(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) **1-0039430**

(51)[8] **C07K 16/28**; A61P 31/00; A61P 37/00; A61K 39/00; A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2018-00853
(22) 01/08/2016
(86) PCT/CN2016/092680 01/08/2016
(87) WO 2017/020802 A1 09/02/2017
(30) 201510465481.8 31/07/2015 CN
(45) 25/04/2024 433
(43) 27/08/2018 365A
(73) 1. Jiangsu Alphamab Biopharmaceuticals Co., Ltd. (CN)
Room 310, Building G, No.388 Ruoshui Road, SIP, Suzhou, Jiangsu 215125, China
2. 3D MEDICINES (BEIJING) CO., LTD. (CN)
Room 1603, Building 3, No.88 Kechuangliu Street Beijing 100176, China
(72) XU, Ting (CN); DONG, Yanrong (CN); WANG, Pilin (CN); CHEN, Ting (CN).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ ALNGUYEN (ALNGUYEN IP CO.,LTD.)

(54) PHÂN TỬ GẮN KẾT PHỐI TỬ GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH ĐÃ ĐỊNH (PDL1) VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh y học, và bộc lộ kháng thể đơn miền và các protein phái sinh của nó kháng phối tử gây chết tế bào theo chương trình đã định (PDL1). Cụ thể hơn, sáng chế bộc lộ phối tử gây chết tế bào theo chương trình đã định 1 (PDL1) sự gắn kết phân tử, đặc biệt là ứng dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa hoặc chẩn đoán các bệnh liên quan PDL1 như khối u.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh y học, và bộc lộ kháng thể đơn miền và các protein phái sinh của nó kháng phối tử gây chết tế bào theo chương trình đã định (programmed death ligand - PDL1). Cụ thể hơn, sáng chế bộc lộ phân tử gắn kết với PDL1 và việc sử dụng chúng, đặc biệt là việc sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa hoặc chẩn đoán các bệnh có liên quan đến PDL1 như khối u.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể gây chết tế bào theo chương trình đã định 1 (programmed death 1 - PD-1) là thành viên trong họ CD28 các thụ thể, bao gồm CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, và BTLA. Các thành viên đầu tiên của họ này, CD28 và ICOS, được phát hiện bởi hiệu quả tác động lên việc gia tăng sự tăng sinh của tế bào T sau khi bổ sung các kháng thể đơn dòng (Hutloff và các đồng tác giả (1999) Nature 397:263-266; Hansen và các đồng tác giả (1980) Immunogenics 10:247-260). Hai phối tử glycoprotein bề mặt tế bào cho PD-1 đã được xác định, PDLl và PD-L2, và đã cho thấy có thể điều hòa giảm sự hoạt hóa của tế bào T và sự tiết cytokin khi gắn vào PD-1 (Freeman và các đồng tác giả (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman và các đồng tác giả (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter và các đồng tác giả (2002) Eur J Immunol 32:634-43; Ohigashi và các đồng tác giả (2005) Clin Cancer Res 11:2947-53). Cả PDLl (B7-H1) và PDL2 (B7-DC) đều là các thể tương đồng B7 gắn vào PD-1 mà không gắn vào các thành viên họ CD28 khác (Blank và các đồng tác giả (2004). Biểu hiện của PDLl lên bề mặt tế bào cũng đã cho thấy được điều chỉnh tăng qua việc kích thích IFN-γ.

Biểu hiện PDLl đã được tìm thấy trong một số ung thư ở chuột và người,

bao gồm ung thư phổi, ung thư buồng trứng và ung thư ruột kết và các loại u tủy (Iwai và các đồng tác giả (2002) PNAS 99:12293-7; Ohigashi và các đồng tác giả (2005), Clin Cancer Res 11:2947-53). Các kết quả hiện có cho thấy rằng PDL1 được biểu hiện quá mức trong các tế bào khối u đóng vai trò quan trọng trong việc tránh tính miễn dịch của khối u bằng cách làm tăng sự rụng chết các tế bào T. Các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra rằng dòng tế bào khối u P815 được truyền nhiễm bằng gen PDL1 có thể kháng được sự phân giải đặc hiệu bởi CTL, và tăng khả năng phát bệnh ung thư và các hoạt động xâm lấn. Các hoạt động sinh học này có thể bị đảo ngược bằng cách chặn PDL1. Các tế bào khối u được cấy vào chuột, mà đã loại bỏ PDL1 để chặn tương tác PDL1/PD-1, không thể hình thành các khối u (Dong và các đồng tác giả (2002) Nat Med 8:793-800). Điều này gợi ý rằng PD- Ll có thể có liên quan đến viêm màng nhày ruột và ức chế PDLl ngăn chặn bệnh co thắt có liên quan đến viêm ruột kết (Kanai và các đồng tác giả (2003) J Immunol 171:4156-63).

Do vậy, trong lĩnh vực này vẫn có nhu cầu về kháng thể kháng PDL1 mà có thể gắn vào PDL1 với ái lực cao và có khả năng chặn sự gắn kết của PDL1 vào PD-1 và, đặc biệt là kháng thể đơn miền chuỗi nặng kháng PDL1.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã thu được kháng thể đơn miền chuỗi nặng (VHH) kháng PDL1 với tính đặc hiệu cao, ái lực cao và tính ổn định cao bằng cách sàng lọc bằng công nghệ hiển thị thể thực khuẩn.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết PDL1 bao gồm miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID No:1-6 và vùng Fc của globulin miễn dịch của người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa phân tử gắn kết PDL1, và vectơ biểu hiện và tế bào vật chủ chứa phân tử axit

nucleic này.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm dược bao gồm phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng phân tử gắn kết PDL1, và chế phẩm dược theo sáng chế, đặc biệt là việc sử dụng và phương pháp để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh có liên quan đến PDL1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Figure 1. cho thấy hiệu quả chặn của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 đối với tương tác PD1/PDL1.

Figure 2. cho thấy các đường cong gắn kết của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 vào protein kháng nguyên PDL1.

Figure 3. cho thấy các đường cong chặn của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 đối với tương tác PD1/PDL1.

Figure 4. cho thấy so sánh trình tự của năm biến thể giả người của kháng thể số 5.

Figure 5. cho thấy các đường cong gắn kết của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc vào PDL1 (bằng ELISA).

Figure 6. cho thấy các đường cong chặn của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc đối với tương tác PD1/PDL1 (bằng ELISA cạnh tranh).

Figure 7. cho thấy các đường cong chặn của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc đối với tương tác CD80/PDL1 (bằng ELISA cạnh tranh).

Figure 8. cho thấy các đường cong chặn của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc đối với tương tác PD1/293-PDL1 (bằng FACS).

Figure 9. cho thấy các đường cong chặn của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc đối với tương tác Jurket-PD1/PDL1 (bằng FACS).

Figure 10. cho thấy tính gắn kết đặc hiệu của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc lên proten PDL1 được phát hiện bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy.

Figure 11. cho thấy sự gắn kết của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc vào protein PDL1 của khỉ được phát hiện bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy.

Figure 12. cho thấy các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc xác định số lượng tế bào dương tính PDL1 trên các phần mô của các người bệnh.

Figure 13. cho thấy sự kích hoạt PBMC bằng các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc.

Figure 14. cho thấy sự kích hoạt các tế bào CD4+T bằng các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc.

Figure 15. cho thấy các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc thúc đẩy việc tiết ra IL-2.

Figure 16. cho thấy các hoạt động CDC và ADCC của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc mang Fc biến đổi.

Figure 17. cho thấy các đường cong phát triển khối u sau điều trị bằng các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc.

Figure 18. cho thấy sự ức chế phát triển khối u bằng cách sử dụng các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc trong nhiều thời điểm.

Figure 19. cho thấy sự so sánh giữa các hoạt động ức chế sự tăng trưởng khối u của hu56V2-Fc và 2.41. A, A375:PBMC=5:1; B, A375:PBMC=1:1.

Figure 20. cho thấy ảnh hưởng của các biện pháp xử lý kiềm và oxy hóa đến hoạt tính của các protein dung hợp kháng thể đơn miền PDL1-Fc.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Trừ khi có chỉ định hoặc quy định khác, tất cả các thuật ngữ được sử dụng đều có nghĩa thông thường trong lĩnh vực này, mà là rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Tham khảo các sổ tay tiêu chuẩn, như Sambrook và các đồng tác giả, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tái bản lần thứ hai), Tập 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), và Roitt và các đồng tác giả, "Immunology" (tái bản lần thứ hai), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), cũng như các kiến thức cơ bản trong lĩnh vực này được trích dẫn ở đây. Hơn nữa, trừ khi có chỉ định khác, tất cả các phương pháp, các bước, các kỹ thuật và các thao tác mà không được mô tả cụ thể chi tiết có thể được thực hiện và đã được thực hiện theo cách đã biết, là rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Tham khảo thêm các sổ tay tiêu chuẩn, các kiến thức cơ bản trong lĩnh vực này được đề cập và trích dẫn ở trên dưới đây.

Trừ khi có chỉ định khác, các thuật ngữ có thể thay thế nhau "kháng thể" và "globulin miễn dịch" – bất cứ khi nào được sử dụng ở đây là để chỉ kháng thể chuỗi nặng hoặc để chỉ kháng thể 4 chuỗi thông thường – được sử dụng được sử dụng như các thuật ngữ chung để bao gồm cả kháng thể với đầy đủ kích thước, các chuỗi riêng của nó, cũng như tất cả các phần, các miền hoặc các mảnh của nó (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các miền hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên như các miền VHH hoặc các miền VH/VL, tương ứng). Ngoài ra, thuật ngữ "trình tự" như được sử dụng ở đây (ví dụ trong các thuật ngữ như "trình tự globulin miễn dịch", "trình tự kháng thể", "trình tự (đơn) miền biến đổi", "trình tự VHH" hoặc "trình tự protein"), cần được hiểu chung là bao gồm cả các trình tự axit amin cũng như các trình tự axit nucleic hoặc các trình tự nucleotit mã hóa giống nhau, trừ khi ngữ cảnh đòi hỏi sự giải thích hạn chế hơn.

Thuật ngữ "miền" (của polypeptit hoặc protein) như được sử dụng ở đây là chỉ cấu trúc protein gấp mà có khả năng duy trì cấu trúc bậc ba của nó một cách độc lập với phần còn lại của protein này. Nói chung, các miền chịu trách nhiệm đối với các tính chất chức năng riêng biệt của các protein, và trong nhiều trường hợp có thể được thêm vào, loại ra hoặc được chuyển sang các protein khác mà không làm mất chức năng của phần còn lại của protein và/hoặc của miền này.

Thuật ngữ "miền globulin miễn dịch" như được sử dụng ở đây là chỉ vùng hình cầu của chuỗi kháng thể (ví dụ như chuỗi kháng thể 4 chuỗi thông thường hoặc chuỗi kháng thể chuỗi nặng), hoặc là chỉ polypeptit mà chủ yếu gồm vùng hình cầu như vậy. Các miền globulin miễn dịch được đặc trưng ở chỗ chúng duy trì đặc tính gấp globulin miễn dịch của các phân tử kháng thể, mà bao gồm bánh 2 lớp gồm khoảng 7 mạch beta đối song được bố trí trong hai phiến beta, tùy chọn được ổn định bởi liên kết disulphit bảo toàn.

Thuật ngữ "miền biến đổi globulin miễn dịch" như được sử dụng ở đây có nghĩa là miền globulin miễn dịch cơ bản bao gồm bốn " vùng khung" mà được đề cập đến trong lĩnh vực này và sau đây là "vùng khung 1" hoặc "FR1" (framework region – FR); là “vùng khung 2" hoặc "FR2"; là “vùng khung 3" hoặc "FR3"; và là “vùng khung 4" hoặc "FR4", tương ứng; mà các vùng khung bị gián đoạn bởi ba "các vùng xác định bổ sung" hoặc "CDRs" (complementarity determining regions – CDRs), mà được đề cập đến trong lĩnh vực này và sau đây là “vùng xác định bổ sung 1” hoặc "CDR1 "; là “vùng xác định bổ sung 2" hoặc "CDR2"; và là “vùng xác định bổ sung 3" hoặc "CDR3", tương ứng. Vì vậy, cấu trúc hoặc trình tự chung của miền biến đổi globulin miễn dịch có thể được chỉ ra như sau: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Đây là (các) miền biến đổi globulin miễn dịch mang tính đặc hiệu kháng thể đối với kháng nguyên bằng cách mang vị trí gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch" như được sử dụng ở đây có nghĩa là miền biến đổi globulin miễn dịch mà có khả năng gắn kết đặc

hiệu vào epitop của kháng nguyên mà không cần ghép với miền biến đổi globulin miễn dịch bổ sung. Một ví dụ về các miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch theo nghĩa theo sáng chế là "miền kháng thể", như các miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch VH và VL (các miền VH và các miền VL). Một ví dụ khác về các miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch là "miền VHH " (hoặc đơn giản là "VHH") của lạc đà Camelids, như được định nghĩa sau đây.

"Các miền VHH", còn được gọi là các kháng thể đơn miền chuỗi nặng, VHHs, các miền VHH, các mảnh kháng thể VHH, và các kháng thể VHH, là miền biến đổi globulin miễn dịch gắn kết kháng nguyên của "các kháng thể chuỗi nặng" (nghĩa là, "các kháng thể không có các chuỗi nhẹ") (Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: " Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). Thuật ngữ "miền VHH" được chọn để phân biệt các miền biến đổi này với các miền biến đổi chuỗi nặng mà có mặt trong các kháng thể 4 chuỗi thông thường (mà được đề cập đến ở đây là "các miền VH") và với các miền biến đổi chuỗi nhẹ mà có mặt trong các kháng thể 4 chuỗi thông thường (mà được đề cập đến ở đây là "các miền VL"). Các miền VHH có thể gắn kết đặc hiệu vào epitop mà không cần miền gắn kết kháng nguyên bổ sung (đối lập với các miền VH hoặc VL trong kháng thể 4 chuỗi thông thường, trong trường hợp đó epitop được nhận diện bởi miền VL cùng với miền VH). Các miền VHH là các đơn vị nhận biết kháng nguyên nhỏ, mạnh và hiệu quả được tạo ra từ đơn miền globulin miễn dịch.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, các thuật ngữ kháng thể đơn miền chuỗi nặng, miền VHH, VHH, miền V_HH, mảnh kháng thể VHH, kháng thể VHH, cũng như "Nanobody®" và "miền Nanobody®" ("Nanobody" là nhãn hiệu của công ty Ablynx N.V.; Ghent; Bỉ) được sử dụng thay thế cho nhau.

Các gốc axit amin trong các miền VHH của lạc đà Camelids được đánh số theo cách đánh số chung cho các miền VH được đưa ra bởi Kabat và các đồng tác

giả ("Sequence of proteins of immunological interest ", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Ấn phẩm số 91), như được chỉ ra ví dụ như trong Figure 2 của Riechmann và Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). Theo cách đánh số này,

- FR1 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 1-30,
- CDR1 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 31-35,
- FR2 bao gồm các axit amin ở các vị trí 36-49,
- CDR2 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 50-65,
- FR3 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 66-94,
- CDR3 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 95-102, và
- FR4 bao gồm các gốc axit amin ở các vị trí 103-113.

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng - như đã biết trong lĩnh vực này đối với các miền VH và đối với các miền VHH - tổng số các gốc axit amin trong mỗi CDR có thể thay đổi và có thể không tương ứng với tổng số các gốc axit amin được chỉ ra bởi cách đánh số Kabat (nghĩa là, một hoặc nhiều vị trí theo cách đánh số Kabat có thể không có trong trình tự thực tế, hoặc trình tự thực tế có thể chứa nhiều gốc axit amin hơn số lượng được cho phép theo cách đánh số Kabat). Nói chung, điều này có nghĩa là cách đánh số theo Kabat có thể hoặc không tương ứng với cách đánh số các gốc axit amin trên thực tế trong trình tự thực tế.

Các phương pháp khác để đánh số các gốc axit amin của các miền VH, mà các phương pháp này cũng có thể được áp dụng theo cách tương tự cho các miền VHH, là đã biết trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, trong bản mô tả này, các điểm yêu cầu bảo hộ và các hình vẽ, cách đánh số theo Kabat và được áp dụng cho các miền VHH như được mô tả ở trên sẽ được tuân thủ, trừ khi có chỉ định khác.

Tổng số các gốc axit amin trong miền VHH sẽ thường nằm trong phạm vi từ 110 đến 120, thường giữa 112 và 115. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng các trình tự

nhỏ hơn và dài hơn cũng có thể thích hợp cho các mục đích được mô tả ở đây.

