽ được thực hiện:

Trong Thử nghiệm 1, hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0018 (=AB 0168) so với PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và TIM3_0018 dạng khảm (=Tim3-chi18) và các hỗn hợp của chúng được đánh giá. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12A và Bảng 18A.

Bảng 18A

| Kháng thể | $EC_{50}$ [nM] D2 + D6 |
|---|---|
| aPD1-0165 (= PD1-0103 dạng khảm) | 7,7 |
| aTIM3-chi18 (= cimeric TIM3_0018) | >274 |
| Combo aPD1-0165 + aTIM3-chi18 | 1,7 |
| Bispec AB 0168 (= 1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0018) | 4,3 |

Trong Thử nghiệm 2, hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028 (=Bispec AB 0389) so với PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và TIM3_0028 dạng khảm (=TIM3-chi28) và các hỗn hợp của chúng được đánh giá. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12B và Bảng 18B.

Bảng 18B

| Kháng thể | $EC_{50}$ [nM] D2 + D6 |
|---|---|
| aPD1-0165 (=PD1-0103 dạng khảm) | 6,5 |
| aTIM3-chi28 (=cimeric TIM3_0028) | >274 |
| Combo aPD1-0165 + aTIM3-chi18 | 1,5 |
| Bispec AB 0389 (=1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028) | 2,8 |

Trong Thử nghiệm 3, hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1-0103 / Ky8213 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / và kháng TIM3 Ky8213 từ US 2012/0189617 (xem kháng thể 8213 ví dụ Ví dụ 33) được sản xuất theo cách tương tự như được mô tả trong Ví dụ 1 dưới dạng 1+1 CrossMab) so với PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165) và kháng TIM3-Ky8213 (từ US 2012/0189617 (xem kháng thể 8213) ví dụ Ví dụ 33) và các hỗn hợp của chúng được đánh giá. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12C và Bảng 18C.

Bảng 18C

| Kháng thể | $EC_{50}$ [nM] D2 + D6 |
|---|---|
| aPD1-0165 (=PD1-0103 dạng khảm) | 6,0 |
| aTIM3-Ky8213 | 111 |
| Combo aPD1-0165 + aTIM3-Ky8213 | 0,9 |
| Bispec AB 1+1 PD1-0103 / TIM3-Ky8213 | 4,6 |

Trong Thử nghiệm 4, hoạt lực của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028 (=Bispec AB 0389 (1+1))) so với kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 2+2 PD1TIM3_0358 dựa trên PD1-0103 dạng khảm / TIM3-0028 (= Bispec AB 0358 (2+2)), và PD1-0103 dạng khảm (=PD1-0165)

và TIM3_0028 dạng khảm (=TIM3-chi28) và các hỗn hợp của chúng được đánh giá. Các kết quả được thể hiện trên Fig.12D và Bảng 18D.

Bảng 18D:

| Kháng thể | $EC_{50}$ [nM] D2 + D4 | $EC_{50}$ [nM] D1+D3 |
|---|---|---|
| aPD1-0165 (=PD1-0103 dạng khảm) | 5,7 | 5,7 |
| aTIM3-chi28(= cimeric Tim3_0028) | >264 | >264 |
| Combo aPD1-0165 + aTim3-chi28 | 0,6 | 0,8 |
| Bispec AB 0389 (1+1) (= 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028) | 1,9 | 2,0 |
| Bispec AB 0358 (2+2) (=2+2 PD1TIM3_0358 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028) | 5,7 | 6,8 |

Bảng 19: Tóm tắt các tính chất/kết quả quan sát được:

| Thử nghiệm (- = không tác dụng, +/- = tác dụng rất yếu, + = tác dụng yếu, ++ = tác dụng trung bình, +++ = tác dụng mạnh, ++++ = tác dụng rất mạnh) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kháng thể | Gắn kết | | | | Tiếp nhận | MLR |
| | Bạch cầu đơn nhân | Tế bào NK | Tế bào T | Tế bào T CD4 | Tế bào T CD4 | IFN-γ ELISA |
| TIM3-0018 đặc hiệu đơn | ++ | +/- | - | ++ | ++ | +/- |
| 1+1 PD1TIM3_0168 đặc hiệu kép | ++ | + | +/- | +++ | - | +++ |
| 2+2 PD1TIM3_0359 đặc hiệu kép | ++++ | +/- | -/+ | +++ | - | |
| | | | | | | |
| TIM3-0038 đặc hiệu đơn | ++ | +/- | -/+ | ++ | + | + |
| 1+1 PD1TIM3_0166 đặc hiệu kép | + | +/- | +/- | ++ | - | ++ |
| 2+2 PD1TIM3_0321 đặc hiệu kép | +++ | +/- | -/+ | +++ | ++ | +++ |
| | | | | | | |
| TIM3-0028 đặc hiệu đơn | + | +/- | -/+ | + | ++ | +/- |
| 1+1 PD1TIM3_0389 đặc hiệu kép | - | - | +/- | +++ | - | +++ |
| 2+2 PD1TIM3_0358 đặc hiệu kép | | | | | | ++ |

Ví dụ 17: Môi trường nuôi cấy đồng thời tế bào T CD4 đặc hiệu kháng nguyên với dòng tế bào nguyên bào lympho-tế bào B ARH77

Để nghiên cứu tác dụng của việc phong bế kháng PD-1 đến tế bào T CD4 trong sự có mặt của dòng tế bào khối u biểu hiện MHCII, các tác giả sáng chế phát triển một thử nghiệm trong đó các tế bào T CD4 mới được tinh chế được nuôi cấy đồng thời trong 5 ngày trong sự có mặt của dòng tế bào nguyên bào lympho tế bào B được bất tử bằng EBV(ARH77). Vào ngày phản ứng tế bào lympho hỗn hợp tối thiểu (mMLR), các tế bào T CD4 được làm giàu thông qua bộ kit vi hạt (Miltenyi Biotec) từ $10^8$ PBMC thu được từ đối tượng cho khỏe mạnh. Trước khi nuôi cấy, các tế bào T CD4 được đánh dấu bằng 5mM carboxy-fluorescein-sucxinimidyl este (CFSE). $10^5$ tế bào T CD4 sau đó được dàn trên đĩa trong đĩa 96 giếng cùng với dòng tế bào B (5:1) khi có hoặc không có kháng thể kháng PD1 phong bế (PD-1 0376 được nhân hóa, nivolumab hoặc pembrolizumab), kháng thể kháng TIM3 (kháng TIM3 0438 được nhân hóa hoặc Kyowa-8213) hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng PD-1/TIM3 (0476 được nhân hóa) ở nồng độ bằng 10µg/ml. Năm ngày sau đó các tác giả sáng chế gom các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được sử dụng để đo nồng độ IFN-γ bằng ELISA (R&D systems).

Như được thể hiện trên Fig.13, các tác giả sáng chế quan sát được một cách thú vị rằng việc điều trị kháng PD-1 làm tăng đáng kể khả năng của tế bào T CD4 trong việc sản sinh ra IFN-γ khi so với tế bào T CD4 không được điều trị (đường gạch ngang). Trong thử nghiệm này kháng thể kháng PD-1 0376 đều có thể làm kháng thể so sánh chuẩn trong việc cảm ứng sự tiết IFN-γ bởi tế bào T CD4, trong khi một mình kháng thể kháng TIM3 0438 chỉ có tác dụng ngoài lề ngay cả khi mạnh hơn so với kháng thể so sánh chuẩn Kyowa-8213.

Ngạc nhiên là, kháng thể đặc hiệu kép 0476 tốt hơn so với hỗn hợp của các kháng thể ban đầu, một mình kháng thể kháng PD1 0376 và các kháng thể so sánh chuẩn trong việc kiểm soát sự tiết IFN-γ bởi tế bào T CD4 ($P < 0,01$, ANOVA một chiều).

Ví dụ 18: Độ hiệu nghiệm tăng cường của kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 *in vivo*

Chuột nhắt cái đã được ức chế miễn dịch (NOG), 6-8 tuần tuổi khi bắt đầu thử nghiệm, được thách thức dưới da bằng $10^6$ tế bào MKN45 (dòng tế bào caxinom dạ dày người, biểu hiện CEA ở mức độ cao) vào ngày 0 trong sự có mặt của matrigel ở tỷ lệ

1:1. Vào ngày 7, PBMC từ người cho khỏe mạnh được phân lập : máu người được heparin hóa được pha loãng theo tỷ lệ ~ 2:1 trong nước muối đệm phosphat (PBS) (Gibco) và được chuyển vào các ống Leucosep dung tích 50ml đã được chuẩn bị, mỗi ống chứa 15ml Histopaque-1077 (Sigma Aldrich). Sau khi ly tâm (30 phút, tốc độ 4500 $m/s^2$, nhiệt độ trong phòng, không nghỉ), các vạch PBMC được gom bằng ống pipet dung tích 5ml. Các tế bào được chuyển vào ống dung tích 50ml và được rửa bằng PBS (ly tâm ở tốc độ 3500 $m/s^2$, 10 phút). Bước rửa được lặp lại (ly tâm ở tốc độ 3000 $m/s^2$, 10 phút). Sau khi ly tâm (10 phút, tốc độ 3500 $m/s^2$), các tế bào được tạo lại huyền phù trong môi trường RPMI. $10^7$ PBMC được tiêm trong tĩnh mạch trong chuột nhắt NOG tạo ra mô hình khảm chuột nhắt-người. Vào ngày 10, liệu pháp chế độ hằng tuần (chất dẫn thuốc hoặc điều trị bằng hợp chất được chọn từ kháng PD1 (0376), Nivolumab, kháng TIM3 (0438) hoặc kháng PD1-TIM3 (0476)) được bắt đầu và được đưa vào bằng cách tiêm ngoài màng bụng. Việc điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 (3 hoặc 10mg/kg; tam giác rỗng) được so sánh với nồng độ đẳng mol (1,5 hoặc 5mg/Kg) của kháng thể PD1 chất đơn (0376), của Nivolumab và kháng thể Tim3 (0438). Kích thước khối u được đo bằng thước tính theo mm trong giai đoạn 30 ngày mỗi 2 đến 3 ngày. Trên Fig.14A và 14B, các số đo thể tích khối u được thể hiện dưới dạng giá trị thể tích trung bình trong nhóm chuột nhắt.

Tất cả các lần điều trị cho thấy có khả năng trong việc kiểm soát sự phát triển khối u khi so sánh với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Việc chỉ ức chế PD1 (bằng kháng thể PD1 (0376) hoặc Nivolumab so sánh chuẩn) và chỉ ức chế kháng thể TIM3 (0438), thu được độ hiệu nghiệm tương tự trong việc kiểm soát sự phát triển khối u. Điều này cho thấy rằng, bằng cách phong bế PD1 hoặc TIM3, có thể tăng cường đáp ứng kháng khối u. Tuy nhiên, có thể thấy được mức ức chế sự phát triển khối u tăng lên khi cả PD1 và TIM3 được gắn kết bằng kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3. Trong khi đó ở nồng độ thấp, không thể quan sát thấy sự khác nhau giữa sự phát triển khối u giữa kháng thể đặc hiệu kép và việc điều trị khác, ở các liều lượng cao hơn, việc ức chế của cả PD1 và TIM3 bằng cách điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép PD1-TIM3 dẫn đến việc ức chế sự phát triển khối u mạnh hơn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm:

miền VH bao gồm:

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40;

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42; và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm

(a) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:1,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:12,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6; hoặc

(b) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:19; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:20,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:21, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22; hoặc

(c) miền VH bao gồm

(i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29,

(ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30, và

(iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:31; và

miền VL bao gồm

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32,

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33, và

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34.

2. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép gắn kết với TIM3 với ái lực gắn kết thấp hơn 50 lần khi so với liên kết với PD1.

3. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó:

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm:

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm:

(a) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8, hoặc

(b) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, hoặc

(c) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, hoặc

(d) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, hoặc

(e) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24, hoặc

(f) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, hoặc

(g) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, hoặc

(h) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36.

4. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó:

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,

và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 hoặc miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

5. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó:

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất nêu trên gắn kết đặc hiệu với PD1 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, và

vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai nêu trên gắn kết đặc hiệu với TIM3 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26.

6. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể được người hóa hoặc kháng thể khảm.

7. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền Fc bao gồm cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất và thứ hai, mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 và mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3.

8. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó miền Fc là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4.

9. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là đối với thụ thể Fcγ.

10. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó miền Fc thuộc phân nhóm IgG1 của người có đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

11. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

12. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm các phần phình và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm phần lõm theo phương pháp phần phình vào phần lõm.

13. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó cấu trúc tiểu đơn vị thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin S354C và T366W (đánh số theo EU) và cấu trúc tiểu đơn vị thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin Y349C, T366S và Y407V (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

14. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó trong một trong các mảnh Fab miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau sao cho miền VH là một phần của chuỗi nhẹ và miền VL là một phần của chuỗi nặng.

15. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 14, trong đó trong mảnh Fab thứ nhất bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với PD1 miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau.

16. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 7, trong đó trong một trong các mảnh Fab trong miền hằng định CL axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1 các axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

17. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 16, trong đó trong mảnh Fab thứ hai bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với TIM3 miền hằng định CL axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo chỉ số Kabat EU), và trong miền hằng định CH1 các axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

18. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, bao gồm:

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự của SEQ ID NO:69.

19. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, bao gồm:

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, hoặc

(b) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:57, hoặc

(c) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:61, hoặc

(d) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65, hoặc

(e) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:69.

20. Dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1 và ít nhất một tá dược dược dụng.

21. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết đặc hiệu với PD1 và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết đặc hiệu với TIM3, trong đó kháng thể đặc hiệu kép nêu trên bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64; và

(b) chuỗi nặng thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65.

Fig. 1

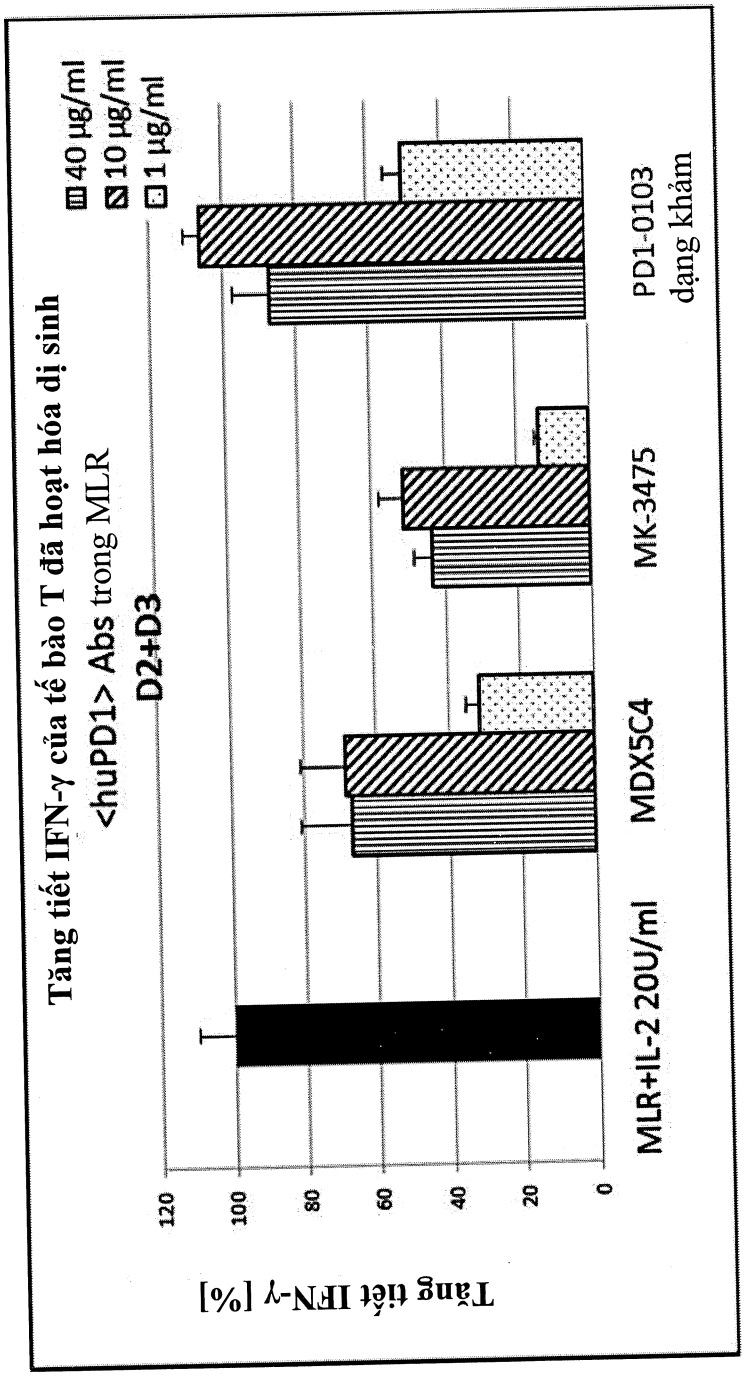

Tăng tiết IFN-γ của tế bào T đã hoạt hóa dị sinh
<huPD1> Abs trong MLR
D2+D3
40 µg/ml
10 µg/ml
1 µg/ml
Tăng tiết IFN-γ [%]
120
100
80
60
40
20
0
MLR+IL-2 20U/ml
MDX5C4
MK-3475
PD1-0103
dạng khảm

Fig. 2

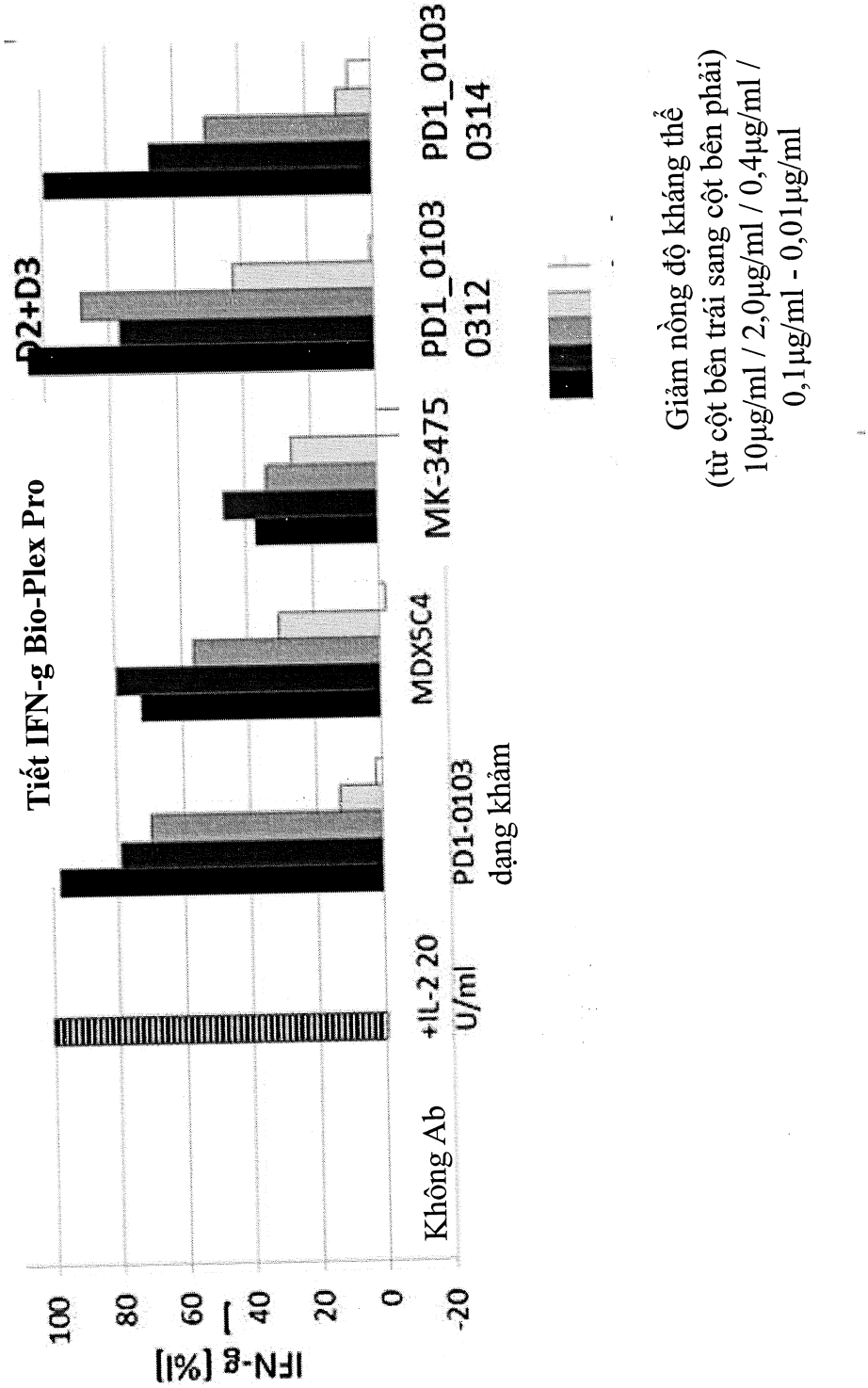

Tiết IFN-g Bio-Plex Pro
IFN-g [%]
100
80
60
40
20
0
-20
Không Ab
+IL-2 20 U/ml
PD1-0103 dạng khảm
MDX5C4
MK-3475
PD1_0103 0312
PD1_0103 0314
D2+D3
Giảm nồng độ kháng thể
(từ cột bên trái sang cột bên phải)
10µg/ml / 2,0µg/ml / 0,4µg/ml /
0,1µg/ml - 0,01µg/ml