Các đặc tính cấu trúc và các tính chất chức năng khác nữa của các miền VHH và các polypeptit chứa chúng có thể được tóm tắt như sau:

Các miền VHH (mà đã "được thiết kế" theo tự nhiên để gắn kết chức năng vào kháng nguyên mà không cần có, và không bất kỳ tương tác nào với, miền biến đổi chuỗi nhẹ) có thể thực hiện chức năng như một đơn vị cấu trúc, miền hoặc polypeptit gắn kết kháng nguyên về mặt chức năng tương đối nhỏ và đơn tính. Điều này phân biệt các miền VHH so với các miền VH và VL của các kháng thể 4 chuỗi thông thường, mà bản thân chúng nói chung không thích hợp cho ứng dụng thực tế làm các protein gắn kết kháng nguyên đơn tính hoặc các miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch, nhưng cần để được kết hợp dưới dạng này hay dạng khác để tạo ra đơn vị gắn kết kháng nguyên mang tính chức năng (như trong ví dụ các mảnh kháng thể thông thường như các mảnh Fab; trong scFvs, mà có miền VH được liên kết cộng hóa trị với miền VL).

Vì các tính chất độc đáo này, việc sử dụng các miền VHH - riêng hoặc là một phần của một polypeptit lớn hơn – mang lại một số lợi thế đáng kể so với việc sử dụng các miền VH và VL thông thường, scFvs hoặc các mảnh kháng thể thông thường (như các mảnh Fab hoặc $F(ab')_2$):

- Chỉ cần một miền duy nhất để gắn kháng nguyên có ái lực cao và tính chọn lọc cao, do vậy không cần phải có hai miền riêng, cũng như không cần phải đảm bảo rằng hai miền này phải có trong cấu hình không gian thích hợp (nghĩa là thông qua việc sử dụng các mối liên kết được thiết kế đặc biệt, như với scFvs);

- Các miền VHH có thể được biểu hiện từ một gen duy nhất và không yêu cầu các cải biến sau dịch mã hoặc cuốn gập;

- Các miền VHH có thể được dễ dàng thiết kế thành các định dạng đa hóa trị và đa đặc hiệu (được định dạng);

- Các miền VHH có khả năng hòa tan cao và không có xu hướng kết tụ;

- Các miền VHH có tính ổn định cao đối với nhiệt, pH, các proteaza và các chất hoặc các điều kiện gây biến chất khác và, vì vậy, có thể được chuẩn bị, bảo quản hoặc vận chuyển mà không cần sử dụng các thiết bị làm lạnh, nhờ đó chi phí, thời gian và môi trường lưu giữ và vận chuyển;

- Các miền VHH là dễ và khá rẻ để tạo ra, ngay cả với quy mô lớn cần cho sản xuất;

- Các miền VHH là tương đối nhỏ (khoảng 15 kDa, hoặc 10 lần nhỏ hơn IgG thông thường) so với các kháng thể 4 chuỗi thông thường và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và do đó cho thấy khả năng thâm nhập cao (hơn) vào các mô và có thể được sử dụng ở các liều cao hơn so với các kháng thể 4 chuỗi thông thường và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng;

- Các miền VHH có thể cho thấy cái gọi là các tính chất gắn kết qua hốc (đặc biệt là do vòng lặp CDR3 kéo dài của chúng, so với các miền VH thông thường) và do đó còn có thể tiếp cận được đến các mục tiêu đích và các epitop mà các kháng thể 4 chuỗi thông thường và các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng không tiếp cận được.

Các phương pháp để thu được các miền VHH gắn kết vào kháng nguyên hoặc epitop đặc hiệu đã được mô tả trước đó, ví dụ như trong các công bố đơn sáng chế quốc tế WO2006/040153 và WO2006/122786; R. van der Linden và các đồng tác giả, Journal of Immunological Methods, 240 (2000) 185-195; Li và các đồng tác giả, J Biol Chem., 287 (2012) 13713-13721; Deffar và các đồng tác giả, African Journal of Biotechnology Vol. 8 (12), pp. 2645-2652, 17-06-2009 và WO94/04678.

Các miền VHH có nguồn gốc từ lạc đà Camelids có thể "được nhân bản hóa " bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự axit amin của trình tự VHH ban đầu bằng một hoặc nhiều gốc axit amin mà có ở (các) vị trí tương ứng trong miền VH từ kháng thể 4 chuỗi thông thường của người. Miền

VHH nhân bản hóa có thể chứa một hoặc nhiều các trình tự vùng khung người hoàn chỉnh, và trong phương án cụ thể, chứa trình tự vùng khung IGHV3 người.

Nói chung, thuật ngữ "tính đặc hiệu" là chỉ số lượng các dạng khác nhau của các kháng nguyên hoặc các epitop mà một phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc phân tử protein gắn kết kháng nguyên cụ thể (như miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch theo sáng chế) có thể gắn vào. Tính đặc hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên có thể được xác định dựa vào ái lực của nó. Ái lực, được đại diện bởi hằng số cân bằng cho sự phân ly của kháng nguyên với một protein gắn kết kháng nguyên (KD), là thước đo độ mạnh gắn kết giữa epitop và vị trí gắn kết kháng nguyên lên protein gắn kết kháng nguyên: giá trị KD càng nhỏ, thì độ mạnh gắn kết giữa epitop và phân tử gắn kết kháng nguyên (theo cách khác, ái lực còn có thể được biểu hiện như hằng số kết hợp (KA), tức là 1/KD) càng lớn. Là rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, ái lực có thể được xác định theo cách đã biết, phụ thuộc vào kháng nguyên đặc hiệu cần quan tâm. Ái lực là thước đo độ mạnh gắn kết giữa phân tử gắn kết kháng nguyên (như globulin miễn dịch, kháng thể, miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch hoặc các polypeptit chứa nó) và kháng nguyên thích hợp. Ái lực có liên quan đến cả ái lực giữa epitop và vị trí gắn kết kháng nguyên của nó trên phân tử gắn kết kháng nguyên và số lượng các vị trí gắn kết thích hợp có trên phân tử gắn kết kháng nguyên.

Thông thường, các phân tử gắn kết đặc hiệu sẽ gắn vào PDL1 có hằng số phân ly (KD) là từ 10^{-7} đến 10^{-11} mol/lít (M), và tốt hơn là từ 10^{-8} đến 10^{-11} mol/lít, tốt hơn nữa là từ 10^{-9} đến 10^{-11} mol/lít, và thậm chí tốt hơn nữa là từ 10^{-10} đến 10^{-11} mol/lít hoặc ít hơn (như được đo trong xét nghiệm Biacore hoặc KinExA), và/hoặc có hằng số kết hợp (KA) ít nhất là 10^7 M^{-1}, tốt hơn ít nhất là 10^8M^{-1}, tốt hơn nữa ít nhất là 10^9 M^{-1}, còn tốt hơn nữa ít nhất là 10^{10} M^{-1}, như ít nhất là 10^{10} M^{-1}. Bất kỳ giá trị KD nào lớn hơn 10^{-4} M nói chung đều được coi là chỉ ra sự gắn kết không đặc hiệu. Sự gắn kết đặc hiệu của

protein gắn kết kháng nguyên vào kháng nguyên hoặc epitop có thể được xác định theo cách thích hợp đã biết bất kỳ, bao gồm, ví dụ, các xét nghiệm được mô tả ở đây, phân tích Scatchard và/hoặc các xét nghiệm gắn kết cạnh tranh, như các xét nghiệm miễn dịch đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), các xét nghiệm miễn dịch enzym (enzym immunoassay - EIA) và các xét nghiệm sandwich cạnh tranh.

Các gốc axit amin sẽ được chỉ định theo mã axit amin một hoặc ba chữ cái tiêu chuẩn, như thường được biết và thống nhất trong lĩnh vực này. Khi so sánh hai trình tự axit amin, thuật ngữ "sự khác biệt về axit amin" là chỉ số lượng chèn, xóa hoặc thay thế các gốc axit amin tại một vị trí của trình tự tham khảo, so với trình tự thứ hai. Trong trường hợp (các) thay thế, (các) thay thế này tốt hơn (các) thay thế axit amin bảo toàn, có nghĩa là một gốc axit amin được thay bằng một gốc axit amin khác có cấu trúc hóa học tương tự và không hoặc ít ảnh hưởng lên chức năng, hoạt tính hoặc các tính chất sinh học khác của polypeptit. Các thay thế axit amin bảo toàn như vậy đã được biết trong lĩnh vực này, trong đó các thay thế axit amin bảo toàn tốt hơn là các thay thế mà trong đó một axit amin trong các nhóm sau (i) - (v) được thay thế bằng một gốc axit amin khác trong cùng nhóm: (i) các gốc béo nhỏ, không cực hoặc có cực nhẹ: Ala, Ser, Thr, Pro và Gly; (ii) các gốc có cực, tích điện âm và các amit (không tích điện) của chúng: Asp, Asn, Glu và Gin; (iii) các gốc có cực, tích điện dương: His, Arg và Lys; (iv) các gốc béo lớn, không cực: Met, Leu, He, Val và Cys; và (v) các gốc thơm: Phe, Tyr và Trp. Đặc biệt ưu tiên các thay thế axit amin bảo toàn sau: Ala vào Gly hoặc vào Ser; Arg vào Lys; Asn vào Gln hoặc vào His; Asp vào Glu; Cys vào Ser; Gln vào Asn; Glu vào Asp; Gly vào Ala hoặc vào Pro; His vào Asn hoặc vào Gln; Ile vào Leu hoặc vào Val; Leu vào Ile hoặc vào Val; Lys vào Arg, vào Gln hoặc vào Glu; Met vào Leu, vào Tyr hoặc vào Ile; Phe vào Met, vào Leu hoặc vào Tyr; Ser vào Thr; Thr vào Ser;Trp vào Tyr; Tyr vào Trp hoặc vào Phe; Val

vào Ile hoặc vào Leu.

Polypeptit hoặc phân tử axit nucleic được coi là "được tách hoàn toàn" - ví dụ, khi được so với nguồn sinh học bản địa của nó và/hoặc môi trường phản ứng hoặc môi trường nuôi cấy mà từ đó thu được nó - khi nó đã được tách ra từ ít nhất một một cấu phần khác mà nó thường có liên quan trong nguồn hoặc môi trường đã nêu, như một protein/polypeptit khác, một axit nucleic khác, một cấu phần sinh học khác hoặc đại phân tử hoặc ít nhất là một chất gây bệnh, tạp chất hoặc cấu phần phụ. Cụ thể hơn, polypeptit hoặc phân tử axit nucleic được coi là "được tách hoàn toàn" khi nó đã được làm sạch ít nhất 2 lần, ưu tiên hơn ít nhất 10 lần, ưu tiên hơn mữa ít nhất là 100 lần, và đến 1000 lần hoặc nhiều hơn. Polypeptit hoặc phân tử axit nucleic mà "ở dạng được tách hoàn toàn " tốt hơn là đồng nhất hoàn toàn, như được xác định sử dụng kỹ thuật thích hợp, như kỹ thuật sắc ký thích hợp, như điện di gel polyacrylamit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" là chỉ động vật có vú, cụ thể là linh trưởng, cụ thể hơn là người.

Phân tử gắn kết với PDL1 theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết phối tử gây chết tế bào theo chương trình đã định 1 (PDL1), mà có thể gắn kết đặc hiệu vào PDL1 và bao gồm trình tự axit amin A-L-B, trong đó A đại diện cho miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch, L không có mặt hoặc đại diện cho mối liên kết axit amin, và B đại diện cho vùng Fc của globulin miễn dịch của người,

trong đó miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:1-6,

phân tử gắn kết PDL1 có khả năng tạo ra các homodimer thông qua vùng Fc của globulin miễn dịch của người.

Như được sử dụng ở đây, "vùng Fc của globulin miễn dịch của người" là chỉ vùng Fc từ vùng không đổi gồm IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người (các trình tự axit amin của các vùng không đổi là chỉ các món P01857, P01859, P01860, P01861 trong cơ sở dữ liệu protein www.uniprot.org), mà bao gồm vùng bản lề hoặc phần của vùng bản lề, vùng CH2, và vùng CH3 của vùng không đổi globulin miễn dịch. Theo sáng chế, hoạt tính ADCC hoặc CDC có thể được tăng lên hoặc được loại bỏ, hoặc ái lực của FcRn có thể được tăng lên hoặc được giảm xuống, bằng cách biến đổi các axit amin 1-5 trong vùng CH2 của trình tự axit amin của "vùng Fc của globulin miễn dịch của người"; hoặc tính ổn định của protein có thể được tăng lên bằng cách biến đổi các axit amin 1-4 trong vùng bản lề. Tuy nhiên, theo sáng chế, "vùng Fc của globulin miễn dịch của người" không bao gồm bất kỳ biến đổi nào mà thúc đẩy hoặc ngăn ngừa việc tạo ra các heterodimer Fc, cũng như không bao gồm bất kỳ cải biến bổ sung trình tự protein chức năng khác vào đầu N hoặc đầu C của mảnh Fc.

Theo một phương án ưu tiên, vùng Fc globulin miễn dịch đã nêu được biến đổi để loại các hoạt tính ADCC và CDC. Trong phương án cụ thể, trình tự của vùng Fc globulin miễn dịch được chọn từ SEQ ID NOs:7-9.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế thường có mặt dưới dạng các homodimer do vùng Fc của globulin miễn dịch của người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "mối liên kết" có nghĩa là trình tự axit amin không có chức năng có độ dài 1-20 gốc axit amin, mà không phải là cấu trúc bậc hai hoặc cao hơn. Ví dụ, mối liên kết được nêu là mối liên kết linh hoạt, như GGGS, GS, GAP và các mối liên kết tương tự.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO:10-27.

Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có ít nhất một trong số các đặc tính kỹ

thuật sau:

(a) gắn kết với PDL1 người có KD nhỏ hơn 1×10^{-7} M;

(b) chặn tương tác giữa PDL1 và PD-1;

(c) làm tăng sự hoạt hóa của PBMC và/hoặc các tế bào T;

(d) ức chế sự phát triển khối u.

Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể gắn vào PDL1 có KD nhỏ hơn 1×10^{-7} M, tốt hơn là nhỏ hơn 1×10^{-8} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1×10^{-9} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1×10^{-10} M, và thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1×10^{-11} M.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể gắn kết đặc hiệu vào PDL1 người và chặn tương tác giữa PDL1 và PD-1. Theo một số phương án, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể gắn kết đặc hiệu vào PDL1 người và chặn tương tác giữa PDL1 và CD80.

Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể ức chế sự phát triển khối u ít nhất là khoảng 10%, tốt hơn ít nhất là khoảng 20%, tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 30%, tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 40%, tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 50%, tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 60%, tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 70%, và tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 80%.

Hơn nữa, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế chịu được điều trị kiềm và điều trị oxy hóa. Ví dụ, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế duy trì hoạt tính của nó sau điều trị bằng bazơ mạnh (như amoni bicacbonat 500mM) trong khoảng 8 giờ, tốt hơn là khoảng 16 giờ, tốt hơn nữa là khoảng 24 giờ hoặc tốt hơn nữa là khoảng 32 giờ. Theo cách khác, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế duy trì hoạt tính của nó sau điều trị bằng chất oxy hóa (hydro peroxit 1%) trong khoảng 2 giờ, tốt hơn là khoảng 4 giờ, hoặc tốt hơn nữa là khoảng 8 giờ.

Ngoài ra, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế ổn định ở nồng độ cao. Ví dụ, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế giữ ổn định ở nồng độ khoảng 100mg/ml,

tốt hơn nữa là khoảng 150mg/ml, tốt hơn nữa là khoảng 200mg/ml hoặc tốt hơn nữa là khoảng 250mg/ml mà không tạo các kết tụ.

Axit nucleic, vectơ và tế bào vật chủ

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mà mã hóa các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế. Axit nucleic theo sáng chế có thể là RNA, DNA hoặc cDNA. Theo một phương án theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế là ở dạng được tách hoàn toàn.

Axit nucleic theo sáng chế còn có thể ở dạng, có thể có trong và/hoặc có thể là một phần của vectơ, ví dụ như plasmit, cosmit hoặc YAC. Vectơ này có thể ưu tiên là vectơ biểu hiện, nghĩa là vectơ mà có thể có biểu hiện của phân tử gắn kết PDL1 in vitro và/hoặc in vivo (nghĩa là trong tế bào vật chủ, cơ thể vật chủ và/hoặc hệ biểu hiện thích hợp). Vectơ biểu hiện như vậy thường bao gồm ít nhất một axit nucleic theo sáng chế được liên kết hoạt động với một hoặc nhiều yếu tố điều tiết thích hợp, như (các) gen khởi đầu, (các) gen làm tăng, (các) gen kết thúc, và các yếu tố tương tự. Các yếu tố như vậy và sự lựa chọn chúng theo quan điểm biểu hiện của trình tự đặc hiệu trong vật chủ đặc hiệu là kiến thức thông thường đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các ví dụ cụ thể về các yếu tố điều hòa và các yếu tố khác hữu dụng hoặc cần thiết để biểu hiện các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế bao gồm chẳng hạn như các gen khởi đầu, các gen làm tăng, các gen kết thúc, các yếu tố hòa nhập, các gen đánh dấu lựa chọn, các trình tự dẫn, các gen báo cáo, và các yếu tố tương tự.