Fig. 3

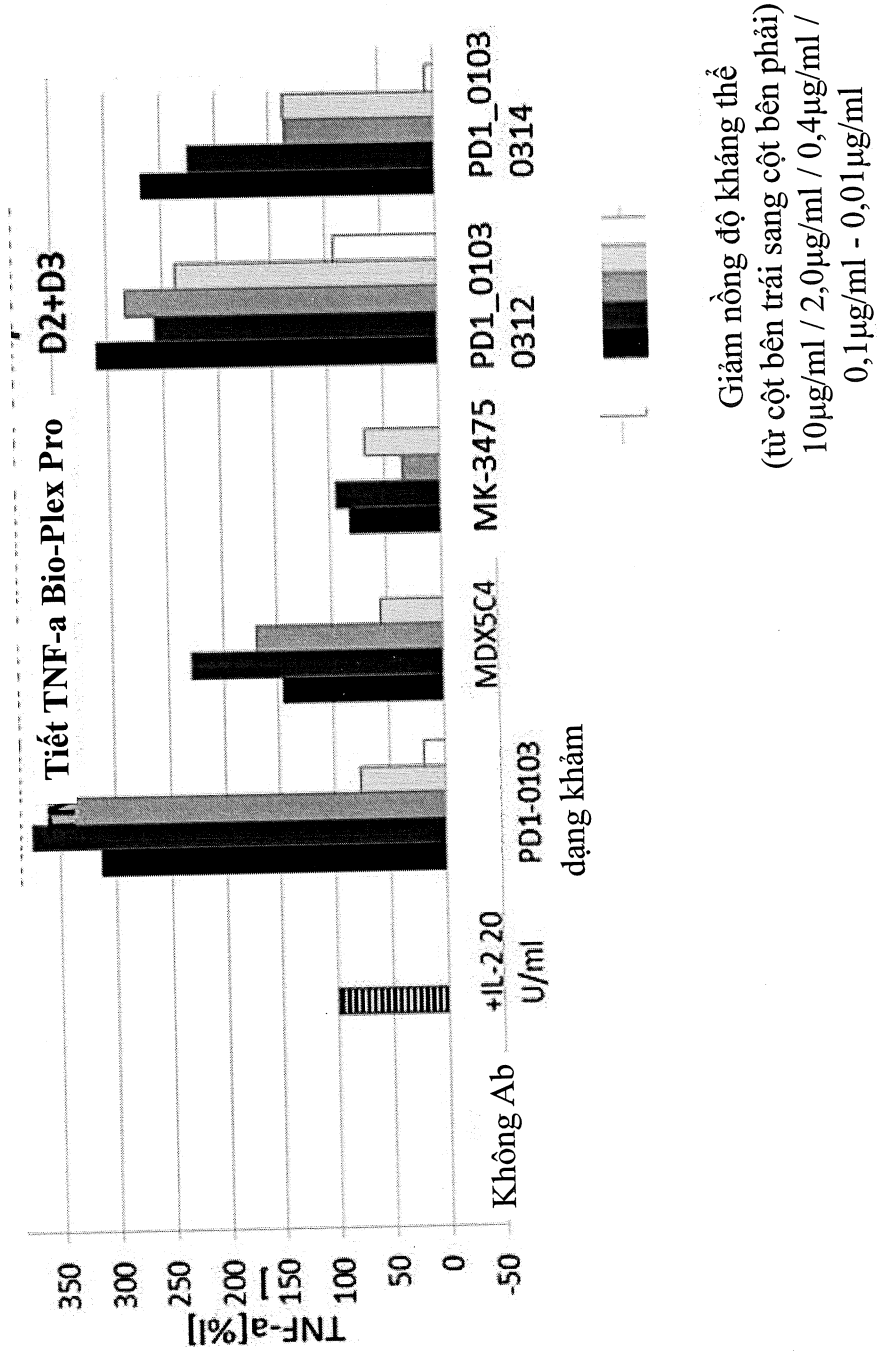
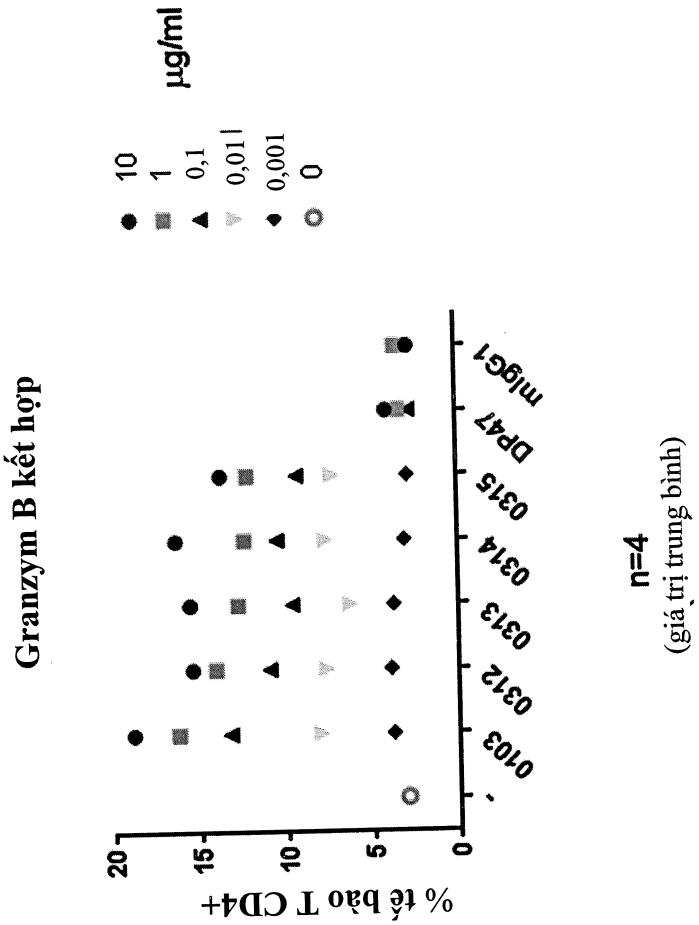

Tiết TNF-a Bio-Plex Pro
D2+D3
TNF-a[%I]
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
Không Ab
+IL-2 20 U/ml
PD1-0103 dạng khảm
MDX5C4
MK-3475
PD1_0103 0312
PD1_0103 0314
Giảm nồng độ kháng thể
(từ cột bên trái sang cột bên phải)
10µg/ml / 2,0µg/ml / 0,4µg/ml /
0,1µg/ml - 0,01µg/ml

Fig. 4A


Granzym B kết hợp
µg/ml
10
1
0,1
0,01
0,001
0
% tế bào T CD4+
20
15
10
5
0
-
0103
0312
0313
0314
0315
DP47
mIgG1
n=4
(giá trị trung bình)

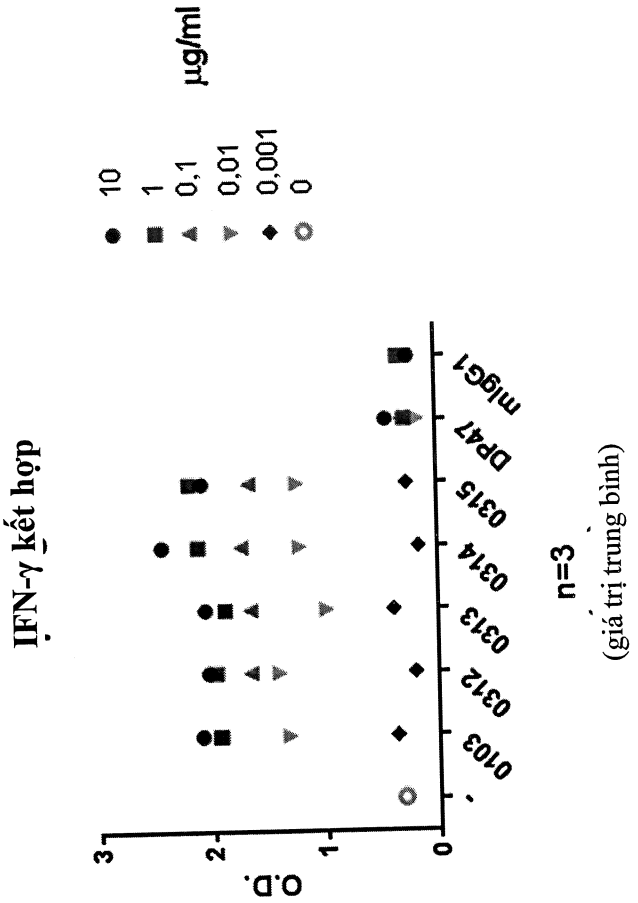

µg/ml
10
1
0,1
0,01
0,001
0
IFN-γ kết hợp
O.D.
0
1
2
3
0103
0312
0313
0314
0315
DP47
mIgG1
n=3
(giá trị trung bình)

Fig. 4B

Fig. 5

Fig. 5A

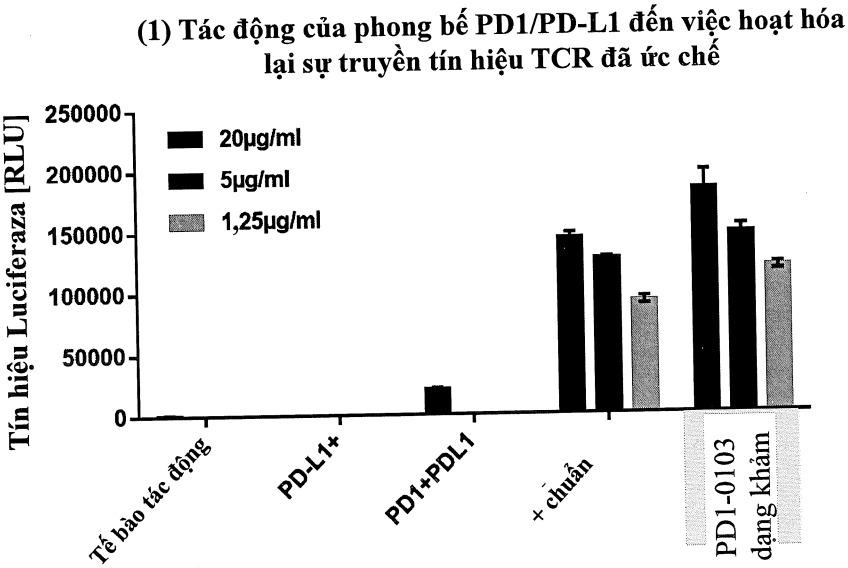
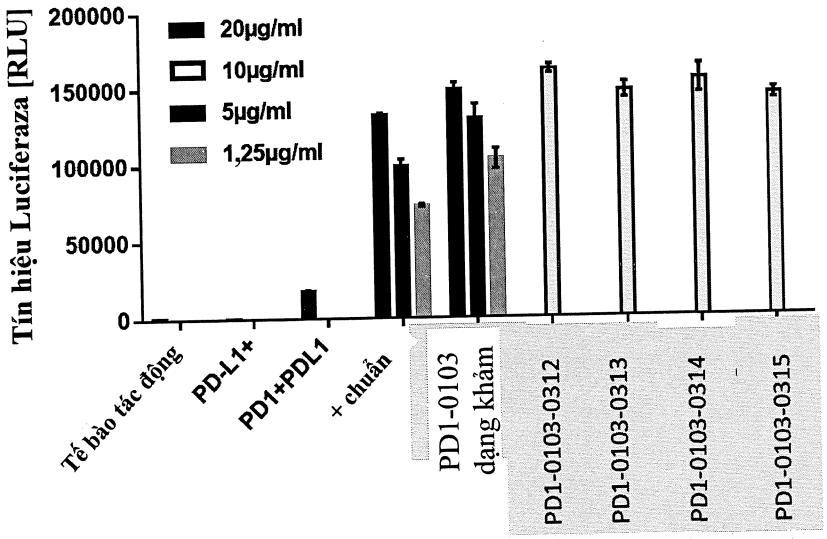



Fig. 5B



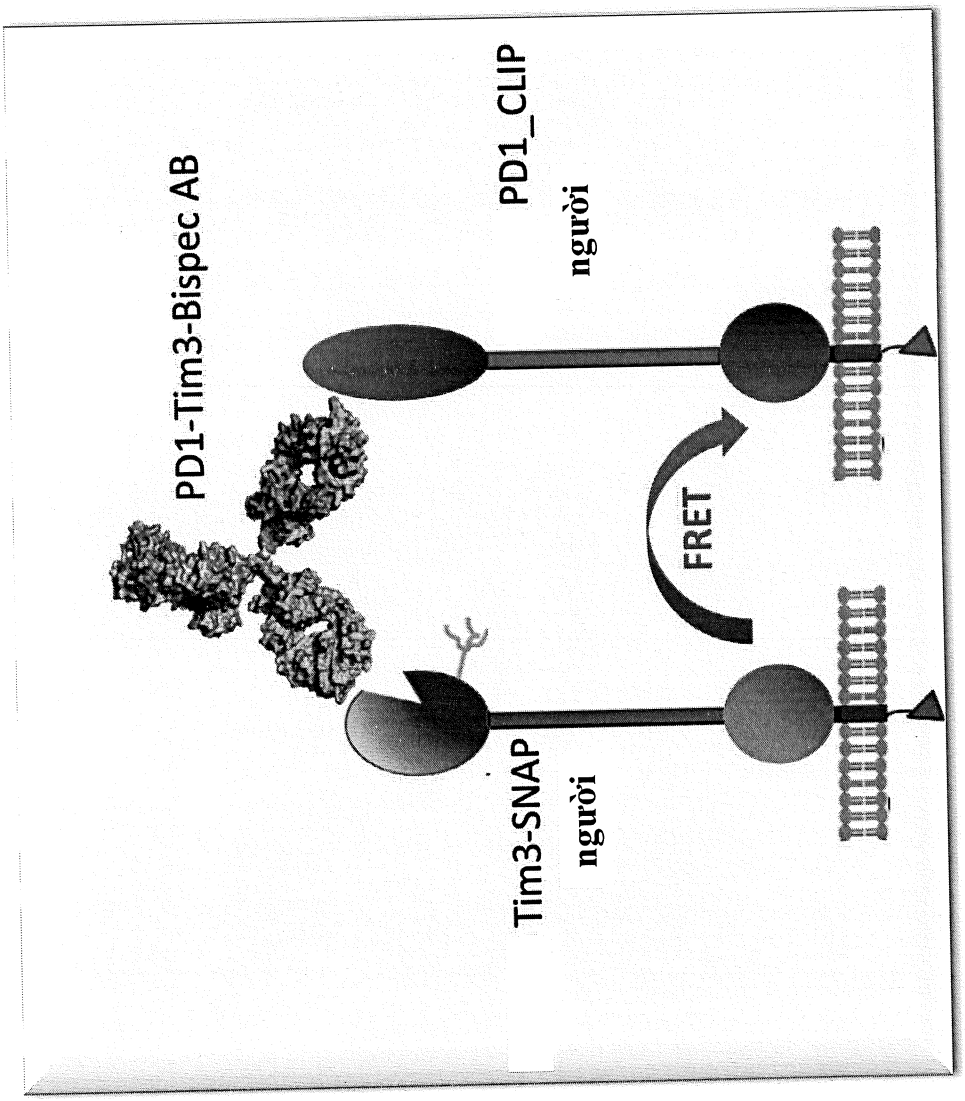



Fig. 6

Fig. 7A

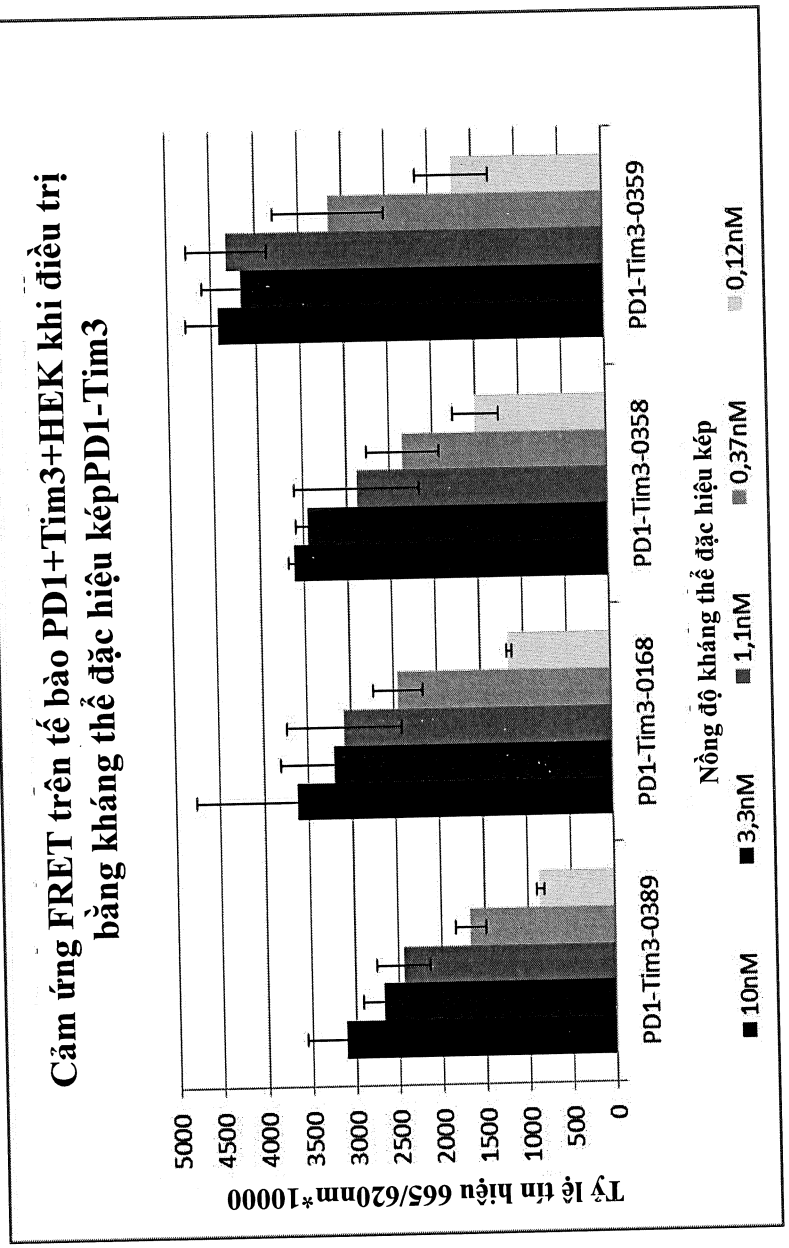

Cảm ứng FRET trên tế bào PD1+Tim3+HEK khi điều trị bằng kháng thể đặc hiệu képPD1-Tim3
Tỷ lệ tín hiệu 665/620nm*10000
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
PD1-Tim3-0389
PD1-Tim3-0168
PD1-Tim3-0358
PD1-Tim3-0359
Nồng độ kháng thể đặc hiệu kép
10nM
3,3nM
1,1nM
0,37nM
0,12nM

Fig. 7B

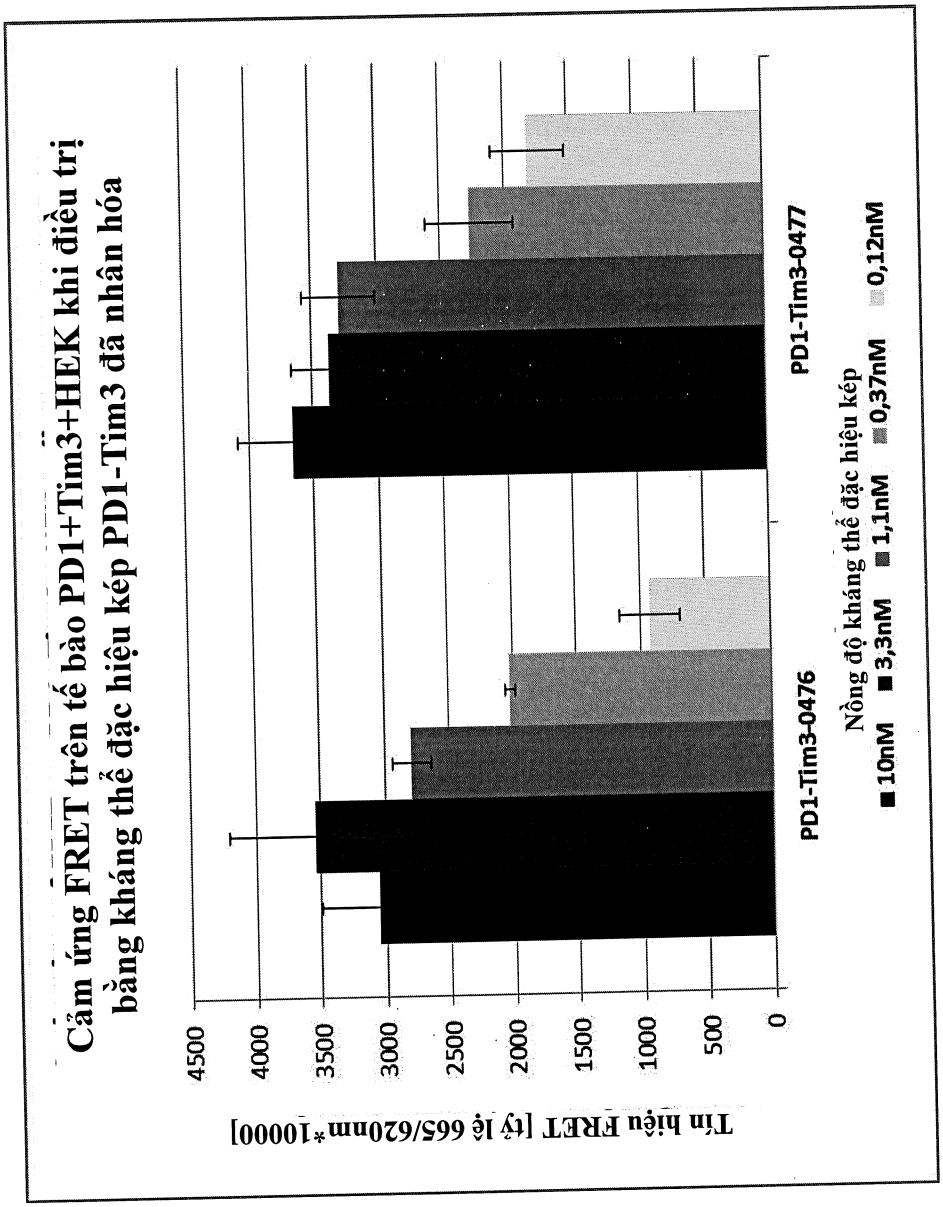

Cảm ứng FRET trên tế bào PD1+Tim3+HEK khi điều trị bằng kháng thể đặc hiệu kép PD1-Tim3 đã nhân hóa
Tín hiệu FRET [tỷ lệ 665/620nm*10000]
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
PD1-Tim3-0476
PD1-Tim3-0477
Nồng độ kháng thể đặc hiệu kép
10nM
3,3nM
1,1nM
0,37nM
0,12nM

Fig. 8A

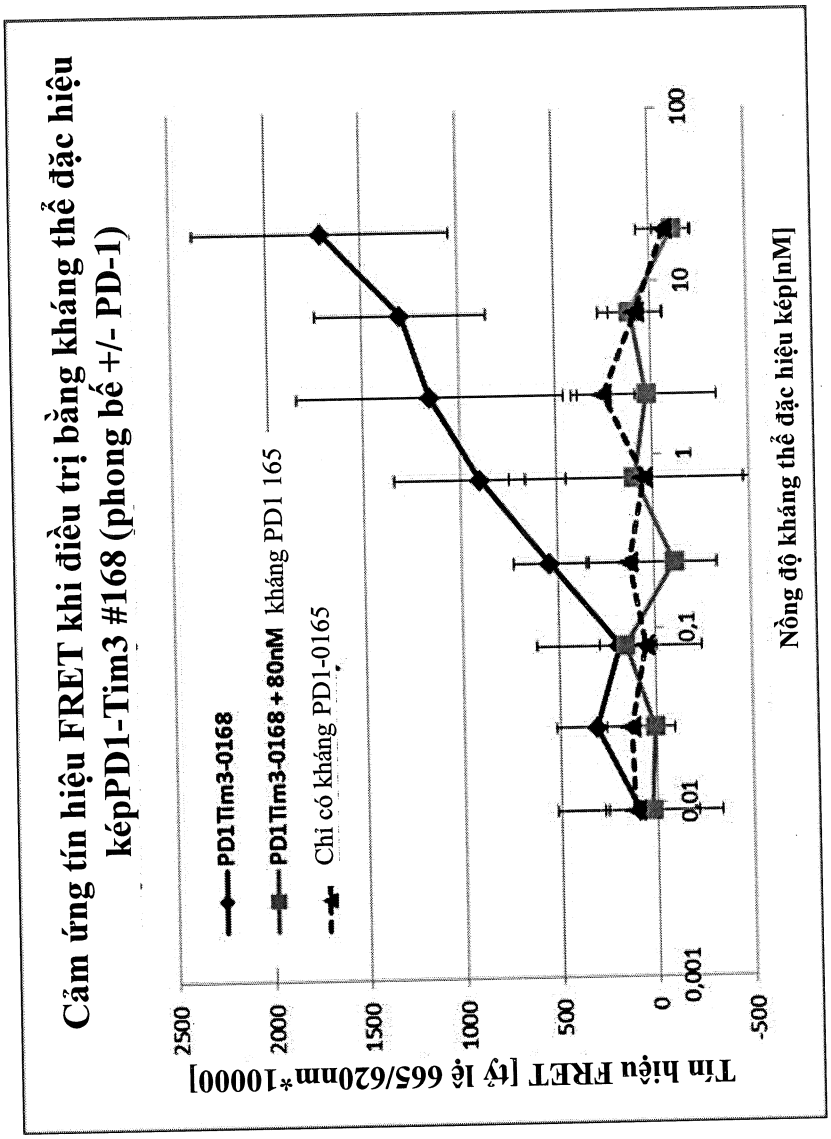

Cảm ứng tín hiệu FRET khi điều trị bằng kháng thể đặc hiệu képPD1-Tim3 #168 (phong bế +/- PD-1)
PD1Tim3-0168
PD1Tim3-0168 + 80nM kháng PD1 165
Chỉ có kháng PD1-0165
Tín hiệu FRET [tỷ lệ 665/620nm*10000]
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể đặc hiệu kép[nM]