Các axit nucleic theo sáng chế có thể được chuẩn bị hoặc thu được theo cách đã biết (ví dụ bằng tổng hợp DNA tự động và/hoặc công nghệ DNA tái tổ hợp), dựa vào thông tin trên các trình tự axit amin cho các polypeptit theo sáng chế được đưa ra ở đây, và/hoặc có thể được tách ra từ nguồn tự nhiên

thích hợp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các tế bào vật chủ mà biểu hiện hoặc có khả năng biểu hiện một hoặc nhiều phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế; và/hoặc chứ axit nucleic theo sáng chế. Theo phương án đặc biệt được ưu tiên, các tế bào vật chủ là các tế bào vi khuẩn; các tế bào hữu dụng khác là các tế bào nấm men, các tế bào nấm hoặc các tế bào động vật có vú.

Các tế bào vi khuẩn thích hợp bao gồm các tế bào từ các chủng vi khuẩn gram âm như các chủng *Escherichia coli, Proteus*, và *Pseudomonas*, và các chủng vi khuẩn gram âm như các chủng *Bacillus, Streptomyces*, *Staphylococcus*, và *Lactococcus*. Tế bào nấm thích hợp bao gồm các tế bào từ các loài Trichoderma, Neurospora, và Aspergillus.

Tế bào nấm thích hợp bao gồm các tế bào từ các loài Trichoderma, Neurospora, và Aspergillus. Các tế bào nấm men thích hợp bao gồm các tế bào từ các loài Saccharomyces (ví dụ, Saccharomyces cerevisiae), Schizosaccharomyces (ví dụ, Schizosaccharomyces pombe), Pichia (ví dụ, Pichia pastoris và Pichia metanolica), và Hansenula.

Các tế bào động vật có vú thích hợp bao gồm ví dụ các tế bào HEK293, các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào HeLa, các tế bào COS, và các tế bào tương tự.

Tuy nhiên, các tế bào động vật lưỡng cư, các tế bào côn trùng, các tế bào thực vật, và bất kỳ các tế bào nào được sử dụng trong lĩnh vực này để biểu hiện các protein dị hợp cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp sản xuất phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế, các phương pháp này cơ bản bao gồm các bước:

- nuôi cấy các tế bào vật chủ theo sáng chế ở các điều kiện mà cho phép biểu hiện phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế; và

- thu hồi phân tử gắn kết PDL1 được biểu hiện bằng các tế bào vật chủ từ nuôi cấy; và

- tùy chọn làm sạch thêm và/hoặc sửa phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế.

Theo một phương án ưu tiên, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng các tế bào động vật có vú. Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể đạt được biểu hiện cao trong các tế bào động vật có vú. Ví dụ, mức độ biểu hiện có thể lên đến khoảng 5g/L, tốt hơn là khoảng 6g/L, tốt hơn là khoảng 7g/L, tốt hơn là khoảng 8g/L, tốt hơn là khoảng 9g/L, tốt hơn là khoảng 10g/L hoặc cao hơn.

Các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được tạo ra trong tế bào như nêu trên hay là nội bào (ví dụ như trong phần bào tan, trong periplasma hoặc trong các cơ quan trong cơ thể) và sau đó được tách ra từ các tế bào này vật chủ và tùy chọn được làm sạch thêm; hoặc chúng có thể được tạo ra extracellulahy (ví dụ như trong môi trường mà trong đó các tế bào này vật chủ được nuôi cấy) và sau đó được tách ra từ môi trường nuôi cấy và tùy chọn được làm sạch thêm.

Các phương pháp và các chất phản ứng được sử dụng cho việc tạo ra tái tổ hợp các polypeptit, như các vectơ biểu hiện đặc hiệu thích hợp, các phương pháp biến đổi ra hoặc chuyển nhiễm, các gen đánh dấu lựa chọn, các phương pháp cảm ứng biểu hiện protein, các điều kiện nuôi cấy, và các chất tương tự, là đã biết trong lĩnh vực này. Tương tự, các kỹ thuật tách protein và làm sạch hữu dụng trong phương pháp sản xuất phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế đã được biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Tuy nhiên, các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế còn có thể thu được bằng các phương pháp sản xuất khác của các protein đã biết trong lĩnh vực này, như, tổng hợp hóa học, bao gồm tổng hợp pha cứng hoặc pha lỏng.

Các chế phẩm dược

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm, ví dụ, chế phẩm dược, chứa một hoặc tổ hợp các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế, được tạo công thức cùng với chất mang dược dụng. Các chế phẩm này có thể bao gồm một hoặc tổ hợp các (ví dụ, hai hoặc nhiều, khác nhau) phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế sẽ thường có mặt dưới dạng homodimer do có vùng Fc của globulin miễn dịch của người.

Các chế phẩm dược theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong điều trị kết hợp, nghĩa là, được kết hợp với các chất khác. Ví dụ, điều trị kết hợp này có thể bao gồm phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế được kết hợp với ít nhất một chất kháng khối u khác. Ví dụ, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các kháng thể đíching other kháng nguyên đặc hiệu kháng khối us. Các kháng thể hướng đích các kháng nguyên đặc hiệu kháng khối khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở kháng thể kháng EGFR, kháng thể biến đổi kháng EGFR, kháng thể kháng VEGFa, kháng thể kháng HER2, hoặc kháng thể kháng CMET. Tốt hơn là, các kháng thể này là các kháng thể đơn dòng.

Như được sử dụng ở đây, "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, chất gây phân tán, các chất bao, các chất kháng khuẩn và chống nấm, đăng trương và các chất làm chậm quá trình hấp thụ, và các chất tương tự khác, mà có tính tương hợp sinh lý. Tốt hơn là, chất mang là thích hợp cho tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da, dùng ngoài đường tiêu hóa, tiêm tủy sống hoặc ngoài da (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Phụ thuộc vào cách dùng, hợp chất hoạt tính, nghĩa là, kháng thể, hoặc miễn dịch liên hợp, có thể được phủ trong nguyên liệu để bảo vệ hợp chất này khỏi tác động của các axit và các điều kiện tự nhiên khác mà có thể làm mất hoạt tính của

hợp chất này.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều các muối dược dụng. Thuật ngữ "muối dược dụng" là chỉ muối mà duy trì được hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không có bất kỳ ảnh hưởng động hại không mong muốn nào (ví dụ tham khảo, Berge, S.M., và các đồng tác giả (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ví dụ về các muối như vậy bao gồm các muối cộng axit và các muối cộng bazơ. Các muối cộng axit bao gồm các muối có nguồn gốc từ các axit vô cơ không độc, như axot clohydric, nitric, phosphoric, sulfuric, bromhydric, hydroiođic, phosphorơ và các axit tương tự, cũng như từ các axit hữu cơ không độc như các axit béo mono- và dicarboxylic, các axit alkanoic được thay thế phenyl, các axit hydroxy alkanoic, các axit thơm, các axit sulfonic béo và thơm và các axit tương tự. Các muối cộng bazơ bao gồm các muối có nguồn gốc từ các kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và và các muối tương tự, cũng như từ amin các amin hữu cơ không độc, như N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, cloroprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, procain và các amin tương tự.

Chế phẩm dược theo sáng chế cũng có thể bao gồm chất chống oxy hóa dược dụng. Ví dụ về các chất chống oxy hóa dược dụng bao gồm: (1) các chất chống oxy hóa có thể tan trong nước, như axit ascorbic, xystein cloruahydro, natri bisulfat, natri metabisulfit, natri sulfit và các chất tương tự; (2) các chất chống oxy hóa có thể tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol butyl hóa (butylated hydroxyanisole - BHA), hydroxytoluen butyl hóa (butylated hydroxytoluene - BHT), lexitin, propyl galat, alpha-tocopherol, và các chất tương tự; và (3) chất tạo chelat kim loại, như axit xitric, axit etylendiamin tetraaxetic (etylenediamine tetraacetic acid - EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và các chất tương tự.

Các chế phẩm này còn có thể chứa các chất phụ trợ như các chất bảo

quản, các chất làm ướt, các chất tạo nhũ tương và các chất gây phân tán.

Việc ngăn ngừa sự có mặt của các vi sinh vật có thể được đảm bảo bằng các quy trình khử trùng và cả bằng các chất kháng khuẩn và chất chống nấm, ví dụ, paraben, clorobutanol, axit phenol sorbic, và các chất tương tự. Cũng có thể bổ sung cả các chất đăng trương, như đường, clorua natri, và các chất tương tự vào các chế phẩm. Ngoài ra, sự hấp thụ kéo dài của dạng thuốc tiêm có thể có được bằng cách bổ sung các chất trì hoãn sự hấp thụ như monostearat nhôm và gelatin.

Các chất mang dược dụng bao gồm các dung dịch nước cất hoặc các chất gây phân tán và các bột vô trùng để chuẩn bị nhanh các dung dịch tiêm hoặc bột rắc vô trùng. Việc sử dụng các môi trường và các chất như vậy cho các chất hoạt tính dược là đã biết trong lĩnh vực này. Trừ trường hợp môi trường hoặc chất bất kỳ nào không tương hợp với hợp chất hoạt tính, việc sử dụng chúng trong các chế phẩm dược theo sáng chế đều được. Các hợp chất hoạt tính bổ sung cũng có thể được kết hợp vào các chế phẩm này.

Các chế phẩm trị liệu thường phải vô trùng và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Chế phẩm có thể được tạo công thức làm dung dịch, nhũ tương, liposom, hoặc cấu trúc được sắp xếp khác phù hợp với nồng độ thuốc cao. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường gây phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và các chất tương tự), và các hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất bao như lexitin, bằng cách duy trì kích thước hạt được yêu cầu trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt.

Các dung dịch tiêm vô trùng có thể được chuẩn bị bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính với lượng theo yêu cầu trong một dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp các thành phần được liệt kê ở trên, theo yêu cầu, tiếp theo là khử trùng bằng vi lọc. Nói chung, các dạng phân tán được chuẩn bị bằng cách

kết hợp hợp chất hoạt tính vào chất mang vô trùng có chứa môi trường bazơ gây phân tán và các thành phần được yêu cầu khác từ các chất được liệt kê ở trên. Trong trường hợp là bột vô trùng để chuẩn bị các dung dịch tiêm vô trùng, các phương pháp chuẩn bị được ưu tiên là sấy chân không và làm khô bằng đông lạnh (đông khô) để thu được bột của thành phần hoạt tính với bất kỳ thành phần bổ sung mong muốn nào từ dung dịch của nó đã được lọc vô trùng trước đó.

Lượng thành phần hoạt tính mà có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, và đường dùng cụ thể. Lượng thành phần hoạt tính mà có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ chủ yếu là lượng chế phẩm mà tạo ra hiệu quả điều trị. Nói chung, trong một trăm phần trăm thì lượng này sẽ nằm trong từ khoảng 0,01% đến khoảng 99% thành phần hoạt tính, tốt hơn là từ khoảng 0,1% đến khoảng 70%, tốt nhất là từ khoảng 1% đến khoảng 30% thành phần hoạt tính kết hợp với chất mang dược dụng.

Các chế độ liều dùng được điều chỉnh để có được đáp ứng mong muốn tốt nhất (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, liều cao duy nhất có thể được dùng, một số liều được chia nhỏ có thể được dùng theo thời gian hoặc liều này có thể tăng hoặc giảm tỷ lệ theo chỉ định phụ thuộc vào tình trạng khẩn cấp và tình trạng điều trị. Đặc biệt tốt khi tạo công thức dùng ngoài đường tiêu hóa các chế phẩm ở các dạng đơn vị liều để có thể dễ uống và dễ dùng và đồng nhất về liều dùng. Dạng đơn vị liều như được sử dụng ở đây là chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý phù hợp làm liều đơn vị cho các đối tượng được điều trị; mỗi đơn vị chứa một lượng xác định hợp chất hoạt tính được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn kết hợp với chất mang dược dụng được yêu cầu. Chỉ định đối với các dạng đơn vị liều theo sáng chế được quyết định bởi và trực tiếp phụ thuộc vào (a) các đặc tính độc đáo của hợp chất hoạt tính và hiệu quả điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các giới hạn trong kỹ thuật

điều chỉnh hợp chất hoạt tính để điều trị cho các cá thể.

Để dùng phân tử kháng thể, liều nằm trong từ khoảng 0.0001 đến 100mg/kg, và thường là từ 0,01 đến 5mg/kg trọng lượng cơ thể đối tượng. Ví dụ các liều có thể là 0,3mg/kg trọng lượng cơ thể, 1mg/kg trọng lượng cơ thể, 3mg/kg trọng lượng cơ thể, 5mg/kg trọng lượng cơ thể, 10mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 20mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc nằm trong khoảng 1-20mg/kg. Một chế độ điều trị điển hình là dùng một lần một tuần, một lần mỗi hai tuần, một lần mỗi ba tuần, một lần mỗi bốn tuần, một lần một tháng, một lần mỗi ba tháng hoặc một lần mỗi ba đến sáu tháng, hoặc dùng với khoảng cách ngắn khi bắt đầu (chẳng hạn như một lần một tuần đến một lần mỗi ba tuần), và sau đó kéo dài khoảng cách hơn (chẳng hạn như một lần một tháng đến một lần mỗi ba đến sáu tháng).

Theo cách khác, kháng thể có thể được sử dụng theo công thức giải phóng kéo dài, trong trường hợp này cần sử dụng thuốc với tần suất ít hơn. Liều và tần suất sử dụng phụ thuộc vào thời gian bán rã của kháng thể trong người bệnh. Nói chung, các kháng thể của người cho thấy có thời gian bán rã dài nhất, tiếp theo là các kháng thể nhân bản hóa, các kháng thể khảm, và các kháng thể không phải của người. Liều và tần suất dùng có thể thay đổi phụ thuộc vào điều trị phòng bệnh hay chữa bệnh. Để phòng bệnh, liều tương đối thấp được dùng với các quãng thời gian tương đối không thường xuyên và trong thời gian dài. Một số người bệnh tiếp tục nhận điều trị suốt đời. Để chữa bệnh, đôi khi cần dùng liều tương đối lớn với các quãng thời gian dùng tương đối ngắn cho tới khi tiến triển bệnh được giảm hoặc hết hẳn, và tốt hơn là cho tới khi người bệnh cho thấy có sự cải thiện một phần hoặc hoàn toàn các triệu chứng bệnh. Sau đó, người bệnh có thể được cho dùng theo chế độ phòng bệnh.

Lượng liều thực tế của các thành phần hoạt tính trong các chế phẩm dược theo sáng chế có thể được thay đổi sao cho thu được lượng thành phần hoạt

tính mà có tác dụng để đạt được đáp ứng điều trị mong muốn đối với một người bệnh, chế phẩm, và đường dùng cụ thể, mà không gây độc cho người bệnh. Lượng liều được lựa chọn sẽ phụ thuộc vào các yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của các chế phẩm cụ thể theo sáng chế được sử dụng, hoặc este, muối hoặc amit của chúng, cách dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể được dùng, thời gian điều trị, các thuốc, hợp chất và/hoặc nguyên liệu khác được sử dụng kết hợp với các chế phẩm cụ thể của sáng chế được sử dụng, tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng sức khỏe nói chung và lịch sử y tế của người bệnh được điều trị, và các yếu tố tượng tự khác được biết trong lĩnh vực y tế.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" của phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế tốt hơn dẫn đến việc giảm tình trạng nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, tăng tần suất và các khoảng thời gian của các giai đoạn không bị triệu chứng bệnh, hoặc phòng ngừa được sự suy giảm hoặc hậu quả do ảnh hưởng của bệnh. Ví dụ, để điều trị các khối u liên quan PDL1, "lượng có hiệu quả điều trị" tốt hơn ức chế được sự phát triển của tế bào hoặc sự phát triển khối u ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 20%, tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 40%, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 60%, và còn tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 80% so với đối tượng không được điều trị. Khả năng ức chế sự phát triển khối u có thể được đánh giá theo hệ mô hình động vật cho tiên đoán các khối u của người. Theo cách khác, tính chất này của chế phẩm theo sáng chế có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng hợp chất ức chế được sự phát triển của tế bào khối u; ức chế này có thể được xác định in vitro bằng các xét nghiệm đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Lượng có hiệu quả điều trị của một hợp chất điều trị có thể làm giảm kích thước khối u, hoặc nói cách khác là làm giảm nhẹ các triệu chứng bệnh ở đối tượng. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể xác định được các lượng như vậy dựa vào các yếu tố như kích thước đối tượng,

mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng ở đối tượng, và chế phẩm cụ thể hoặc đường dùng cụ thể được lựa chọn.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua một hoặc nhiều đường dùng, sử dụng một hoặc nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng đường dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Các đường dùng được ưu tiên đối với các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế bao gồm tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm trong da, tiêm nội màng, tiêm dưới da, tiêm tủy sống hoặc các đường dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ "dùng ngoài đường tiêu hóa" như được sử dụng ở đây có nghĩa là đường dùng không phải theo đường ruột hoặc cục bộ, thông thường là bằng cách tiêm và truyền, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tĩnh mạch, bắp, động mạch, túi mật, nội tạng, nội mạc tử cung, trong tim, trong da, nội màng, xuyên khí quản, dưới da, dưới biểu bì, nội soi, dưới bao, dưới nách, chọc tủy sống, ngoài màng cứng và xương ức.

Theo cách khác, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường không ngoài ruột, chẳng hạn như cục bộ, da hoặc màng nhày, ví dụ, xịt/nhỏ mũi, uống, đặt âm đạo, đặt hậu môn, ngậm dưới lưỡi hoặc bôi cục bộ.

Các hợp chất hoạt tính này có thể được chuẩn bị cùng với các chất mang mà sẽ ngăn các hợp chất này không giải phóng nhanh, như công thức giải phóng có kiểm soát, bao gồm các vật cấy, các miếng dán da, và các hệ truyền vi nang mềm. Các polyme có thể phân hủy sinh học và tương thích sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, các polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, các polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp chuẩn bị các công thức này đã được cấp patent hoặc nói chung là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Tham khảo, ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed.,

Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Các chế phẩm điều trị có thể được sử dụng cùng với các thiết bị y tế đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, trong phương án được ưu tiên, chế phẩm điều trị theo sáng chế có thể được sử dụng với thiết bị tiêm dưới da không kim, như các thiết bị đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; hoặc 4,596,556. Ví dụ về các vật cấy và các mô đun đã biết hữu dụng cho sáng chế bao gồm: patent Mỹ số 4,487,603 bộc lộ bơm truyền cỡ micro có thể cấy vào cơ thể được để phân tán thuốc với tốc độ được kiểm soát; Patent Mỹ số 4,486, 194, bộc lộ thiết bị điều trị để đưa thuốc vào qua da; Patent Mỹ số 4,447,233 bộc lộ bơm truyền thuốc để đưa thuốc vào với tốc độ truyền chính xác; Patent Mỹ số 4,447,224 bộc lộ thiết bị truyền có thể cấy được vào cơ thể với tốc độ truyền có thể thay đổi để truyền thuốc liên tục; Patent Mỹ số 4,439,196 bộc lộ hệ truyền thuốc thẩm thấu có nhiều ngăn; và Patent Mỹ số 4,475,196 bộc lộ một hệ truyền thuốc thẩm thấu. Các patent này được kết hợp ở đây để tham khảo. Các vật cấy, hệ truyền và mô đun khác là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Theo các phương án cụ thể, các phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được tạo công thức để đảm bảo được sự phân bổ thích hợp in vivo. Ví dụ, hàng rào máu não (blood-brain barrier - BBB) ngăn được nhiều hợp chất có tính ưa nước cao. Để đảm bảo rằng các hợp chất điều trị theo sáng chế đi qua được BBB (nếu muốn), chúng có thể được tạo công thức, ví dụ, trong các liposom. Đối với các phương pháp sản xuất liposom, tham khảo, ví dụ, các Patent Mỹ số 4,522,811; 5,374,548; và 5,399,331. Các liposom này có thể bao gồm một hoặc nhiều nửa phân tử mà được vận chuyển có chọn lọc vào các tế bào hoặc các cơ quan đặc hiệu, nhờ vậy làm tăng được sự phân phối thuốc theo đích (tham khảo, ví dụ, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Các nửa phân tử hướng đích ví dụ bao gồm folat hoặc biotin (tham

khảo, ví dụ, U.S. Patent 5,416,016, Low và các đồng tác giả); các mannoside (Umezawa và các đồng tác giả, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038): các kháng thể (P.G. Bloeman và các đồng tác giả (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais và các đồng tác giả (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); thụ thể proten A hoạt động bề mặt (Briscoe và các đồng tác giả (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); pl20 (Schreier và các đồng tác giả (1994) J Biol. Chem. 269:9090): tham khảo thêm K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; Jj. Killion; LJ. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Ngăn ngừa và điều trị các bệnh

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết với PDL1, axit nucleic, tế bào vật chủ, và chế phẩm dược theo sáng chế để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh có liên quan đến PDL1, cũng như các phương pháp tương ứng. Các bệnh có liên quan đến PDL1 mà có thể được ngăn ngừa và/hoặc được điều trị bằng phân tử gắn kết với PDL1 theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết như sau.

Ung thư

Việc chặn PDLl bằng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể nâng cao đáp ứng miễn dịch đối với các tế bào ung thư ở người bệnh. PDL1 không được biểu hiện ở các tế bào của người bình thường, nhưng lại có rất nhiều trong tế bào của nhiều người bị ung thư (Dong và các đồng tác giả (2002) Nat Med 8:787-9). Tương tác giữa PD-1 và PDLl dẫn đến việc làm giảm các tế bào lympho thâm nhập vào khối u, và giảm sự tăng sinh có trung gian là thụ thể tế bào T, và không còn miễn dịch ở các tế bào ung thư (Dong và các đồng tác giả (2003) JMoI Med 81:281-7; Blank và các đồng tác giả (2004) Cancer

Immunol. Immunother. [epub]; Konishi và các đồng tác giả (2004) Clin. Cancer Res.10:5094-100). Ức chế miễn dịch có thể được đảo ngược bằng cách chặn sự tương tác cục bộ giữa PDL1 và PD-1 và hiệu quả được bổ sung khi tương tác giữa PD-L2 và PD-1 cũng được chặn (Iwai và các đồng tác giả (2002) PNAS 99:12293-7; Brown và các đồng tác giả (2003) J. Immunol. JTO: 1257-66). Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được sử dụng riêng để ức chế sự phát triển của các khối u ung thư. Theo cách khác, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các chất tạo miễn dịch khác, các điều trị ung thư tiêu chuẩn, hoặc các kháng thể khác, như được mô tả dưới đây.

Do vậy, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư ở đối tượng, bao gồm cho đối tượng dùng một lượng có hiệu quả điều trị của phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế để ức chế được sự phát triển của các tế bào khối u trong đối tượng.

Các ung thư được ưu tiên mà sự phát triển của chúng có thể được ức chế bằng cách sử dụng các kháng thể theo sáng chế bao gồm các ung thư thường đáp ứng với điều trị miễn dịch. Ví dụ không giới hạn về các ung thư được ưu tiên để điều trị bao gồm ung thư phổi, ung thư buồng trứng, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, u hắc tố (ví dụ, u hắc tố ác tính di căn), ung thư thận, ung thư bàng quang, ung thư vú, ung thư gan, u lympho, ung thư máu, ung thư đầu và cổ, u thần kinh đệm, ung thư dạ dày, ung thư mũi họng, ung thư thanh quản, ung thư cổ tử cung, ung thư biểu mô, ung thư xương tạo xương. Ví dụ về các loại ung thư khác được điều trị sử dụng các phương pháp theo sáng chế bao gồm ung thư xương, ung thư tụy, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư da, ung thư đầu hoặc cổ, u hắc tố ác tính da hoặc mắt, ung thư tử cung, ung thư hậu môn, ung thư tinh hoàn, ung thư ống dẫn trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư âm đạo, ung thư âm hộ, ung thư Hodgkin, u lympho không Hodgkin, ung thư thực quản, ung thư ruột non, ung thư hệ nội

tiết, ung thư tuyến giáp, ung thư tuyến cận giáp, ung thư tuyến thượng thận, saccôm mô mềm, ung thư niệu đạo, ung thư dương vật, các bệnh bạch cầu mãn tính hoặc ác tính bao gồm bệnh bạch cầu ác tính do tủy, bệnh bạch cầu mãn tính do tủy, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho ác tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, các khối u cứng ở trẻ, u lympho tế bào lympho, ung thư bàng quang, ung thư thận hoặc niệu đạo, ung thư xương chậu thận, mô ung thư hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), u lympho CNS nguyên phát, sự hình thành mạch khối u, khối u cột sống, u thần kinh đệm thân não, ung thư tuyến yên, saccôm Kaposi, ung thư biểu bì, tế bào ung thư vảy nến, u lympho tế bào T, các ung thư do môi trường bao gồm các ung thư do amiang, và tổ hợp các loại ung thư này. Sáng chế cũng hữu dụng để điều trị các ung thư di căn, đặc biệt là các ung thư di căn mà biểu hiện PDL1 (Iwai etal. (2005) Int. Immunol.17:133-144).

Tùy chọn, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được kết hợp với một chất tạo miễn dịch, như các tế bào ung thư, các kháng nguyên khối u đã được làm sạch (bao gồm các protein tái tổ hợp, các peptit, và các phân tử cacbonhydrat), các tế bào, và các tế bào được truyền nhiễm các gen mã hóa các cytokin kích thích miễn dịch (He và các đồng tác giả (2004) J. Immunol.173:4919-28). Ví dụ không giới hạn về các vacxin khối u mà có thể được sử dụng bao gồm các peptit của các kháng nguyên u hắc tố, như các peptit của các kháng nguyên gp100, MAGE, Trp-2, MARTl và/hoặc tyrosinaza, hoặc các tế bào khối u được truyền nhiễm để biểu hiện cytokin GM-CSF.

Ở người, một số khối u đã cho thấy là tạo miễn dịch như các u hắc tố. Người ta dự đoán rằng bằng cách tăng ngưỡng kích hoạt của tế bào T bằng cách chặn PDL1 bằng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế, thì có thể kích hoạt được các đáp ứng khối u trong vật chủ. Việc chặn PDL1 (như kháng thể PDL1, ví dụ, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế) có vẻ hiệu quả nhất khi

được kết hợp với một quy trình tiêm chủng. Nhiều chiến lược thực nghiệm tiêm chủng chống khối u đã được đưa ra (tham khảo Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vacxins, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; tham khảo thêm Restifo, N. và Sznol, M., Cancer Vacxins, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. etal. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition). Trong một trong số các chiến lược này, vacxin được chuẩn bị sử dụng các tế bào khối u cùng nguồn hoặc khác nguồn. Các vacxin tế bào này đã cho thấy là có hiệu quả nhất khi các tế bào khối u được truyền tính trạng để biểu hiện GM-CSF. GM-CSF đã được chứng minh là chất hoạt hóa tiềm năng kháng nguyên đối với việc tiêm vacxin khối (Dranoff và các đồng tác giả (1993) Proc. Natl. Acad. Sd U.S.A. 90: 3539-43).

Nghiên cứu về biểu hiện gen và các mô hình biểu hiện gen ở quy mô lớn trong nhiều khối u đã dẫn tới việc định nghĩa cái gọi là các kháng nguyên đặc hiệu khối u (Rosenberg, SA (1999) Immunity 10: 281-7). Trong nhiều trường hợp, các kháng nguyên đặc hiệu khối u này là các kháng nguyên phân biệt được biểu hiện trong các khối u và trong tế bào mà từ đó khối u này phát sinh, ví dụ các kháng nguyên tế bào melanin gp100, các kháng nguyên MAGE, và Trp-2. Quan trọng hơn, nhiều kháng nguyên này có thể được chỉ ra là là các đích của các tế bào T đặc hiệu khối u được tìm thấy trong vật chủ. Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các protein tái tổ hợp và/hoặc các peptit được biểu hiện trong khối u để tạo ra đáp ứng miễn dịch cho các protein này. Các protein này thường được hệ miễn dịch xem là các tự kháng nguyên và do đó dung nạp được chúng. Kháng nguyên khối u còn có thể bao gồm telomeraza protein, mà cần cho việc tổng hợp các telome của các nhiễm sắc thể và được biểu hiện trong hơn 85% các ung thư ở người

và chỉ mới một số ít là các mô xôma (Kim, N và các đồng tác giả (1994) Science 266: 2011-2013). Kháng nguyên khối u còn có thể là "các kháng nguyên mới " được biểu hiện trong các tế bào ung thư do các biến đổi xôma làm thay đổi trình tự protein hoặc tạo ra các protein dung hợp giữa hai trình tự không liên quan (nghĩa là bcr-abl trong nhiễm sắc thể Philadelphia).

Các vacxin khối u khác có thể bao gồm các protein từ các virut liên qua đến các ung thư ở người như các virut gây u nhú ở người (Human Papilloma Viruses - HPV), các virut gây viêm gan (Hepatitis Virus – HV) (HBV và HCV) và virut xacôm mụn rộp Kaposi (Kaposi's Mụn rộp Sarcoma Virus - KHSV). Một dạng khác của kháng nguyên đặc hiệu khối u mà có thể được sử dụng kết hợp với chất chặn PDL1 (như kháng thể PDL1, ví dụ, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế) là các protein được làm sạch bằng sốc nhiệt (heat shock protein - HSP) được tách ra từ chính mô của khối u. Các protein sốc nhiệt này chứa các mảnh của các protein từ các tế bào khối u và các HSP này có hiệu quả cao khi phân phối đến các tế bào biểu hiện kháng nguyên để tạo ra miễn dịch khối u (Suot, R & Srivastava, P (1995) Science 269:1585-1588; Tamura, Y. và các đồng tác giả (1997) Science 278:117-120).

Các tế bào đuôi gai (dendritic cell - DC) là các tế bào biểu hiện kháng nguyên tiềm năng mà có thể được sử dụng cho đáp ứng kháng nguyên đặc hiệu nguyên phát. Các DC có thể được tạo ra ex vivo và được nạp cùng với nhiều các nguyên protein và peptit cùng dịch chiết tế bào khối u (Nestle, F. và các đồng tác giả (1998) Nature Medicine 4: 328-332). Các DC còn có thể được truyền tính trạng bằng kỹ thuật gen để cũng biểu hiện các kháng nguyên khối u này. Các DC còn được dung nạp trực tiếp vào các tế bào khối u cho các mục đích tạo miễn dịch (Kugler, A. và các đồng tác giả (2000) Nature Medicine 6:332-336). Như một phương pháp tiêm chủng, DC tạo miễn dịch có thể được kết hợp hiệu quả với chất chặn PDL1 (như PDL1 kháng thể, ví dụ, phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế) để kích hoạt hiệu quả hơn các đáp

ứng kháng khối u tiềm năng.

CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy – Liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào T chứa thụ thể kháng nguyên dạng khảm) là một liệu pháp tế bào khác để điều trị các khối u. Các tế bào T chứa thụ thể kháng nguyên dạng khảm (các tế bào CAR-T) là các tế bào T từ người bệnh mà đã được truyền nhiễm theo liệu pháp tế bào protein dạng khảm của phần phân tử gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng kháng nguyên khối u được gắn với chuỗi CD3-ζ hoặc phần nội bào của FcεRIγ để biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khảm (Chimeric Antigen Receptor - CAR). Đồng thời, trình tự phát tín hiệu cùng kích thích có thể được đưa vào để làm tăng hoạt tính độc tế bào, tăng sinh và khả năng sống của các tế bào T, và thúc đẩy sự giải phóng các cytokin. Sau khi lập trình lại, các tế bào T từ người bệnh được nhân lên in vitro để tạo ra một lượng lớn các tế bào CAR-T đặc hiệu khối u mà sau đó được truyền dung nạp trở lại vào người bệnh để điều trị khối u. Chất chặn PDL1 (như các kháng thể PDL1, ví dụ, phân tử gắn kết với PDL1 theo sáng chế) có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp tế bào CAR-T để kích hoạt đáp ứng kháng khối u mạnh hơn.

Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế còn có thể được kết hợp với các điều trị ung thư tiêu chuẩn. Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được kết hợp hiệu quả với các chế độ hóa trị. Trong những trường hợp như vậy, có thể giảm liều chất hóa trị được dùng (Mokyr, M. và các đồng tác giả (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Ví dụ về kết hợp như vậy là kháng thể kháng PDLl kết hợp với decarbazin để điều trị u hắc tố. Một ví dụ khác về kết hợp này là kháng thể kháng PDLl kết hợp với interleukin-2 (IL-2) để điều trị u hắc tố. Lý do khoa học đằng sau việc sử dụng kết hợp phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế và hóa trị là do sự chết của tế bào, mà là hậu quả của việc gây độc tế bào của hầu hết các hợp chất hóa trị, cần dẫn đến việc tăng được mức độ kháng nguyên khối u trong đường biểu hiện kháng nguyên. Các

điều trị kết hợp khác mà có thể dẫn đến hiệu quả hiệp đồng với chất chặn PDL1 qua sự chết tế bào là xạ trị, phẫu thuật, và làm mất hoocmon. Mỗi cách này tạo ra một nguồn kháng nguyên khối u trong vật chủ. Các chất ức chế sự hình thành mạch còn có thể được kết hợp với phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế. Việc ức chế sự hình thành mạch khiến cho tế bào khối u chết, mà có thể đưa kháng nguyên khối u vào các đường biểu hiện kháng nguyên ở vật chủ.