Fig. 8B

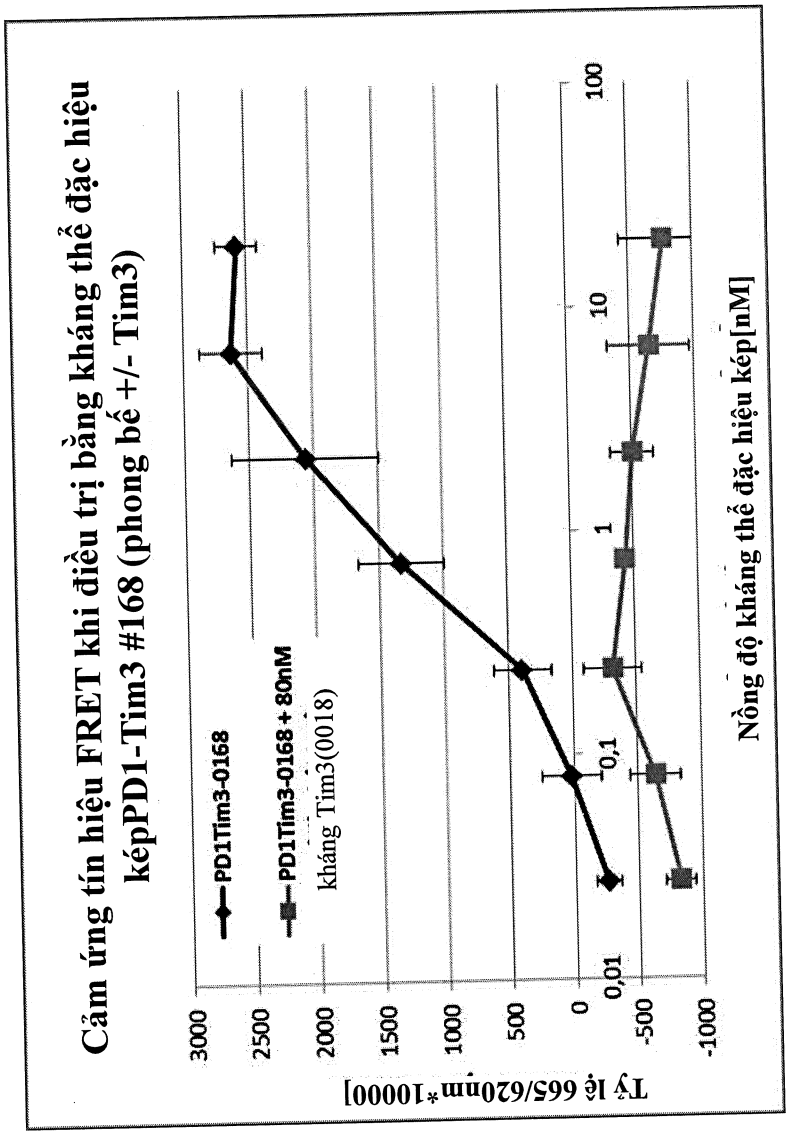

Cảm ứng tín hiệu FRET khi điều trị bằng kháng thể đặc hiệu képPD1-Tim3 #168 (phong bế +/- Tim3)
PD1Tim3-0168
PD1Tim3-0168 + 80nM kháng Tim3(0018)
Tỷ lệ 665/620nm*10000]
Nồng độ kháng thể đặc hiệu kép[nM]
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
-1000
0,01
0,1
1
10
100