Phân tử gắn kết với PDL1 theo sáng chế còn có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng kháng nguyên đặc hiệu khối u khác. Kháng thể kháng kháng nguyên đặc hiệu khối u khác bao gồm nhưng không giới hạn ở kháng thể kháng EGFR, kháng thể biến thể kháng EGFR, kháng thể kháng VEGFa, kháng thể kháng HER2, hoặc kháng thể kháng CMET. Tốt hơn là, kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

Phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế còn có thể được sử dụng kết hợp với các kháng thể hai đặc hiệu mà nhắm đích tế bào thể biểu hiện thụ thể Fc alpha hoặc Fc gamma đến các tế bào khối u (tham khảo, ví dụ, các patent Mỹ số 5,922,845 và 5,837,243). Các kháng thể hai đặc hiệu có thể được sử dụng để nhắm đích vào hai kháng nguyên riêng. Ví dụ các kháng thể hai đặc hiệu thụ thể kháng Fc/kháng nguyên kháng khối u (ví dụ, Her-2/neu) đã được sử dụng để nhắm đích các thể đại thực khuẩn tới các vị trí của khối u. Việc nhắm đích này có thể hoạt hóa hiệu quả hơn các đáp ứng đặc hiệu khối u. Các tế bào T trong các đáp ứng này sẽ được làm tăng bằng cách sử dụng chất chặn PDL1. Theo cách khác, kháng nguyên có thể được đưa trực tiếp đến các DC bằng cách sử dụng các kháng thể hai đặc hiệu mà gắn vào kháng nguyên khối u và chất đánh dấu bề mặt tế bào đặc hiệu tế bào đuôi gai.

Các khối u tránh được sự giám sát miễn dịch của vật chủ bằng nhiều cơ chế khác nhau. Các cơ chế này có thể khắc phục được bằng cách làm bất hoạt các protein mà được biểu hiện bằng các khối u và có tính ức chế miễn dịch. Chúng bao gồm TGF-beta (Kehrl, J. etal. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-

1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) Immunology Today 13: 198-200), và phối tử Fas (Hahne, M. và các đồng tác giả (1996) Science 274: 1363-1365). Các kháng thể đối với mỗi thực thể này có thể được sử dụng kết hợp với phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế để kháng các ảnh hưởng của chất chặn ức chế miễn dịch và các đáp ứng miễn dịch ở vật chủ.

Các kháng thể khác mà có thể được sử dụng để kích hoạt đáp ứng miễn dịch ở vật chủ có thể được sử dụng kết hợp với chất kháng PDL1. Các kháng thể này bao gồm các phân tử trên bề mặt các tế bào đuôi gai mà kích hoạt chức năng DC và sự có mặt của kháng nguyên. Các kháng thể kháng CD40 có thể thay thế hiệu quả cho hoạt tính hỗ trợ tế bào T (Ridge, J. và các đồng tác giả (1998) Nature 393: 474-478) và có thể được sử dụng kết hợp với phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế (Ito, N. và các đồng tác giả (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40). Việc kích hoạt các kháng thể đối với các phân tử kích thích tế bào T như OX-40 (Weinberg, A. và các đồng tác giả (2000) Immunol Jj34: 2160- 2169), 4-1BB (Melero, I. và các đồng tác giả (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997), và ICOS (Hutloff, A. và các đồng tác giả (1999) Nature 397: 262-266) cũng như các kháng thể mà chặn hoạt tính của các tế bào của các phân tử kích thích âm như CTLA-4 (ví dụ, patent Mỹ số 5,811,097) hoặc BTLA (Watanabe, N. và các đồng tác giả (2003) Nat Immunol 4:670-9), B7-H4 (Sica, GL và các đồng tác giả (2003) Immunity 18:849-61) còn có thể được đề xuất để tăng mức kích hoạt của tế bào T.

Hiện nay, công nghệ cấy ghép tủy xương đang được sử dụng để điều trị các khối có nguồn gốc từ sự tạo thành mạch máu (nguồn gốc tạo máu). Trong khi có các trường hợp cơ thể chủ đào thải bộ phận cấy ghép, thì phương pháp điều trị này vẫn mang lại lợi ích khi có thể thu được các đáp ứng tích cực của cơ thể chủ đối với bộ phận cấy ghép. Chặn PDL1 có thể được sử dụng để tăng tác dụng của các tế bào T đặc hiệu khối u được cấy ghép. Cũng có nhiều phác đồ điều trị thử nghiệm tham gia vào quá trình hoạt hóa và tăng hiệu quả các tế bào T đặc hiệu

kháng nguyên ex vivo, và cấy ghép các tế bào này vào cơ thể người nhận để các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên kháng khối u (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) Science 285: 546-51). Các phương pháp này còn có thể được sử dụng để kích hoạt các đáp ứng của các tế bào T đối với các tác nhân lây nhiễm như CMV. Quy trình hoạt hóa ex vivo với sự có mặt của phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế có thể được kỳ vọng là làm tăng hoạt tính và tần suất hoạt động của các tế bào T được cấy ghép.

Các bệnh truyền nhiễm

Các phương pháp của sáng chế được sử dụng để điều trị những bệnh nhân đã phơi nhiễm với các độc tố hoặc mầm bệnh cụ thể. Theo đó, một khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm ở đối tượng bao gồm cho đối tượng này dùng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế, nhờ vậy đối tượng được điều trị bệnh truyền nhiễm.

Tương tự như ứng dụng đối với các khối u như được mô tả ở trên, chặn PDL1 có thể được sử dụng riêng hoặc như một chất bổ trợ, kết hợp với các vacxin, để kích thích đáp ứng miễn dịch đối với các mầm bệnh, các độc tốt và các kháng nguyên. Ví dụ về các mầm bệnh mà hiện nay chưa có các vacxin hiệu quả, hoặc các mầm bệnh mà các vacxin thông thường ít có hiệu quả. Các mầm bệnh này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, HTV, viêm gan (A, B, & C), cúm, mụn rộp, nhiễm trùng đường ruột do nhiễm ký sinh trùng Giardia, sốt rét, bệnh do nhiễm ký sinh trùng Leishmania, Staphylococcus aureus, Pseudomonas Aeruginosa. Việc chặn PDL1 đặc biệt hữu dụng kháng các bệnh nhiễm trùng do các tác nhân như HIV, là các tác nhân biểu thị các kháng nguyên đã bị thay đổi trong suốt quá trình nhiễm trùng. Các epitop mới này được nhận diện như những vật lạ tại thời điểm dùng PD- Ll kháng người, do đó kích thích đáp ứng tế bào T mạnh mà không làm giảm các tín hiệu âm tính qua PDL1.

Một số ví dụ về các virut mầm bệnh gây ra các bệnh nhiễm trùng mà có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm HIV, viêm gan (A, B, hoặc C), virut gây mụm rộp (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, và CMV, virut Epstein Barr), adenovirus, virut cúm, virut gây sốt vàng da, virut gây bệnh đường tiêu hóa echovirus, virut gây cảm lạnh rhinovirus, virut coxsackie, virut gây hội chứng hô hấp Trung Đông cornovirus, virut hợp bào hô hấp, virut gây bệnh quai bị, virut gây tiêu chảy cấp rotavirus, virut gây bệnh sởi, virut gây bệnh rubella, virut parvo, virut gây bệnh đậu mùa, virut gây u lympho tế bào T (Human T -cell Lymphotropic Virus – HTLV), virut gây sốt dengue, virut gây u nhú ở người, virut gây mụn cóc nước, virut gây bại liệt, virut gây bệnh dại, virut JC (John Cunningham) và virut gây viêm não lây truyền qua các động vật chân khớp.

Một số ví dụ về các vi khuẩn mầm bệnh gây ra các bệnh nhiễm trùng mà có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm vi khuẩn lây qua đường tình dục chlamydia, vi khuẩn gây bệnh rickettsia, mycobacteria, tụ cầu khuẩn staphylococci, liên cầu khuẩn streptococci, phế cầu khuẩn pneumonococci, viêm màng não cầu khuẩn meningococci và vi khuẩn gây bệnh lậu conococci, trực khuẩn klebsiella, vi khuẩn đường ruột proteus, trực khuẩn serratia, vi khuẩn pseudomonas, vi khuẩn legionella, vi khuẩn diphtheria, vi khuẩn salmonella, vi khuẩn bacilli, vi khuẩn cholera, vi khuẩn tetanus, vi khuẩn botulism, vi khuẩn anthrax, vi khuẩn plague, vi khuẩn leptospirosis, và vi khuẩn gây bệnh Lyme.

Một số ví dụ về các nấm mầm bệnh gây ra các bệnh nhiễm trùng mà có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm các nấm Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, v.v.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger, v.v.), Genus Mucorales (mucor, absidia, rhizophus), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis và Histoplasma

capsulatum.

Một số ví dụ về các ký sinh trùng mầm bệnh gây ra các bệnh nhiễm trùng mà có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lambia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Ký sinh trùng sốt rét vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi, Nippostrongylus brasiliensis.

Trong tất cả các phương pháp nói trên, chặn PDL1 có thể được kết hợp với các dạng điều trị miễn dịch khác như điều trị cytokin (ví dụ, các interferon, GM-CSF, G-CSF, IL-2), hoặc điều trị kháng thể hai đặc hiệu, mà làm tăng được tác dụng của các kháng nguyên khối u (tham khảo, ví dụ, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. ScL USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

Các phản ứng tự miễn

Các kháng thể kháng PDL1 có thể kích thích khuyếch đại các đáp ứng tự miễn. Do đó, có thể xem xét việc sử dụng chặn kháng PDL1 kết hợp với chính các protein để thiết kế nên các phác đồ tiêm chủng tạo ra một cách hiệu quả các đáp ứng miễn dịch kháng chính các protein này để điều trị bệnh.

Ví dụ, bệnh Alzheimer liên quan đến sự tích tụ không thích hợp của peptid Aβ ở dạng cặn lắng amyloid trong não; các đáp ứng kháng thể kháng amyloid có thể làm sạch các cặn lắng amyloid này (Schenk et ah, (1999) Nature 400: 173-177). Các protein khác còn có thể được sử dụng làm các đích như IgE để điều trị dị ứng và hen, và TNFa để điều trị viêm khớp dạng thấp. Cuối cùng, các đáp ứng kháng thể đối với các hoocmon khác nhau có thể được gây ra bằng cách sử dụng kháng thể kháng PDL1. Sự trung hòa các đáp ứng kháng thể đối với các hoocmon sinh sản có thể được sử dụng để tránh

thai. Việc trung hòa đáp ứng kháng thể đối với các hoocmon và các yếu tố hòa tan khác cần cho sự phát triển của các khối u cụ thể còn có thể được coi là các đích tiêm chủng có khả năng.

Các phương pháp tương tự như đã được mô tả ở trên đối với việc sử dụng kháng thể kháng PDL1 có thể được sử dụng để tạo ra các đáp ứng tự miễn cho mục đích điều trị để điều trị các bệnh nhân bị tích tụ không thích hợp của tự kháng nguyên khác, như cặn lắng amyloid, bao gồm Aβ ở bệnh Alzheimer, các cytokin như TNFa, và IgE.

Các bệnh viêm mãn tính

Các kháng thể kháng PDL1 còn có thể được sử dụng để điều trị các bệnh như các bệnh viêm mãn tính, như li ken phẳng, bệnh viêm màng nhày da mãn tính liên quan đến tế bào T (Youngnak-Piboonratanakit và các đồng tác giả (2004) Immunol Letters 94:215-22). Do đó, theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất phương pháp chữa bệnh viêm mãn tính gây ra bởi các tế bào T, bao gồm cho đối tượng này dùng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế.

Chất phụ trợ vacxin

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế làm chất phụ trợ vacxin. Các kháng thể kháng PDL1 có thể được sử dụng để kích thích các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên bằng cách sử dụng kết hợp kháng thể kháng PDL1 với một kháng nguyên cần quan tâm (ví dụ, vacxin).

Do đó, theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên trong đối tượng, bao gồm cho đối tượng này dùng: (i) kháng nguyên; và (ii) phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế, để đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên này trong đối tượng được

nâng cao. Kháng nguyên này có thể là, ví dụ, kháng nguyên kháng khối u, kháng nguyên virut, kháng nguyên vi khuẩn hoặc kháng nguyên từ mầm bệnh. Ví dụ không giới hạn về các kháng nguyên như vậy bao gồm các kháng nguyên đã được nêu ở phần trên, như các kháng nguyên kháng khối u (hoặc các vacxin kháng khối u) đã được nêu ở trên, hoặc các kháng nguyên từ các virut, vi khuẩn hoặc các mầm bệnh khác đã được mô tả ở trên.

Bộ sản phẩm

Cũng trong phạm vi sáng chế là các bộ sản phẩm bao gồm phân tử gắn kết PDL1, thể liên kết miễn dịch hoặc chế phẩm dược theo sáng chế và các hướng dẫn sử dụng của chúng. Bộ sản phẩm này còn có thể bao gồm ít nhất một chất bổ sung, hoặc một hoặc nhiều phân tử gắn kết PDL1 theo sáng chế (ví dụ, các phân tử gắn kết mà gắn vào các epitope khác trong PDL1). Các bộ sản phẩm thông thường có nhãn hướng dẫn cách sử dụng các thành phần trong bộ sản phẩm. Thuật ngữ nhãn bao gồm bất kỳ văn bản, hay vật liệu được ghi nào được cung cấp trên hoặc cùng với bộ sản phẩm, hoặc đi kèm với bộ sản phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ sau đây, nhưng phạm vi của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ cụ thể này theo bất kỳ cách hiểu nào.

Ví dụ 1: Sàng lọc kháng thể đơn miền chuỗi nặng kháng PDL1

1.1 Xây dựng thư viện

Protein dung hợp PDL1-Fc (SEQ ID NO:28) để tạo miễn dịch được biểu

hiện bằng các tế bào CHO (pCDNA4, Invitrogen，Cat V86220), được làm sạch bằng sắc ký ái lực Protein A. Một lạc đà hai bướu được chọn để tạo miễn dịch. Sau 4 lần tạo miễn dịch, các lympho bào được tách ra từ 100ml máu ngoại vi của lạc đà, và chiết tách toàn bộ RNA bộ sản phẩm chiết tách RNA (QIAGEN). RNA thu được được phiên mã ngược thành cDNA sử dụng bộ Super-Script III FIRST STRANDSUPERMIX theo các hướng dẫn.

Các mảnh axit nucleic mã hóa các kháng thể chuỗi nặng được khuếch đại bằng phản ứng khuếch đại gen/phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase Chain Reaction – RCR) lồng:

Vòng thứ nhất PCR:

Đoạn mồi trước：GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC (SEQ ID NO:29)
;

Đoạn mồi sau：GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC (SEQ ID NO:30).

Vòng thứ hai PCR:

Các sản phẩm PCR từ vòng thứ nhất PCR làm mẫu,

Đoạn mồi trước：GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG (SEQ ID NO:31);

Đoạn mồi sau: GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT (SEQ ID NO:32).

Các mảnh nucleic kháng thể đơn miền của chuỗi nặng đích được khôi phục và được nhân dòng vào vectơ hiện thị thể thực khuẩn pCDisplay-3 (Creative Biolabs，Cat：VPT4023) sử dụng endonucleaza PstI và NotI (từ NEB). Sau đó, các sản phẩm này được điện di vào tế bào TG1 *E.coli* tiềm năng, và thư viện hiện thị thể thực khuẩn cho các kháng thể đơn miền chuỗi nặng kháng lại PDL1 được

tạo cấu trúc và được xác định. Bằng cách dàn mỏng các dịch pha loãng, xác định được dung lượng thư viện là 1.33×10^8. Để xác định tỷ lệ chèn của thư viện, lựa chọn ngẫu nhiên 24 dòng vô tính để làm PCR ruột kết. Các kết quả cho thấy tỷ lệ chèn là 100%.

1.2 Sàng lọc kháng thể đơn miền chuỗi nặng kháng PDL1

Các đĩa nhiều lỗ được phủ protein dung hợp PDL1-Fc, 10µg/lỗ, 4°C qua đêm. Ngày hôm sau, sau khi được chặn bằng sữa tách bơ 1% ở nhiệt độ phòng trong thời gian 2 giờ, bổ sung 100µl thể thực khuẩn (8×10^{11}tfu, từ thư viện hiện thị thể thực khuẩn đối với kháng thể đơn miền chuỗi nặng của lạc đà được xây dựng trong bước 1.1), nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Sau đó, các thể thực khuẩn không gắn vào được loại ra bằng cách rửa 5 lần với PBST (tween 20 in phosphate buffer solution – PBST) (0,05% tween 20 trong dung dịch đệm phosphate). Các thể thực khuẩn gắn đặc hiệu vào PDL1 được tách ra bằng trietylammonium (100mM), và được sử dụng để gây nhiễm *E.coli* TG1 của giai đoạn logarit, tạo ra các thể thực khuẩn mà sau đó được làm sạch ở vòng sàng lọc tiếp theo. Lặp lại vòng sàng lọc như vậy thêm 3-4 lần nữa. Bằng cách đó, khuẩn lạc dương tính được làm giàu, đạt được mục đích chọn lọc được các kháng thể đặc hiệu PDL1 từ thư viện kháng thể bằng công nghệ hiển thị thực khuẩn

1.3 Chọn lọc đặc hiệu các thể thực khuẩn dương tính riêng bằng kỹ thuật chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym (enzym-linked Immunosorbent Assays - ELISA)

Các thể thực khuẩn dương tính gắn kết PDL1 thu được sau 3-4 vòng sàng lọc được sử dụng để gây nhiễm *E.coli* trống và phết đĩa. Chọn ngẫu nhiên 96 khuẩn lạc đơn để nuôi cấy, và các thể thực khuẩn được tạo ra được làm sạch tương ứng. Các đĩa được phủ protein dung hợp PDL1-Fc ở 4°C qua đêm; bổ sung các thể thực khuẩn mẫu đã thu được vào (các thể thực khuẩn trống làm đối chứng) và được ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Kháng thể sơ cấp, kháng thể gắn nhãn HA kháng chuột (Beijing Kangwei Shiji Biotech. Ltd.), được bổ sung vào sau các lần rửa và được ủ ở nhiệt độ phòng, 1 giờ cho quá trình phản ứng. Kháng

thể thứ cấp, kháng thể phosphataza kiềm gắn nhãn goat kháng-mouse (Amyject Scientific Ltd.) được bổ sung vào sau các lần rửa và được ủ ở nhiệt độ phòng, 1 giờ cho quá trình phản ứng. Dung dịch sắc tố phosphataza kiềm được bổ sung vào sau các lần rửa, và giá trị hấp thụ được đọc ở bước song 405nm. Khi OD của lỗ mẫu cao hơn 3 lần so với OD của các lỗ đối chứng, mẫu được xác định là dương tính. Vi khuẩn trong các lỗ dương tính được chuyển tới và nuôi cấy trong môi trường lỏng LD được bổ sung Ampicillin 100ug/ml để chiết tách plasmit và tạo trình tự sau đó.

Các trình tự proten của mỗi khuẩn lạc được phân tích phần mềm so sánh trình tự Vectơ NTI. Các khuẩn lạc có cùng các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 được coi là cùng một kháng thể, trong khi các khuẩn lạc có các trình tự CDR khác nhau được coi là các kháng thể khác nhau.

Ví dụ 2 Đánh giá sơ bộ về các kháng thể đơn miền chuỗi nặng kháng PDL1

2.1 Biểu hiện của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng trong *E.coli* và quy trình làm sạch chúng

Trình tự mã hóa của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng thu được bằng cách phân tích trình tự được tạo dòng phụ vào vectơ biểu hiện PET32b (Novagen, product number: 69016-3) và plasmit tái tổ hợp chính xác được biến đổi vào chủng vật chủ biểu hiện BL1 (DE3) (Tiangen Biotech, CB105-02), được phủ lên môi trường cứng LB chứa ampicillin 100mg/ml qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Các khuẩn lạc đơn được tiêm nhiễm và nuôi qua đêm, được truyền vào ngày hôm sau để nhân lên ở nhiệt độ 37°C bằng cách lắc. Khi môi trường nuôi cấy đạt đến giá trị OD bằng 0,6-1, bổ sung thêm 0,5mM IPTG vào tạo cảm ứng, 28°C qua đêm kèm lắc. Ngày hôm sau, vi khuẩn được thu hoạch bằng ly tâm, và được làm tan để thu được dịch chiết kháng thể thô. Sau đó, sử dụng phương pháp sắc ký ion niken để làm sạch các protein kháng thể, thu được các protein kháng thể có độ

tinh khiết cao hơn 90%.

2.2 Gắn kết đặc hiệu của kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 vào protein PDL1 người

Các đĩa được phủ bằng protein dung hợp PDL1-Fc qua đêm ở nhiệt độ 4°C và bổ sung 100ng kháng thể đơn miền chuỗi nặng thu được trong Ví dụ 2.1 (đối chứng là kháng thể đơn miền không gắn kết với protein PDL1-Fc) vào mỗi lỗ và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, kháng thể gắn nhãn His kháng kháng thể sơ cấp (được mua của Beijing Kangwei Century Biotechnology Co., Ltd.) được bổ sung vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, kháng thể gắn nhãn peroxidaza rau cải ngựa chuột kháng dê sơ cấp (Yiqiao Shenzhou, Cat: SSA007200) được bổ sung vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, chất sắc tố được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm.

Các đĩa được phủ bằng Fc protein qua đêm ở nhiệt độ 4°C và 100ng của kháng thể đơn miền chuỗi nặng thu được trong Ví dụ 2.1 được bổ sung vào mỗi lỗ (đối chứng là kháng thể đơn miền kháng các đích không liên quan khác) và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, kháng thể Fc kháng-thỏ kháng-người (được mua từ Shanghai Pu Xin Biotechnology Co., Ltd.) được bổ sung vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, kháng thể gắn nhãn peroxidaza rau cải ngựa kháng-thỏ kháng-dê (được mua từ Shanghai Pu Xin Biotechnology Co., Ltd.) được bổ sung vào và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi rửa, chất sắc tố được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm.

Kháng thể ứng viên được coi là gắn kết với protein PDL1-Fc khi tỷ số giữa giá trị OD đối với protein PDL1-Fc và giá trị OD đối với đối chứng là lớn hơn hoặc bằng 4; và đồng thời, kháng thể trên có khả năng gắn kết với protein kháng

nguyên PDL1-Fc, khi tỷ số giữa giá trị OD cho gắn kết với PDL1-Fc và giá trị OD cho gắn kết protein Fc là lớn hơn hoặc bằng 5, được coi là gắn kết đặc hiệu vào phần PDL1 hơn là vào phần Fc.

Các kết quả này cho thấy kháng thể số 56 gắn kết đặc hiệu vào PDL1 mà không gắn kế vào Fc. Các kết quả đặc hiệu này được ghi trong Bảng 1:

Bảng 1

	OD (kháng PDL1)	OD (kháng Fc)	OD (PDL1/Fc)	OD (PDL1/trống)	SEQ ID NO
PDL1-56 dAb	2,931	0,068	43,10294118	54,27777778	28
trống	0,054	0,072	0,75	1	

2.3 Sự gắn kết của kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 vào protein PDL1 chuột

Protein PDL1-Fc chuột (SEQ ID NO: 33) thu được bằng cách biểu hiện trong các tế bào HEK293 (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220).

Các đĩa được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bằng protein dung hợp PDLl-Fc của chuột, 0,5ug/lỗ và bổ sung 100ng kháng thể đơn miền chuỗi nặng thu được trong Ví dụ 2.1 (nhóm đối chứng là kháng thể đơn miền kháng đích không liên quan) và để phản ứng ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa, kháng thể gắn nhãn His kháng kháng thể sơ cấp được bổ sung vào và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi rửa, kháng thể gắn nhãn peroxidaza rau cải ngựa chuột kháng dê được bổ sung vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, chất sắc tố được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm. Các kết quả được ghi trong Bảng 2.

Bảng 2

	OD (kháng PDL1 chuột)
PDL1-56 dAb	0,075
trống	0,096

Có thể thấy rằng kháng thể đơn miền chuỗi nặng của PDL1 người theo sáng chế không gắn kết vào protein PDL1-Fc chuột.

2.4 Kiểm tra hiệu quả chặn của kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 lên tương tác PD-1 và PDL1 bằng ELISA cạnh tranh

Thu protein PDL1-Fc và protein PD1-Fc (SEQ ID NO: 34) bằng cách biểu hiện trong các tế bào HEK293 (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220). Thu được protein PD1-Fc-Biotin biotin hóa sử dụng bộ Thermo Biotinlytion.

Các đĩa được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bằng protein dung hợp PDLl-Fc, 0,5ug/lỗ, tiếp theo bổ sung 100ng kháng thể đơn miền chuỗi nặng thu được trong Ví dụ 2.1 (các đối chứng là các kháng thể đơn miền kháng các đích không liên quan khác hoặc đơn giản là đệm) và bổ sung 10μg PD1-Fc-Biotin (không bổ sung kháng thể hoặc protein vào nhóm trống, mà chỉ bổ sung cùng một lượng đệm vào), và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Bổ sung SA-HRP (được mua từ Sigma) vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi bổ sung dung dịch sắc tố, đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm. Khi tỷ số giữa giá trị OD mẫu và giá trị OD đối chứng nhỏ hơn 0,8, kháng thể này được coi là có hiệu quả chặn.

Như được chỉ ra trong Bảng 3, kháng thể số 56 thể hiện hiệu quả chặn tương tác PD-1/PDL1.

Bảng 3

	OD
Đối chứng 1	2,335
Đối chứng 2	2,413
trống	0,079
PDL1-56	0,129

2.5 Hiệu quả chặn của kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 lên tương tác PDL1 và PD-1 trên bề mặt tế bào kiểm tra bằng FACS

Thu các tế bào HEK293 biểu hiện tạm thời protein PDL1 người trên màng (các tế bào 293-PDL1) bằng cách chuyển nhiễm nhanh plasmit mang PDL1 người đầy đủ đoạn gen (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220) vào các tế bào HEK293 người.

Thu hoạch các tế bào 293-PDL1, được tạo huyền phù lại trong đệm PBS-BSA 0,5% trong đĩa 96 lỗ, và bổ sung các kháng thể trên để được phát hiện. Các đối chứng âm tính cũng được đặt cùng lúc, và các đối chứng âm tính là 2ug kháng thể đơn miền kháng đích khác. Bổ sung 0,3µg hPD-1-Fc-biotin và eBioscience SA-PE vào tất cả các mẫu, và tiến hành phân tích tế bào theo dòng chảy sau khi đã nhuộm màu. Kháng thể được coi là chặn được tương tác bề mặt tế bào giữa PDL1 và PD-1 nếu giá trị phát sáng được chuyển sang hướng trống như được so với nhóm không có kháng thể. Theo cách này, xác định được các kháng thể chặn được gắn kết của PDL1 kháng nguyên vào PD-1 trên bề mặt tế bào.

Các kết quả được thể hiện trong Figure 1, kháng thể số 56 thể hiện hiệu quả chặn đối với tương tác PD-1/PDL1.

2.6 Các đường cong gắn kết của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 vào protein kháng nguyên PDL1

Các đĩa được phủ bằng kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1, 0,5µg/lỗ qua đêm ở nhiệt độ 4°C, tiếp theo bổ sung loạt protein dung hợp PDL1-Fc loãng dần và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, kháng thể gắn thẻ peroxidaza cải ngựa Fc-IgG dê kháng người được bổ sung vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, dung dịch phát triển màu peroxidaza của rau họ cải được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm. SotfMax Pro v5.4 được sử dụng để xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ để dựng được đường cong gắn kết của kháng thể vào PDL1 và giá trị EC50 (khoảng 5ng/ml) thông qua việc khớp bốn tham số. Các kết quả được thể hiện trong Figure

2.

2.7 Các đường cong chặn của các kháng thể đơn miền chuỗi nặng PDL1 lên tương tác giữa PD-1 và PDL1

Các đĩa được phủ bằng protein dung hợp PDLl-Fc, 0,5ug/lỗ qua đêm ở nhiệt độ 4°C, tiếp theo bổ sung loạt 100uL dung dịch loãng dần (chứa PD1-Fc- Biotin 100ug/mL), protein dung hợp Fc của kháng thể đơn dòng chặn PDL1 100uL mỗi lỗ, để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Bổ sung SA-HRP (được mua từ Sigma) vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi bổ sung dung dịch sắc tố, đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm.

SotfMax Pro v5.4 được sử dụng để xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ để thu được đường cong chặn và giá trị IC50 của kháng thể số 56 đối với tương tác PDL1/PD-1 thông qua việc khớp bốn tham số (IC50 cho kháng thể số 56 là 143ng/mL). Các kết quả được thể hiện trong Figure 3.

Ví dụ 3 Nhân bản hóa các kháng thể đơn miền PDL1

Nhân bản hóa được thực hiện bằng phương pháp nhân bản hóa axit amin trên bề mặt protein (tái tạo bề mặt) và phương pháp ghép khuân phổ quát để nhân bản hóa VHH (ghép CDR vào khuân phổ quát).

Các bước nhân bản hóa như sau: Tiến hành tạo mô hình tương đồng của kháng thể số 56 sử dụng phần mềm tạo mô hình Modeller9. Trình tự tương đồng tham khảo là kháng thể NbBcII10 (PDB code: 3DWT), và khả năng tiếp cận dung môi tương đối của các axit amin được tính toán theo cấu trúc ba chiều của protein. Nếu một trong số các axit amin của kháng thể số 56 được tiếp xúc với dung môi, nó được thay thế bằng axit amin ở cùng vị trí của trình tự DP-47 của kháng thể tham chiếu của người, cho đến khi tất cả các thay thế được hoàn thành.

Các bước cụ thể của phương pháp ghép khung phổ quát để nhân bản hóa VHH là như sau: Trước tiên, h-NbBcII10FGLA (PDB code: 3EAK) khung VHH được nhân bản hóa phổ quát được thiết kế bởi Cécile Vincke và các đồng tác giả dựa vào sự tương đồng về trình tự, khung này được thiết kế dựa vào Nanobody NbBcII10 (PDB code: 3DWT); việc nhân bản hóa axit amin trên bề mặt protein được thực hiện với sự tham khảo kháng thể DP-47 người, và một phần các axit amin FGLA của khung trình tự VHH 2 được sửa đổi. Chúng tôi sử dụng trực tiếp h-NbBcII10FGLA làm khung và thay thế CDRs bằng các vùng CDR của kháng thể số 56 để đạt được việc nhân bản hóa kháng thể.

Kháng thể số 56 được nhân bản hóa, và thu được năm biến thể nhân bản hóa của kháng thể số 56. Bảng 4 liệt kê số các SEQ ID trong số các biến thể được nhân bản hóa cũng như các thay đổi axit amin của chúng, với số gốc axit amin để sau số Kabat. Figure 4 cho thấy sự giống đôi của các trình tự đã được nhân bản hóa.

Bảng 4

		K2 7F	M2 8T	S2 9F	E4 4G	R4 5L	Q7 1R	N7 2D	A7 4S	S7 6N	K8 3R	P8 4A	M8 9V
Hu56V1 (SEQ ID NO:2)	√						√	√	√	√	√	√	√
Hu56V2 (SEQ ID NO:3)	√	√	√	√			√	√	√	√	√	√	√
Hu56V3 (SEQ ID NO:4)	√				√	√	√	√	√	√	√	√	√
Hu56V4 (SEQ ID NO:5)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Hu56V5 (SEQ ID NO:6)	√						√	√	√	√		√	√

Ví dụ 4 Chuẩn bị protein kháng thể chặn PDL1 sử dụng các tế bào động vật có vú

4.1 Chuẩn bị protein dung hợp Fc của kháng thể đơn miền PDL1

Thu được trình tự axit amin của vùng IgGl-Fc người (SEQ ID NO: 7) dựa vào trình tự axit amin có vùng không đổi của globulin miễn dịch của người gamma1 (IgGl) từ cơ sở dữ liệu protein Uniprot (P01857). Mảnh axit amin mã hóa IgG1-Fc người thu được từ tổng RNA của PBMC người bằng cách sao chép ngược PCR, và mảnh axit nucleic mã hóa protein dung hợp của kháng thể đơn miền PDL1 thu được trong Ví dụ trên và Fc thu được bằng cách chồng PCR, sau đó được nhân bản phụ vào vectơ pCDNA4 (Invitrogen, Cat V86220). Các trình tự vùng Fc, như SEQ ID NO: 8 hoặc 9, mà trong đó hoạt tính ADCC hoặc hoạt tính CDC được loại ra bằng phát sinh đột biến tại chỗ, cũng có thể được sử dụng.

Plasmit của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền tái tổ hợp được truyền nhiễm vào các tế bào HEK293 để biểu hiện kháng thể. Các plasmit biểu hiệu tái tổ hợp được pha loãng với môi trường Freestyle 293 và được bổ sung vào dung dịch PEI (polyetylenimin) để tạo biến đổi. Mỗi plasmit/hỗn hợp PEI được bổ sung vào huyền phù tế bào HEK293 và được ủ ở 37°C và 10% CO_2 với tốc độ quay 90 vòng/phút. Cùng lúc, 50μg/L IGF-1 được bổ sung vào. Bốn giờ sau, bổ sung môi trường EX293, 2mM glutamin và 50μg/L IGF-1, nuôi cấy ở điều kiện tốc độ 135vòng/phút. Sau 24 giờ, 3,8mM VPA được bổ sung vào. Sau khi nuôi cấy được từ 5 đến 6 ngày, thu dịch nổi biểu hiện tạm thời và làm sạch bằng sắc ký ái lực Protein A để thu được protein dung hợp Fc- kháng thể đơn miền PDL1.