Fig. 9

Fig. 9A

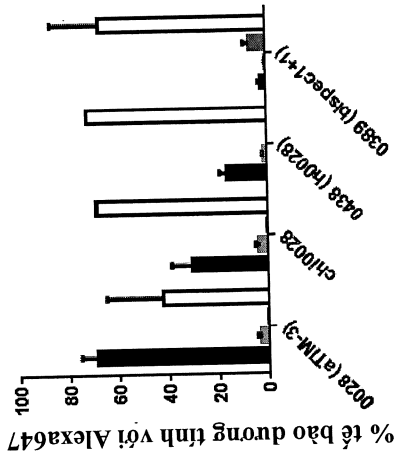



Fig. 9B

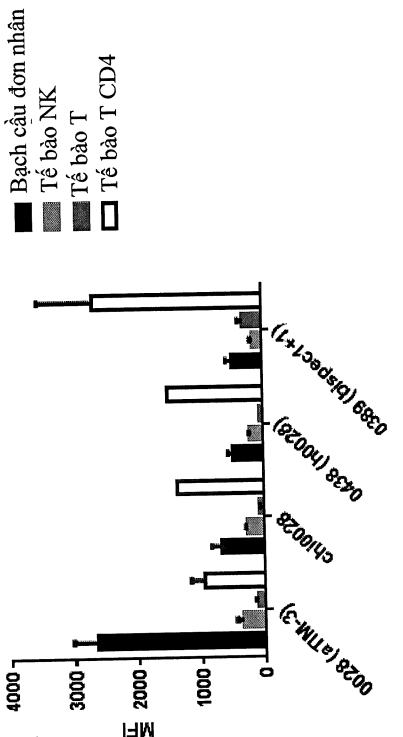



Fig. 9C

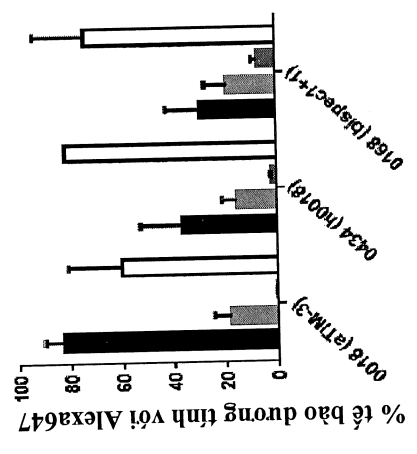



Fig. 9D

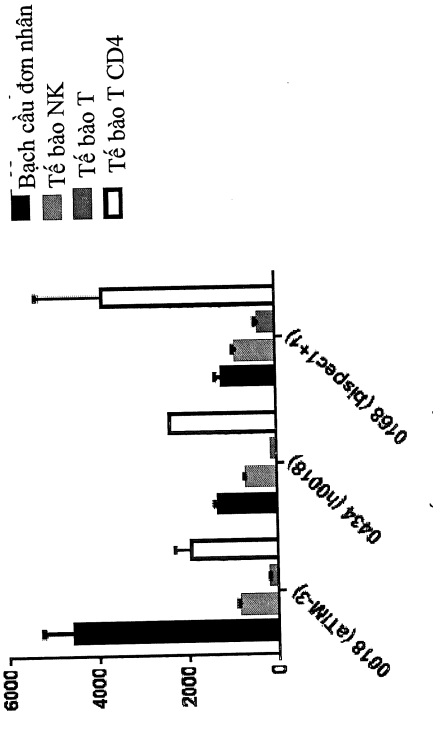


Fig. 9

Fig. 9E

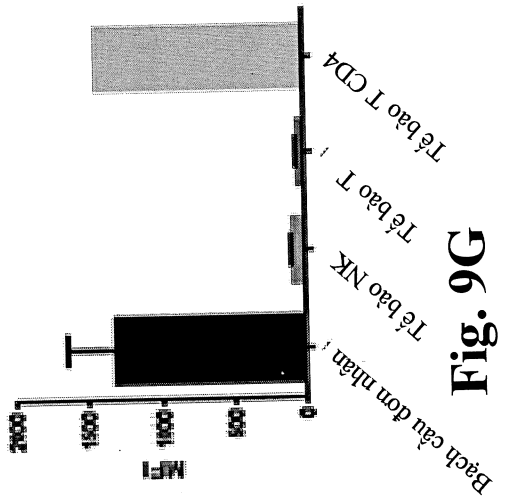



Fig. 9G

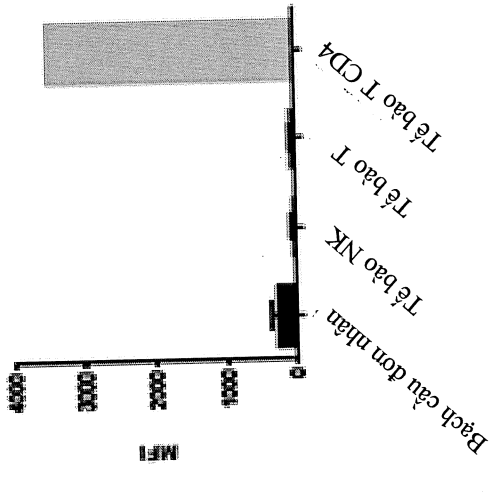



Fig. 9F

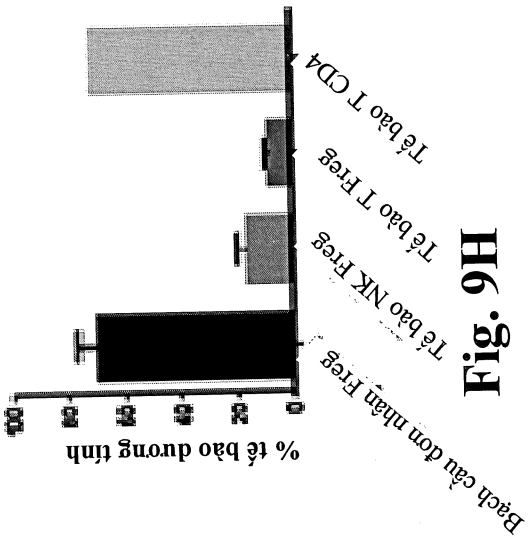



Fig. 9H

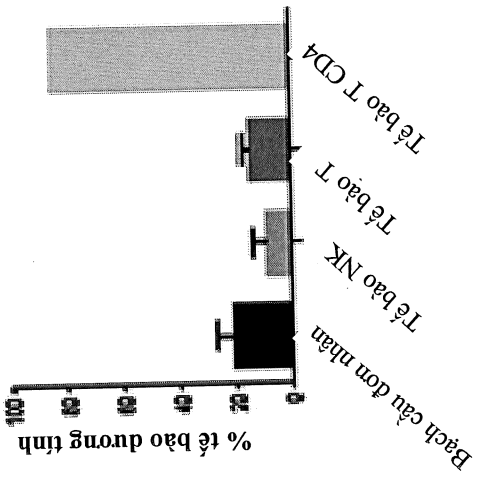


Fig. 10

Fig. 10A

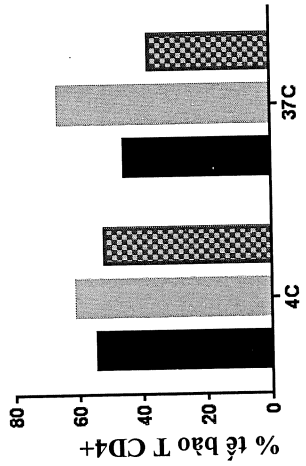



Fig. 10B

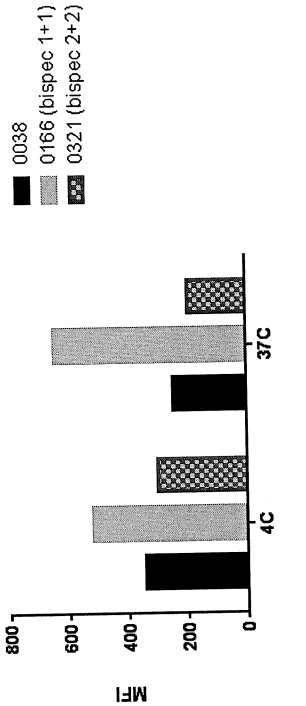



Fig. 10C

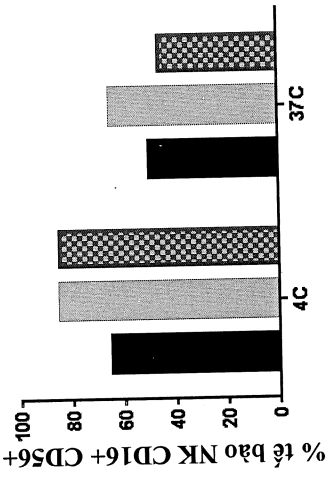



Fig. 10D

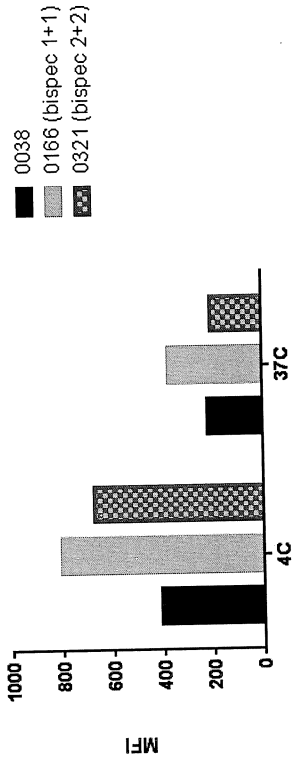


Fig. 11A

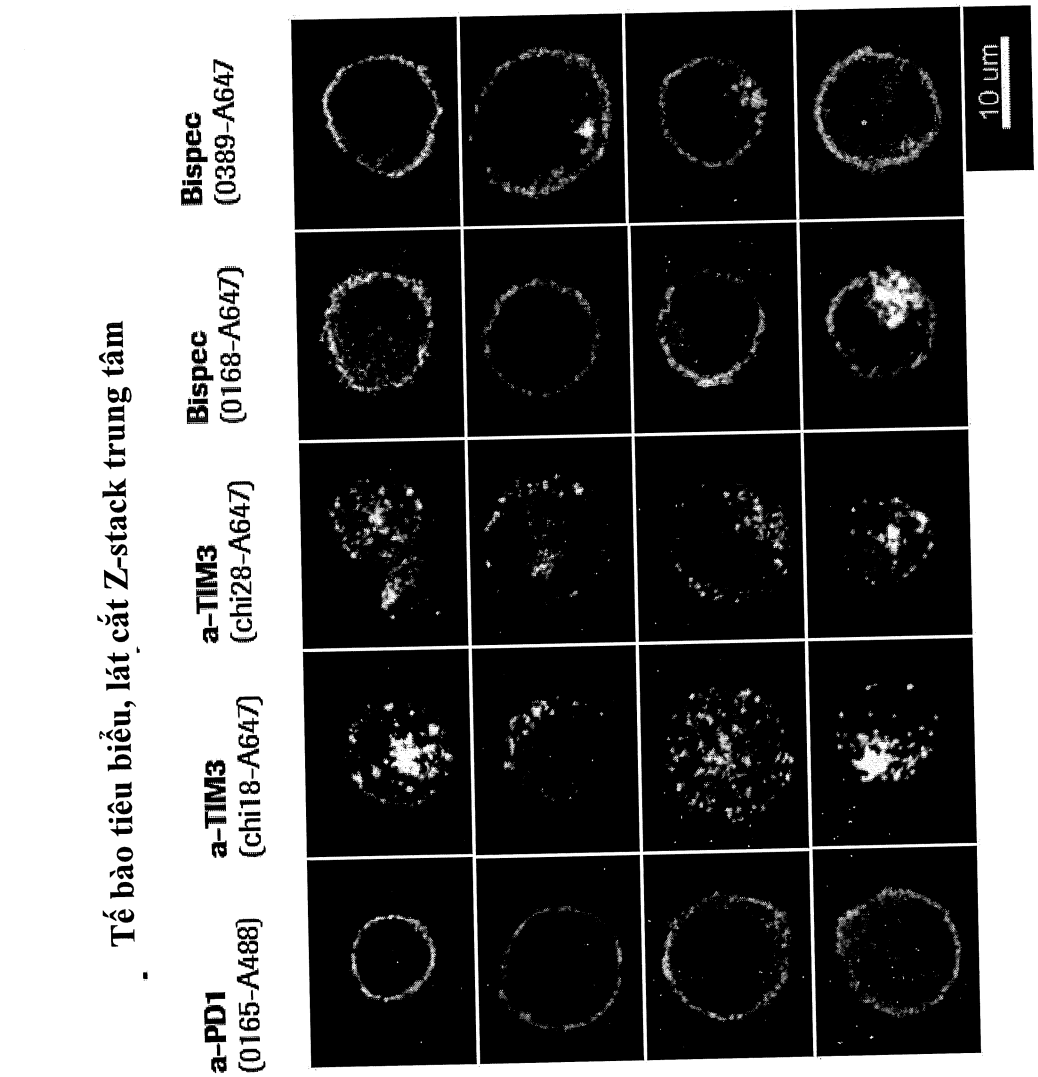

Tế bào tiêu biểu, lát cắt Z-stack trung tâm
a-PD1 (0165-A488)
a-TIM3 (chi18-A647)
a-TIM3 (chi28-A647)
Bispec (0168-A647)
Bispec (0389-A647)
15 phút
1 giờ
2 giờ
3 giờ
10 um
A488 = ALEXA-488, A647 = ALEXA-647

Fig. 11B

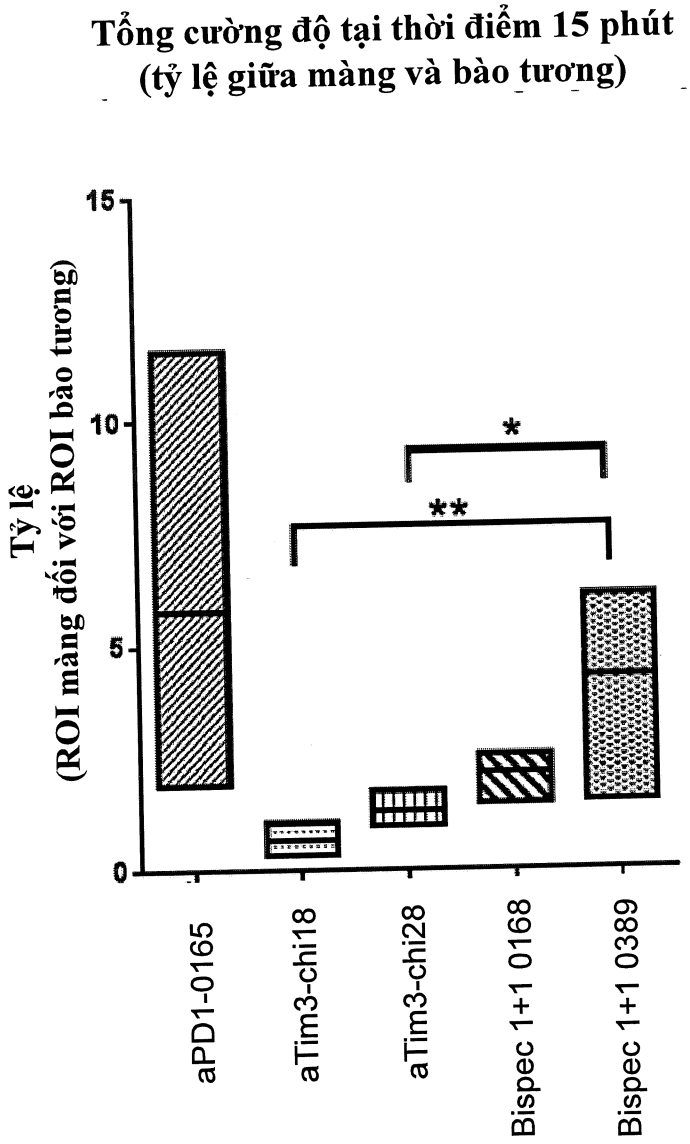

Tổng cường độ tại thời điểm 15 phút
(tỷ lệ giữa màng và bào tương)
Tỷ lệ
(ROI màng đối với ROI bào tương)
15
10
5
0
*
**
aPD1-0165
aTim3-chi18
aTim3-chi28
Bispec 1+1 0168
Bispec 1+1 0389

Fig. 12A

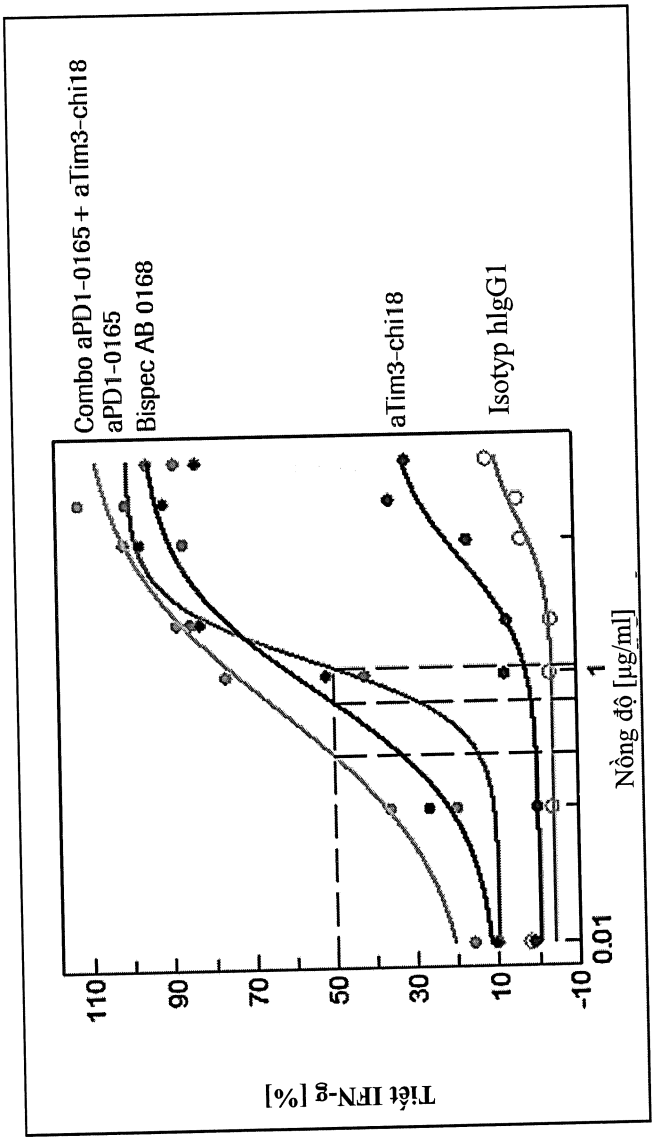

Combo aPD1-0165 + aTim3-chi18
aPD1-0165
Bispec AB 0168
aTim3-chi18
Isotyp hIgG1
Tiết IFN-g [%]
110
90
70
50
30
10
-10
0.01
1
Nồng độ [µg/ml]