Các trình tự của các protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 như thu được được thể hiện trong SEQ ID NO: 10-27.

4.2 Chuẩn bị các kháng thể PDL1 từ MedImmune LLC và Roche

Gen của kháng thể kháng PDL1 từ MedImmune LLC, Inc. được nhân bản

bằng phương pháp 2.14H9 như được bộc lộ trong đơn sáng chế Mỹ số US20130034559 và được nhân bản vào vectơ pCDNA4. TM004 là kháng thể kháng PDL1 của Roche. Gen kháng thể này được nhân bản theo YW243.55.S70.hIgG như được bộc lộ trong đơn sáng chế Mỹ số US20130045201 A1, và được nhân bản vào vectơ pCDNA4.

Plasmit tái tổ hợp này được truyền nhiễm nhanh vào các tế bào HEK293 bằng cùng phương pháp như trong Ví dụ 4.1, và kháng thể kháng PDL1 thu mua từ MedImmune LLC được đặt tên là 2.41H90P; kháng thể kháng PDL1 của Roche được đặt tên là 243.55.

4.3 So sánh của biểu hiện của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 và hai kháng thể PDL1 đã biết

Sử dụng cùng hệ biểu hiện và các điều kiện chuyển nhiễm nhanh, mức độ biểu hiện của Fc protein dung hợp của PDL1 kháng thể đơn miền theo sáng chế là cao hơn 200 mg/L, trong khi mức độ biểu hiện của kháng thể 2.41H90P là khoảng 80 mg/L và mức độ biểu hiện của kháng thể 243.55 là khoảng 40mg/L. Kết quả này chỉ ra rằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 theo sáng chế ổn định hơn về cấu trúc và có thể đạt được mức biểu hiện cao hơn so với hai kháng thể PDL1 đã biết.

Ví dụ 5 Xác định tính chất của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1

5.1 Khả năng gắn kết của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 vào PDL1 (bằng ELISA)

Protein PDL1-Chis (SEQ ID NO: 35) thu được bằng cách biểu hiện tạm thời trong HEK293 và làm sạch bằng sắc ký ái lực cột niken. Các đĩa được phủ bằng protein PDL1-Chis thu được, 0,5μg/lỗ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, bổ sung từ từ protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 thu được trong Ví dụ trên

và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, kháng thể gắn thẻ peroxidaza của cải xanh Fc-IgG kháng người của dê được bổ sung vào và để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, chất sắc tố được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm. SotfMax Pro v5.4 được sử dụng để xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ, thông qua việc khớp bốn thông số, để thu được đường cong gắn kết và giá trị EC50 của kháng thể đối với PDL1 (tất cả các giá trị EC50 thử nghiệm là khoảng 150ng/mL) để phản ánh ái lực đối với PDL1.

Các kết quả được thể hiện trong Figure 5, trong đó trục dọc là OD405 và trục ngang là nồng độ của Protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 (ng/mL); các hình tam giác ngược, hình tam giác và hình vuông đại diện cho ba dạng khác nhau được nhân bản hóa của các protein dung hợp Fc: hu56v1-Fc, hu56v2-Fc, hu56v5-Fc. Ba protein này có ái lực có thể so được với PDL1.

5.2 Xác định khả năng gắn kết của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 vào PDL1 (phương pháp SPR) và so sánh với các kháng thể đã biết

Các động học gắn kế của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 vào PDL1 tái tổ hợp của người thu được trong các Ví dụ trên được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SRP) sử dụng thiết bị BIAcore X100. PDL1-Fc tái tổ hợp của người được phủ trực tiếp lên chip vi sinh CM5 để thu được khoảng đơn vị đáp ứng 1000 (response unit - RU). Để đo động học, các kháng thể được pha loãng dần (từ 1,37 đến 1000nm) trong đệm HBS-EP + 1x (GE, cat # BR-1006-69) và được tiêm trong 120 giây ở nhiệt độ 25°C với thời gian phân ly là 30 phút, tái tạo lại bằng 10mM Glycine-HCl (pH 2,0) trong 120 giây. Các tốc độ gắn kết (kon) và phân ly (koff) được tính toán sử dụng mô hình gắn kết Languir một-một đơn giản (phần mềm đánh giá BIAcore phiên bản 3.2). Hằng số phân ly cân bằng (kD) được tính là tỷ số koff/kon.

Các giá trị ái lực gắn kế đo được của các kháng thể kháng PDL1 được ghi trong Bảng 5. Các kết quả này cho thấy ái lực của protein PDL1-56-Fc đối với protein PDL1 đích là cao hơn đáng kể so với hai kháng thể PDL1 đã biết trong lĩnh vực này, và các giá trị Ka cao hơn và Kd thấp hơn chỉ ra rằng protein dung hợp kháng thể có thể gắn vào kháng nguyên PDL1 nhanh hơn và nhờ vậy khó tách ra hơn, điều này cho thấy thêm rằng PDL1-56-Fc còn có vai trò như kháng thể chặn, với các tính chất tốt hơn hai kháng thể PDL1 đã biết.

Bảng 5

	Ka	**Kd**	**KD**
PDL1-56-Fc	1,796E+6	1,432E-5	7,975E-12
PDL1-hu56V2-Fc	2,123E+6	1,820E-5	8,573E-12
PDL1-56	3,323E+6	8,213E-4	2,472E-10
2,41H90P	7,949E+5	6,160E-5	7,750E-11
243,55	4,481E+5	6,055E-5	1,351E-10

5.3 Hiệu quả chặn của protein dung hợp Fc đơn miền PDL1 đối với tương tác PDL1-PD1 (bằng ELISA cạnh tranh)

Các đĩa được phủ bằng protein dung hợp PDL1-Fc, 0,5µg/lỗ qua đêm ở nhiệt độ 4°C, tiếp theo bổ sung loạt pha loãng dần (chứa 100ug/mL PD1-Fc-Biotin) protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 thu được trong Ví dụ trên, 100uL mỗi lỗ, để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, SA-HRP (được mua từ Sigma) được bổ sung vào và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi rửa, chất sắc tố được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm.

SotfMax Pro v5.4 được sử dụng để xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ, thông qua việc khớp bốn thông số, để thu được đường cong chặn và giá trị IC50 của kháng thể đối với PDL1-PD1. Các kết quả được ghi trong Figure 6, trong đó trục dọc là OD405 và trục ngang là nồng độ của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 (ng/mL); các hình tam giác ngược, hình tam giác và hình vuông đại diện cho ba dạng khác nhau được nhân bản hóa của các protein dung hợp Fc:

hu56v1-Fc, hu56v2-Fc, hu56v5-Fc. Ba protein này có khả năng chặn tương tác PDL1-PD1 tương tự nhau.

5.4 Hiệu quả chặn của protein dung hợp Fc đơn miền PDL1 lên tương tác PDL1-CD80 (bằng ELISA cạnh tranh)

Thu protein CD80-Fc (SEQ ID NO: 36) thu được từ các tế bào HEK293. Protein CD80-Fc-Biotin biotin hóa, sử dụng bộ Thermo Biotinlytion.

Các đĩa được phủ bằng protein dung hợp PDL1-Fc 0,5 μg/lỗ qua đêm ở nhiệt độ 4°C, tiếp theo bổ sung loạt pha loãng (chứa 300ug/mL CD80- Fc-Biotin) protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 thu được trong Ví dụ trên, 100uL mỗi lỗ, để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, SA-HRP (được mua từ Sigma) được bổ sung vào và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 giờ. Sau khi rửa, chất sắc tố được bổ sung vào và đọc giá trị hấp thụ ở bước sóng 405nm.

SotfMax Pro v5.4 được sử dụng để xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ, thông qua việc khớp bốn thông số, để thu được đường cong chặn và giá trị IC50 của kháng thể đối với PDL1-CD80. Các kết quả được ghi trong Figure 7, trong đó trục dọc là OD405 và trục ngang là nồng độ (ng/mL) của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 hu56V2-Fc. Các kết quả cho thấy rằng protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền chặn PDL1 hu56V2-Fc có thể chặn hiệu quả tương tác giữa PDL1 và CD80.

5.5 Hiệu quả chặn của protein dung hợp Fc đơn miền PDL1 lên tương tác PDL1-PD1 (bằng FACS)

Các tế bào HEK293 người biểu hiện tạm thời protein PDL1 của khỉ trên các màng bằng cách chuyển nhiễm tạm thời các plasmit chứa gen PDL1 của người với toàn bộ chiều dài.

PDI-muFc (SEQ ID NO: 39) ở nồng độ hoạt động là 2ug/ml được bổ sung vào mỗi nhóm theo phân nhóm $5x10^5$ tế bào/ống, và sau đó các nồng độ khác của KN035 được bổ sung vào mỗi nhóm. Sau khi ủ trên đá trong thời gian 30 phút và rửa ba lần, kháng thể chuột kháng dê gắn nhãn PE thứ cấp được bổ sung vào làm kháng thể phát hiện, và cường độ phát sáng được phát hiện bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy sau khi ủ trên đá trong thời gian 30 phút.

Phần mềm GraphPad Prism được sử dụng để xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ. Bằng cách khớp bốn thông số, thu được đường cong chặn và giá trị IC50 của kháng thể lên tương tác trực tiếp giữa PDL1 được biểu hiện trên màng tế bào 293 và PD1 có thể hòa tan. Các kết quả được thể hiện trong Figure 8, trong đó trục dọc là MFI và trục ngang là nồng độ (μg/mL) của protein dung hợp hu56V1-Fcm1 kháng thể đơn miền PDL1. Các kết quả cho thấy rằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 có thể chặn hiệu quả tương tác giữa PDL1 được biểu hiện lên màng tế bào 293 và PD1.

Plasmit chứa gen PD1 người với toàn bộ chiều dài được biến đổi và tích hợp vào dòng tế bào Jurket để thu được dòng tế bào Jurket biểu hiện ổn định protein PD1 người mà được đặt tên là Jurket-PD1.

Sau khi ủ các tế bào Jurkat-PD1 với protein PDL1-muFc (SEQ ID NO: 38) đã được biotin hóa (30ug/ml) trong thời gian 30 phút trên đá, bổ sung dần protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 hu56V1-Fcm1 vào, ủ trong thời gian 1 giờ trên đá, rửa ba lần bằng PBS, và sau đó bổ sung Streptavidin PE với tỷ lệ pha loãng 1: 250 vào, ủ trên đá trong thời gian 30 phút và rửa ba lần bằng PBS. Cường độ phát sáng được phát hiện bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy.

Xử lý dữ liệu và phân tích bản đồ được thực hiện sử dụng phần mềm GraphPad Prism. Các đường cong chặn và các giá trị IC50 của các kháng thể lên tương tác trực tiếp giữa Jurkat-PD1 và protein PDL1-muFc có thể hòa tan thu được bằng cách khớp bốn thông số. Các kết quả được thể hiện trong Figure 9, trong đó trục dọc là MFI và trục ngang là nồng độ (ug/mL) của protein dung hợp

hu56V1-Fcm1 PDL1 kháng thể đơn miền. Các kết quả cho thấy rằng protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền chặn PDL1 có thể chặn hiệu quả tương tác giữa Jurkat-PD1 và PDL1.

5.6 Tính gắn kết đặc hiệu của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 đối với protein PDL1

Các tế bào HEK293 người biểu hiện tạm thời protein PDL1 người lên các màng bằng cách chuyển nhiễm tạm thời plasmit mang các gen protein họ B7 của người với toàn bộ chiều dài (pCDNA4, Invitrogen, Cat V86220). Plasmit này cũng cho phép các đầu C của protein đích được dung nạp vào protein EGFP sao cho mức độ protein họ B7 được biểu hiện lên màng này có thể xác định được bằng cường độ phát sáng xanh. Các dòng tế bào chuyển nhiễm tạm thời được cấu trúc bao gồm 293-PDL1-EGFP, 293-PDL2-EGFP, 293-B7H3-EGFP và 293-B7H3-EGFP.

Các tế bào được cấu trúc được tạo huyền phù lại trong đệm PBS-BSA 0,5% và kháng thể hu56V2-Fc được bổ sung vào. Cùng lúc, đối chứng âm tính gồm 2µg kháng thể đơn miền kháng đích không liên quan khác được chuẩn bị và được ủ trên đá trong thời gian 20 phút. Sau khi rửa, kháng thể thứ cấp eBioscience kháng-hIg-PE được bổ sung vào, trên đá trong thời gian 20 phút. Sau khi rửa, các tế bào này được tạo huyền phù lại trong 500µl đệm PBS-BSA 0,5% và được phát hiện bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy.

Các kết quả được thể hiện trong Figure 10. Hàng trên chỉ nhóm đối chứng, hàng dưới chỉ các nhóm mẫu. Rõ ràng rằng kháng thể hu56V2-Fc gắn kết đặc hiệu chỉ với protein PDL1 người, mà không gắn kết với các protein họ B7 khác.

5.7 Gắn kết protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 vào protein PDL1 của khỉ

Các tế bào HEK293 người biểu hiện tạm thời protein PDL1 của khỉ (SEQ ID NO: 57) bằng cách chuyển nhiễm tạm thời các plasmit chứa gen PDL1 của khỉ với toàn bộ chiều dài. Plasmit này cũng cho phép đầu C của đích protein được dung nạp vào protein EGFP, mà cho phép đánh giá được các mức độ biểu hiện màng protein PDL1 của khỉ bằng cường độ phát sáng xanh.

Các tế bào được cấu trúc được tạo huyền phù lại trong đệm PBS-BSA 0,5%, kháng thể hu56V2-Fc được bổ sung vào và được ủ trên đá trong thời gian 20 phút. Sau khi rửa, kháng thể thứ cấp eBioscience kháng-hIg-PE được bổ sung vào, trên đá trong thời gian 20 phút. Sau khi rửa, các tế bào này được tạo huyền phù lại trong 500µl đệm PBS-BSA 0,5% và được phát hiện bằng cách phân tích tế bào theo dòng chảy.

Các kết quả được thể hiện trong Figure 11. Rõ ràng rằng kháng thể hu56V2-Fc gắn kết hiệu quả vào protein PDL1 của khỉ.

5.8 Protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 có thể xác định hiệu quả số lượng tế bào dương tính PDL1 lên các phần mô của người bệnh

Các phần mô khối u của các bệnh nhân ung thư phổi dương tính với PDL1 được nhuộm bằng kháng thể hu56V2-Fc 5 µg/mL làm kháng thể sơ cấp và được ủ qua đêm với kháng thể gắn nhãn HRP người-kháng-dê (Perkin-Elmer, Cat: NEF802001EA), sau đó được quan sát.

Các kết quả được thể hiện trong Figure 12. Kháng thể hu56V2-Fc có thể xác định một cách hiệu quả số lượng tế bào dương tính với PDL1 trên các phần mô của người bệnh ung thư phổi, và có thể đồng thời xác định các tế bào khối u dương tính với PDL1 và và các tế bào miễn dịch dương tính với PDL1.

5.9 Hoạt hóa PBMC bằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1

Các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) được tách ra từ máu ngoại vi của những người tặng khỏe mạnh bằng ly tâm gradient mật độ sử dụng dung dịch tách cho lympho bào của người (Tianjin Hao Yang).

Phủ kháng thể kháng CD3 2,5ug/mL và loạt pha loãng của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 hu56V2-Fc (còn được gọi là KN035 trong thí nghiệm) lên các đĩa nuôi cấy tế bào qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngày hôm sau, $1x10^5$ PBMCs được bổ sung vào mỗi lỗ. Sau khi ủ được 5 ngày, thu hoạch dịch nổi và xác định mức IFN-γ trong dịch nổi bằng bộ IFN-γ ELISA (ebioscience).

Các kết quả được thể hiện trong Figure 13. Có thể thấy rằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 được kết hợp với kháng thể kháng CD3 có thể làm tăng sự tiết ra γ-interferon từ các tế bào PBMC, nghĩa là, protein dung hợp Fc đơn miền PDL1 làm tăng sự hoạt hóa của các tế bào PBMC. Cùng lúc, hiệu quả kích hoạt phụ thuộc vào nồng độ.

5.10 Hoạt hóa của các tế bào T CD4 + bằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 trong phản ứng lymphoid được kết hợp tế bào T đuôi gai và sự sánh với kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC

Các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) được tách ra từ các tế bào máu trắng của máu ngoại vi từ những người cho khỏe mạnh bằng ly tâm gradient mật độ sử dụng dung dịch tách cho các lympho bào của người (Tianjin Hao Yang). Sau đó, chúng được ủ với môi trường RPMI 1640 không huyết thanh trong 1-2 giờ để loại các tế bào không dính và các tế bào được nuôi cấy trong RPMI chứa 10% FBS, 10ng/ml GM-CSF và 20ng/mL IL-4. Sau khi nuôi cấy được 5-6 ngày, 10ng/ml of TNF-α được bổ sung vào và được ủ trong 24 giờ để thu được các tế bào đuôi gai trưởng thành.