Fig. 12B

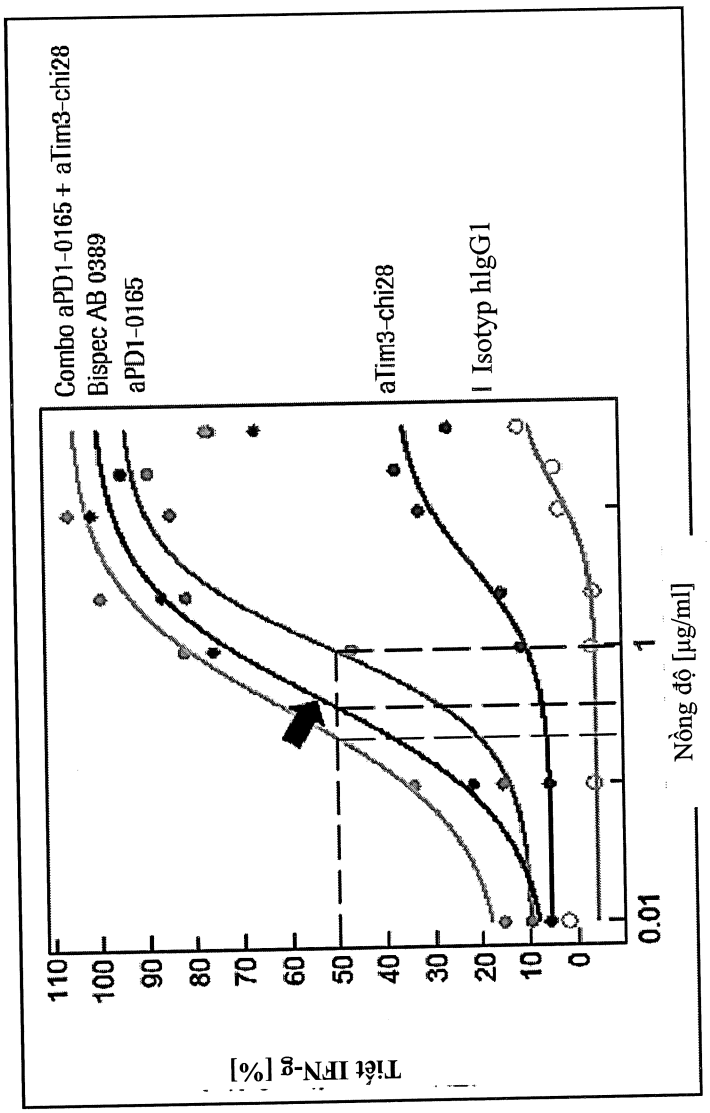

Combo aPD1-0165 + aTim3-chi28
Bispec AB 0389
aPD1-0165
aTim3-chi28
l Isotyp hIgG1
Tiết IFN-g [%]
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.01
1
Nồng độ [µg/ml]

Fig. 12C

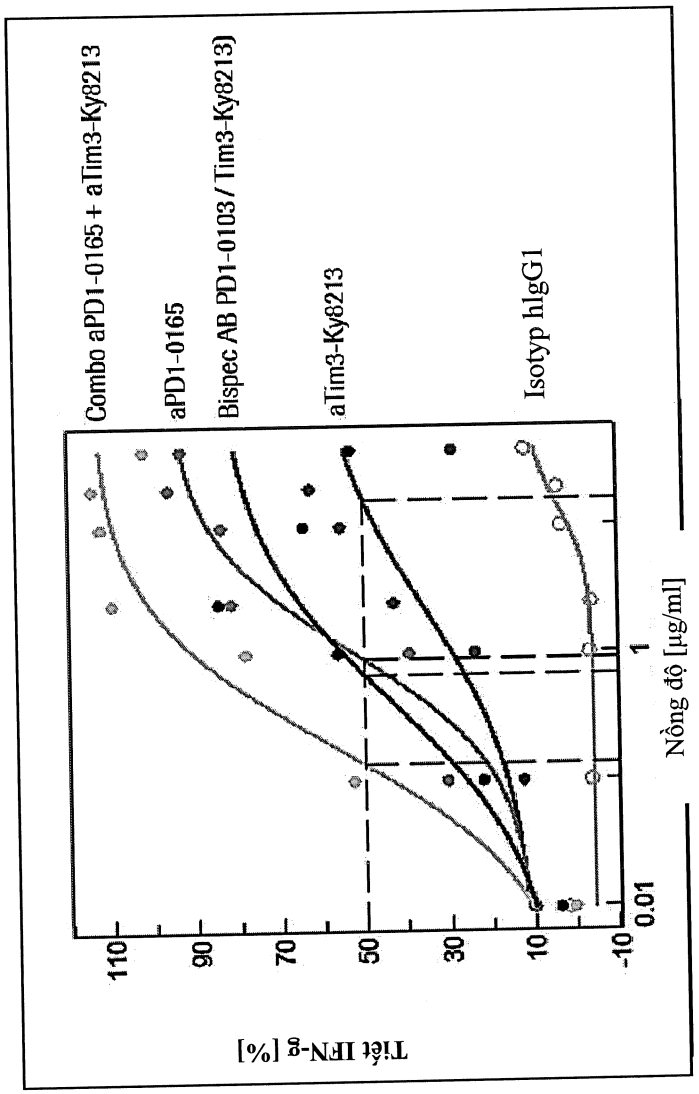

Combo aPD1-0165 + aTim3-Ky8213
aPD1-0165
Bispec AB PD1-0103 / Tim3-Ky8213)
aTim3-Ky8213
Isotyp hIgG1
Tiết IFN-g [%]
110
90
70
50
30
10
-10
0.01
1
Nồng độ [µg/ml]

Fig. 12D

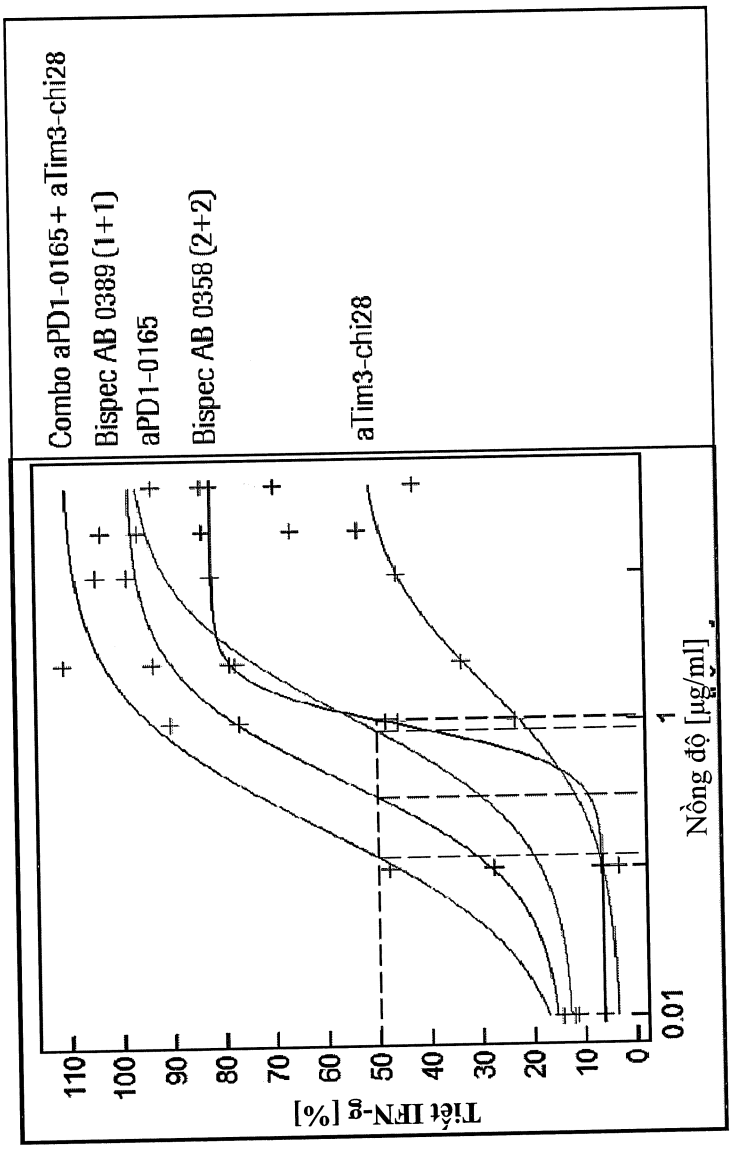
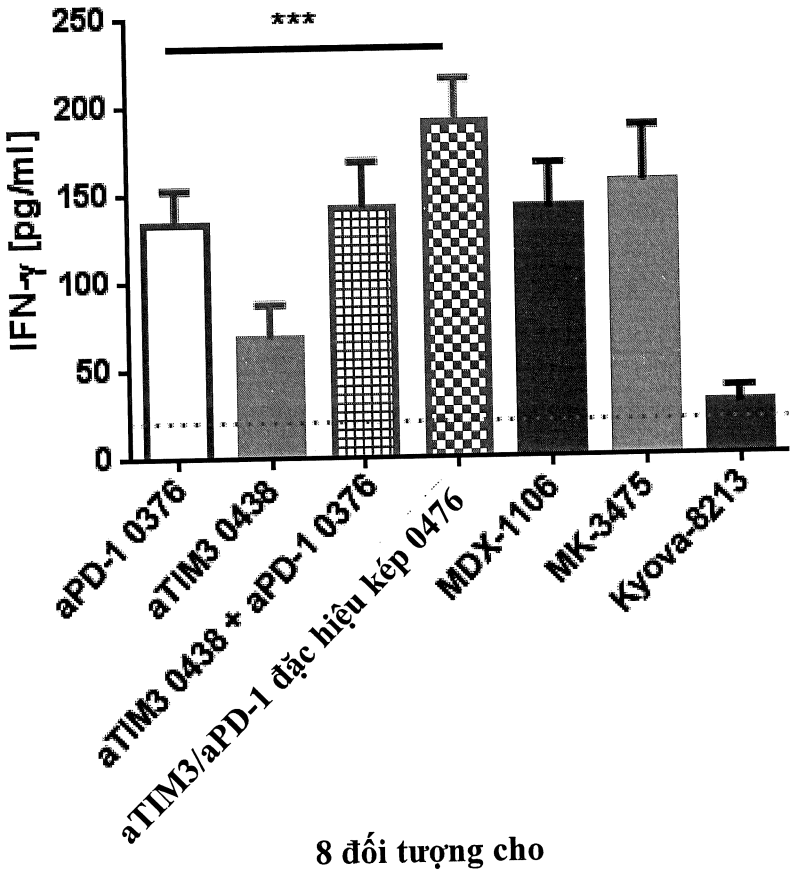

Combo aPD1-0165 + aTim3-chi28
Bispec AB 0389 (1+1)
aPD1-0165
Bispec AB 0358 (2+2)
aTim3-chi28
Tiết IFN-g [%]
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.01
1
Nồng độ [µg/ml]

Fig. 13




**8 đối tượng cho**
**(giá trị trung bình, SEM)**

| | |
|---|---|
| **Giá trị P** | **0,0003** |

Fig. 14

Fig. 14A

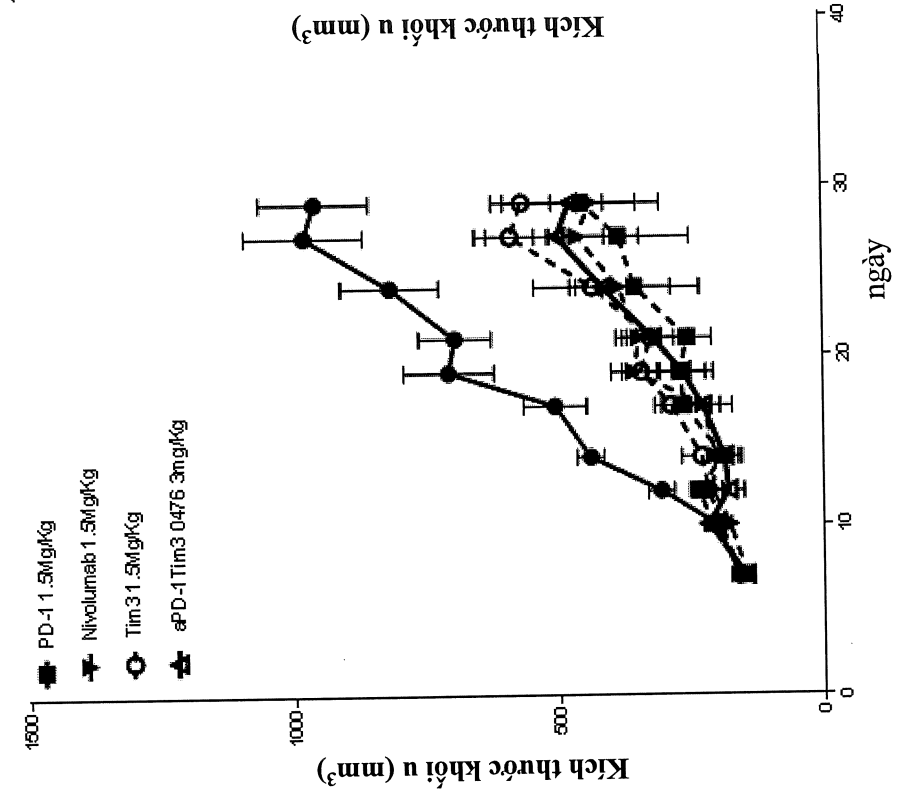
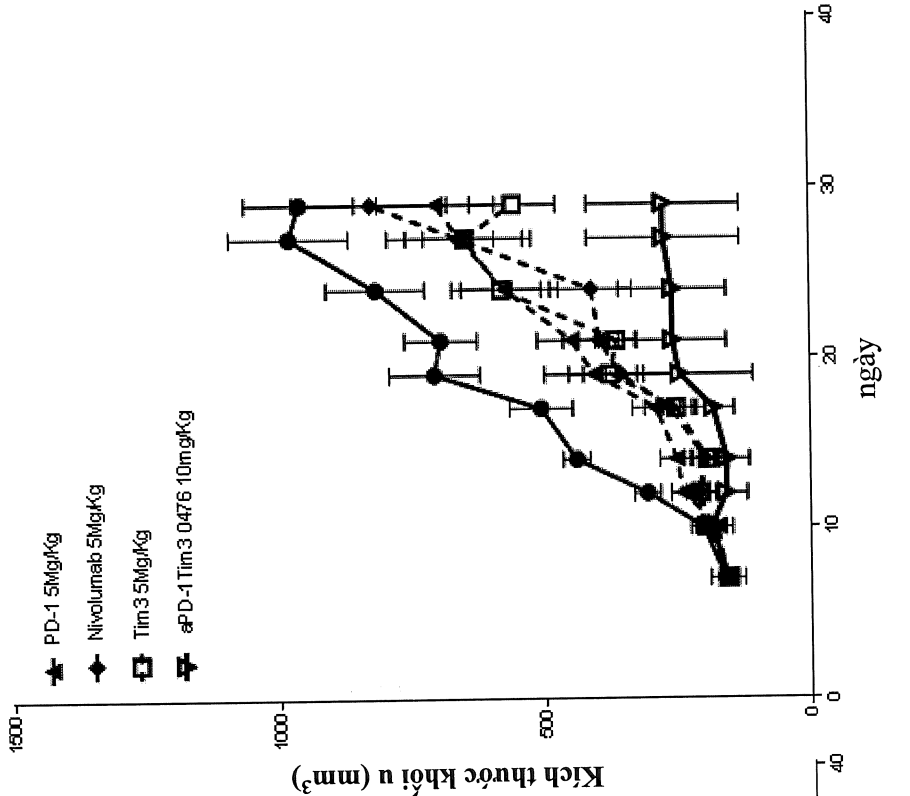



Fig. 14B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PD1 VÀ TIM3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P33115-WO

<150> EP15188036.6
<151> 2015-10-02

<160> 94

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met
1 5

<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Leu Asn Asp
1

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Asn Gly Tyr Leu Tyr Ala Leu Asp
1 5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Ser Ser Val Asn Tyr
1 5

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Ala Phe
1

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

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

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
20 25 30

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

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

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
20 25 30

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

Ser Ser Ser Val Gln Tyr
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

Ser Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VH của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)

<400> 13

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 106
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VL của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0433)

<400> 14

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

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

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VH của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)

<400> 15

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VL của biến thể Tim3_0016 (0018) (= Tim3-0434)

<400> 16

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

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

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

Gly Phe Asn Ile Lys Thr Thr
1 5

<210> 18
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

Ala Asp Asp
1

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Phe Gly Tyr Val Ala Trp Phe Ala
1 5

<210> 20

<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
1 5

<210> 21
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

Tyr Ala Ser
1

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22

His Tyr Ser Ser Pro Tyr
1 5

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala
115

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

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

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

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Phiên bản được nhân hóa VH của Tim3-0028 (= Tim3-0438)

<400> 25

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VL của Tim3-0028 (= Tim3-0438)

<400> 26

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VH của Tim3-0028 (= Tim3-0443)

<400> 27

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser
115

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

<220>
<223> Phiên bản được nhân hóa VL của Tim3-0028 (= Tim3-0443)

<400> 28

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
1 5

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

Glu Asp Gly
1

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31

His Gly Tyr Val Gly Trp Phe Ala
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32

Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr
1 5

<210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Gly Ala Ser
1

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp
1 5

<210> 35
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

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

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

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 37

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 38
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 38

Gly Gly Arg
1

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 39

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 40

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

<210> 41

<211> 3
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 41

Arg Ser Ser
1

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 42

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
1 5

<210> 43
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 44

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

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

<210> 45
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Biến thể được nhân hóa-miền biến đổi chuỗi nặng VH của PD1-0103_01

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 111
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Biến thể được nhân hóa-miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_01

<400> 46

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr

85 90 95

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

<210> 47
<211> 111
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Biến thể được nhân hóa-miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_02

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48
<211> 111
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Biến thể được nhân hóa-miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_03

<400> 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 49
<211> 111
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Biến thể được nhân hóa-miền biến đổi chuỗi nhẹ VL của PD1-0103_04

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

<210> 50
<211> 443
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0389 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028)

<400> 50

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 51
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0389

<400> 51

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 52
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0389

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 53
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0389

<400> 53

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 54
<211> 443
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0168 (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0018)

<400> 54

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 55
<211> 450
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0168

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 56
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0168

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 57
<211> 213
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0168

<400> 57

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

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
20 25 30

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 58
<211> 443
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0166: (dựa trên PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0038

<400> 58

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

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

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

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn

260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 59
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0166

<400> 59

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 60
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0166

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 61
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0166

<400> 61

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 62
<211> 443
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0476: (dựa trên PD1-0103_0312 được nhân hóa)/ Tim3-0438)

<400> 62

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

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

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

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr

85 90 95

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

305 310 315 320

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 63
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0476

<400> 63

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 64
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0476

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 65
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0476

<400> 65

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 66
<211> 443
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 1 của 1+1 PD1TIM3_0477: (dựa trên PD1-0103_0312 được nhân hóa) / Tim3-0434)

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe

355 360 365

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 67
<211> 450
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng 2 của 1+1 PD1TIM3_0477

<400> 67

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 68
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 1+1 PD1TIM3_0477

<400> 68

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 69
<211> 213
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 1+1 PD1TIM3_0477

<400> 69

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

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

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 70
<211> 685
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của 2+2 PD1TIM3_0358: PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0028

<400> 70

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro
465 470 475 480

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
485 490 495

Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
500 505 510

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
515 520 525

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
530 535 540

Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Gln Gln Asn Tyr Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
565 570 575

Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
580 585 590

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
595 600 605

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

610 615 620

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
625 630 635 640

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
645 650 655

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
660 665 670

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
675 680 685

<210> 71
<211> 200
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 2+2 PD1TIM3_0358

<400> 71

Asn Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ser Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
195 200

<210> 72
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 2+2 PD1TIM3_0358

<400> 72

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

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

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

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

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

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

85 90 95

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 73
<211> 686
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của 2+2 PD1TIM3_0359: PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0018

<400> 73

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Leu Asn Asp Asp Val Phe Phe Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Gln Ile Ala Ser Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
465 470 475 480

Pro Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu
485 490 495

Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg
500 505 510

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu
515 520 525

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
530 535 540

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr
545 550 555 560

Cys Gln Gln Asn Tyr Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
565 570 575

Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
580 585 590

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
595 600 605

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
610 615 620

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
625 630 635 640

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
645 650 655

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
660 665 670

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
675 680 685

<210> 74
<211> 213
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 2+2 PD1TIM3_0359

<400> 74

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

Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Thr
20 25 30

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

Asp Ala Phe Lys Leu Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 75
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 2+2 PD1TIM3_0359

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 76
<211> 685
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của 2+2 PD1TIM3_0321: PD1-0103 dạng khảm / Tim3-0038

<400> 76

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Leu Ile Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Pro
465 470 475 480

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
485 490 495

Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
500 505 510

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
515 520 525

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
530 535 540

Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Gln Gln Asn Tyr Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
565 570 575

Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
580 585 590

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
595 600 605

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
610 615 620

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
625 630 635 640

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
645 650 655

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
660 665 670

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
675 680 685

<210> 77
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 1 của 2+2 PD1TIM3_0321

<400> 77

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78
<211> 227
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ 2 của 2+2 PD1TIM3_0321

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

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

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
195 200 205

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 79
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

<210> 80
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 80

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

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

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

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

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

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 81
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 81

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 82
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 82

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 83
<211> 330
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 83

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 84
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 84

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

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

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

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 85
<211> 280
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 85

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

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

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

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

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His
195 200 205

Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu
225 230 235 240

Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro
245 250 255

Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro
260 265 270

Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
275 280

<210> 86
<211> 181
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 86

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

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

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

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

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly
180

<210> 87
<211> 268
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 87

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

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

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser

145 150 155 160

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175

Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205

Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225 230 235 240

Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
245 250 255

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

<210> 88
<211> 150
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 88

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

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

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
145 150

<210> 89
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 90
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn đệm GGGGS

<400> 90

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 91
<211> 192
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đuôi SNAP

<400> 91

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
1 5 10 15

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
20 25 30

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

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
65 70 75 80

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
85 90 95

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
100 105 110

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
115 120 125

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
130 135 140

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
145 150 155 160

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
165 170 175

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Gly Ser Pro Gly Leu Glu Val Asn
180 185 190

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đuôi Flag

<400> 92

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 93
<211> 300
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93

Met Phe Ser His Leu Pro Phe Asp Cys Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

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

Asn Ala Tyr Leu Pro Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu
35 40 45

Val Pro Val Cys Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly
50 55 60

Asn Val Val Leu Arg Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser
65 70 75 80

Arg Tyr Trp Leu Asn Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
100 105 110

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

Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
130 135 140

Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145 150 155 160

Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
165 170 175

Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
180 185 190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly
195 200 205

Ile Cys Ala Gly Leu Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe
210 215 220

Lys Trp Tyr Ser His Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile
225 230 235 240

Ser Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu
245 250 255

Gly Ile Arg Ser Glu Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr
260 265 270

Glu Val Glu Glu Pro Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln
275 280 285

Gln Pro Ser Gln Pro Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met
290 295 300

<210> 94
<211> 181
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đuôi Clip

<400> 94

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
1 5 10 15

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Arg Ile Ile Phe
20 25 30

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

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Ile Gln Ala Thr Ala Trp
50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
65 70 75 80

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
85 90 95

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
100 105 110

Glu Ser His Leu Ala Ala Leu Val Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
115 120 125

Val Asn Thr Ala Leu Asp Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
130 135 140

His Arg Val Val Gln Gly Asp Ser Asp Val Gly Pro Tyr Leu Gly Gly
145 150 155 160

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
165 170 175

Lys Pro Gly Leu Gly
180