Các tế bào đuôi gai thu được bằng phương pháp này được tạo huyền phù lại

trong môi trường toàn RPMI, $2x10^5$ /ml. Sau đó, 50uL mỗi lỗ được bổ sung vào đĩa 96 lỗ đáy chữ U (Costar: 3799) và được nuôi cấy trong máy ủ.

Các tế bào T CD4+ được tách ra từ PBMC của một người cho khác sử dụng bộ tách hạt từ tính (Miltenyi Biotec: 130-096-533) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất.

$1x10^4$ tế bào đuôi gai và $1x10^5$ tế bào T CD4+ thu được bằng các phương pháp trên được trộn với nhau, được tạo huyền phù lại trong môi trường toàn RPMI và được bổ sung vào đĩa nuôi cấy 96 lỗ, và 50µl hỗn hợp tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ. 100µl mỗi lỗ hu56V2-Fc được pha loãng trong môi trường toàn RPMI được bổ sung vào đến nồng độ kháng thể cuối cùng là 0,1µg/ml hoặc 0µg/ml. Thu các dịch nổi sau 5-7 ngày nuôi cấy, và xác định mức IFN-γ trong dịch nổi bằng bộ IFN-γ ELISA (ebioscience).

Các kết quả được thể hiện trong Figure 14A. Có thể thấy rằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 có thể làm tăng sự tiết ra IFN-γ ở các tế bào T CD4+ trong phản ứng lympho bào hỗn hợp. Nghĩa là, Protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền chặn PDL1 làm tăng sự hoạt hóa của tế bào T.

Các PBMC từ các đối tượng 1 được nuôi cấy với 50ng/ml GM-CSF + 25ng/ml IL-4, và thu hoạch các DC 6 ngày sau trưởng thành với TNF-α (50ng/ml); Các tế bào T CD4+ được sắp xếp sử dụng bộ tách hạt từ tính (Miltenyi Biotec: 130-096-533); Các tế bào DC được bổ sung vào các đĩa 96 lỗ đáy chữ U với mật độ 10^4/lỗ và 10^5/lỗ, các tế bào T CD4+ được bổ sung sau 2-4 giờ; các nồng độ khác của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 hu56V1-Fcm1 hoặc kháng thể kháng PDL1 2.41H90P của MedImmune LLC được bổ sung vào các lỗ tương ứng; sau khi nuôi cấy được 5 ngày, xác định mức độ IFN-γ trong dịch nổi bằng bộ phát hiện IFN-γ ELISA (ebioscience).

Các kết quả được thể hiện trong Figure 14B, mà trong đó cột màu xám phản ánh sự kích thích tiết IFN-γ bởi protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1

và cột màu đen phản ánh kháng thể kháng PDL1 2.41H90P của MedImmune LLC. Protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 với các nồng độ cao có thể làm tăng khả năng của các tế bào T CD4+ tiết ra IFN-γ trong phản ứng lympho bào hỗn hợp, và khả năng của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 để kích hoạt các tế bào T là mạnh hơn một chút so với kháng thể kháng PDL1 2.41H90P của MedImmune LLC trong cùng nồng độ.

5.11 Kích thích tiết IL-2 của các tế bào T trong hệ môi trường nuôi cấy Jurkat / Raji-PDL1 hỗn hợp bằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 và so sánh với kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC

Chúng tôi đã xây dựng một hệ kích hoạt tế bào T, hệ hỗn hợp nuôi cấy Jurkat/Raji-PDL1, thử nghiệm tác dụng của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 lên sự hoạt hóa của tế bào T, mà đã được so sánh với kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC.

Hệ này sử dụng các tế bào Jurkat (các tế bào T) làm tế bào tác động và kháng thể CD3 kháng người làm tín hiệu đầu tiên để hoạt hóa các tế bào Jurkat. CD80 họ B7 trên bề mặt của các tế bào Raji-PDL1 mà được tạo ra về mặt di truyền và biểu hiện ổn định PDL1 người, đưa ra tín hiệu đồng kích thích thứ cấp để kích hoạt các tế bào Jurket, trong khi đó PDL1 được biểu hiện cao trên cùng bề mặt tế bào, hoạt động như một tác nhân điều chỉnh âm tính bằng cách gắn kết PD1 để ức chế sự hoạt hóa của tế bào Jurket.

Các nồng độ loãng của các protein kháng thể hu56V1-Fcm1 và 2.41H90P được chuẩn bị sử dụng 10% FBS+1640+150ng/ml kháng-CD3; các tế bào Jurkat và Raji-PDL1 được điều chỉnh nồng độ đến 3×10^6 tế bào/ml và $1,5\times10^6$ tế bào/ml, 50ul được bổ sung vào mỗi lỗ, được bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. 100ul dịch nổi nuôi cấy được lấy ra và được đo xác định biểu hiện của IL-2 bằng bộ đo chuyên dụng.

Figure 15 cho thấy trường hợp trong đó cột đen phản ánh mức độ kích thích tiết IL-2 bởi protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 và cột xám phản ánh kháng thể kháng PDL1 2.41H90P của MedImmune LLC. Protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 có thể làm tăng khả năng của các tế bào Jurkat để tiết ra IL-2 với nồng độ cao, và khả năng của chúng để kích hoạt các tế bào Jurkat là cao hơn một chút so với của kháng thể 2.41H90P của MedImmune LLC PDL1 ở cùng nồng độ.

5.12 Ái lực của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 đối với FcRn

Các protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền PDL1 biotin hóa hu56Vl-Fc, hu56V2-Fc, hu56Vl-Fcml và hu56V2-Fcml được pha loãng đến 10ug/ml và được làm bất động lên các SA biosensor. Protein FcRn người (RnD Systems Cat. No. 8639-FC) được pha loãng thành các nồng độ 200nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12,5nM. Tương tác được phát hiện sử dụng Octet K2 từ Fortebio Corporation, cùng với rắn hóa trong 100 giây, lưu hóa gắn kết trong 60 giây, phân tách trong 30 giây.

Bảng 6 cho thấy KD trung bình của các protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền PDL1 đối với FcRn là khoảng 5.1E-07M. Không có sự khác biệt đáng kể về ái lực giữa Fc (Fcm1) đột biến và Fc dạng hoang dã.

Bảng 6

	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
hu56V1-Fc	5,13E-07	1,95E+05	1,00E-01
hu56V2-Fc	5,05E-07	2,10E+05	1,06E-01
hu56V1-Fcm1	5,10E-07	1,89E+05	9,63E-02
hu56V2-Fcm1	5,10E-07	2,34E+05	1,19E-01

5.13 Hoạt tính CDC và ADCC của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 với Fc đột biến

Các PBMC được hoạt hóa bằng 300IU/ml IL-2 trong 24 giờ làm các tế bào tác động, với số lượng tế bào là 8×10^5 tế bào/lỗ; Raji-PDL1 biểu hiện ổn định protein PDL1 người được sử dụng làm các tế bào đích với số lượng tế bào là 2×10^5 các tế bào/lỗ; các nồng độ khác nhau của protein hu56V1-Fcm1 hoặc Rituxan làm đối chứng được bổ sung, và hoạt tính ADCC (%) ở mỗi nồng độ được đo sử dụng bộ phát hiện độc tính không phóng xạ CytoTox 96® sau khi ủ ở 37°C trong 6 giờ.

Figure 16A cho thấy hu56V1-Fcm1 không có hoạt tính ADCC đáng kể so với đối chứng Rituxan dương tính.

Các tế bào Raji-PDL1 được sử dụng làm các tế bào đích với số lượng tế bào là 2×10^4các tế bào/lỗ và 5% huyết thanh khỉ cynomolgus để cho các lần bổ sung, các nồng độ khác của hu56V1-Fcm1 và của đối chứng Rituxan dương tính được bổ sung, được nuôi cấy ở 37°C trong 2 giờ. Hoạt tính CDC của mẫu được phát hiện sử dụng CCK-8.

Figure 16B cho thấy hu56V1-Fcm1 không có hoạt tính CDC ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02ug/ml đến 20ug/ml, được so với đối chứng dương tính.

5.14 Hoạt tính ức chế của protein n dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 lên sự phát triển khối u

Chuột suy giảm miễn dịch do đái đường không do béo phì/kết hợp nặng với suy giảm miễn dịch (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency - NOD/SCID) được đưa vào nghiên cứu in vivo hoạt tính của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1, hu56V2-Fc mà có thể không nhận thấy ở PDL1 chuột. Mục đích của nghiên cứu này đạt được bằng các thí nghiệm mà trong đó chuột NOID/SCID được tiêm dưới da được cấy dòng tế bào u hắc tố biểu hiện PDL1 người A375 (ATCC, CRL-1619 ™) và các tế bào đơn nhân ngoại vi người (PBMC). A375 và PBMC được trộn ở tỷ lệ 5:1 trước khi tiêm và được tiêm dưới

da với tổng lượng là 100µl (chứa 5 triệu A375 và 1 triệu PBMC). Các kháng thể được dùng tiêm nội màng 24 giờ sau khi tiêm nhiễm khối u và sau đó một lần một tuần ở liều 0,3mg/kg; PBS đóng vai trò làm đối chứng âm tính. 4-6 chuột cho mỗi nhóm thử nghiệm. Sự hình thành khối u được quan sát hai lần một tuần và chiều dài và chiều rộng của các khối u được đo bằng thước kẹp. Thể tích khối u được tính toán và đường cong phát triển khối u được vẽ (xem Figue 17A). Có thể thấy rằng kháng thể hu56V2-Fc ở liều 0,3mg/kg ức chế đáng kể sự phát triển khối u.

Mô hình in vivo tương tự được sử dụng để kiểm tra protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1, hu56V1-Fcm1, mà không thấy có ở PDL1 chuột. Các A375 và PBMC người được tiêm nhiễm dưới da vào chuột NOD-SCID theo tỷ lệ 4:1. Bốn giờ sau, các liều khác nhau của hu56V1-Fcm1 (0,1; 0,3; 1; 3 và 10mg/kg) được dùng tiêm nội màng. Hiệu quả kháng khối u đối với các phôi ghép A375/PBMC người ở chuột NOD-SCID được nghiên cứu mỗi tuần sau khi dùng thuốc và trong 4 tuần. PBS được sử dụng làm đối chứng âm tính. 4-6 chuột cho mỗi nhóm thử nghiệm. Sự tạo thành khối u được quan sát cứ mỗi hai tuần và các kích thước dài và rộng của các khối u được đo sử dụng thước kẹp. Thể tích khối u được tính toán và đường cong phát triển khối u được vẽ (xem Figure 17B). Các kết quả cho thấy rằng tất cả các liều của hu56V1-Fcm1 (0,1-10mg/kg) đều có hiệu quả kháng khối u đáng kể lên các phôi ghép khác nguồn A375/PBMC người của chuột NOD-SCID, mà không có mối liên quan đáng kể đến liều dùng. Kháng thể hu56V1-Fcm1 ức chế đáng kể sự phát triển khối u thậm chí ngay cả ở liều 0,1mg/kg.

5.15 Hoạt tính ức chế lên sự phát triển khối u của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 được dùng vào các thời điểm khác nhau

Mô hình u ghép chuột NOD-SCID A375/PBMC người được sử dụng. A375 với các PBMC người ở tỷ lệ là 4:1 được tiêm dưới vào chuột NOD-SCID và

hu56V1-Fcm1 (0,3mg/kg) được tiêm nội màng 4 giờ sau đó, tiếp theo là tiêm nội màng một lần cứ mỗi ba ngày. Số lần dùng thuốc là 1, 2, 3, 4 lần. Sự hình thành khối u được quan sát mỗi ba ngày và các kích thước lớn và nhỏ của các khối u được đo bằng thước kẹp để tính thể tích khối u cho đến ngày thứ 33 kể từ ngày sử dụng thuốc đầu tiên. Đường cong phát triển khối u được vẽ (Figure 18). Các kết quả cho thấy rằng số lượng lần dùng thuốc khác nhau trong quá trình nghiên cứu đều có hiệu quả kháng khối u đáng kể trên các phôi ghép A375/PBMC người khác của chuột NOD-SCID.

5.16 Ức chế sự phát triển khối u bằng protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 và so sánh với kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC

Mục đích của nghiên cứu này đã đạt được bằng các thí nghiệm mà trong đó chuột NOD/SCID được tiêm dưới da cấy dòng tế bào u hắc tố biểu hiện PDL1 người A375 (ATCC, CRL-1619 ™) và các tế bào máu đơn nhân ngoại vi người (PBMC). A375 và PBMC được trộn với tỷ lệ 5:1 trước khi tiêm với tổng thể tích là 100µl (chứa 5 triệu A375 và 1 triệu PBMC). Các kháng thể được dùng tiêm nội màng trong 24 giờ sau khi gây nhiễm khối u và sau đó là một tuần một lần, ở liều là 1mg/kg. Nhóm điều trị bao gồm hu56V2-Fc (hu56 của người cho) và nhóm kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC (được chỉ định là 2.41) với PBS làm đối chứng âm tính. 4-6 chuột mỗi nhóm thử nghiệm. Sự tạo thành khối u được quan sát hai lần một tuần, và các kích thước lớn và nhỏ của các khối u được đo bằng thước kẹp. Thể tích khối u được tính toán và đường cong phát triển khối u được vẽ (xem Figure 19 A). Kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC không có hiệu quả đáng kể trong mô hình này và thể tích khối u vượt quá nhóm đối chứng vào ngày 35, do vậy việc sử dụng thuốc và đo khối u đã được dừng lại sau đó. Có thể thấy rằng hiệu quả của hu56V2-Fc trong ức chế sự phát triển khối u A375 ở liều 1mg/kg là lớn hơn đáng kể so với kháng thể kháng PDL1 2.41H90P của MedImmune LLC trong cùng mô hình này.

Vì các kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC không cho thấy có hiệu quả chặn khối u trong hệ nêu trên, có thể là sự kích hoạt PBMC trong hệ đã không đủ để ức chế sự phát triển tế bào khối u. Vì vậy, lượng PBMC trong hỗn hợp tế bào được tăng lên để kiểm tra lần nữa hiệu quả kháng khối u của kháng thể kháng PDL1 của MedImmune LLC.

Hỗn hợp A375 và PBMC 1: trước khi tiêm dưới da tổng thể tích 100µl (chứa 5 triệu A375 và 5 triệu PBMC) và kháng thể kháng PD-L1 của MedImmune LLC (2.41H90P) được dùng tiêm nội màng tiếp theo là sử dụng hàng tuần ở liều là 1mg/kg; PBS được sử dụng làm đối chứng âm tính. 4-6 chuột mỗi nhóm thử nghiệm. Sự hình thành khối u được quan sát hai lần một tuần và các kích thước lớn và nhỏ của các khối u được đo sử dụng thước kẹp. Thể tích khối u được tính toán và đường cong phát triển khối u được vẽ (xem Figure 19B). Có thể thấy rằng kháng thể kháng PDL1 từ MedImmune LLC cho thấy hiệu quả kháng khối u trong mô hình in vivo sau khi tăng tỷ lệ của PMBC.

Mức trung bình ức chế khối u (TGI = (1- thể tích khối của nhóm điều trị/ thể tích khối u của nhóm đối chứng) x 100%) ở ngày 42 của kháng thể được tính toán và trình bày trong Bảng 7 dưới đây:

Bảng 7

	TGI	
	hu56V2-Fc	2,41H90P
5:1	65,7%	N,A,
5:5	——	41,7%

Các kết quả thử nghiệm kháng khối u in vivo cho thấy các protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền chặn PDL1 theo sáng chế có tính vượt trội đáng kể so với các kháng thể chặn PDL1 đã biết (Kháng thể kháng PDL1 từ MedImmune LLC) trong mô hình lông u hắc tố A375 chuột không in vivo.

Ví dụ 6 Tính ổn định của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1

6.1 Khả năng chịu tác động kiềm và oxy hóa của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1

500 mM amoni bicacbonat được sử dụng làm tá nhân kiềm gây hư hại chất và các protein dung hợp được điều trị ở 37°C trong 38 giờ. 1% hydro peroxit được sử dụng làm chất oxy hóa, 8 giờ điều trị ở nhiệt độ phòng

Các thay đổi về hoạt tính sinh học của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 thu được theo các Ví dụ nêu trên trước và sau điều trị được đo sử dụng ELISA cạnh tranh. Như có thể thấy trong Figure 20, các điều trị kiềm và oxy hóa không gây ảnh hưởng đến hoạt tính của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 theo sáng chế, và hoạt tính của ELISA cạnh tranh sau 38 giờ điều trị kiềm là 103% so với thời điểm 0 giờ. Hoạt tính ELISA cạnh tranh ở thời điểm 8 giờ sau điều trị oxy hóa là 106% so với thời điểm 0 giờ.

6.2 Tính ổn định của protein dung hợp Fc-kháng thể đơn miền PDL1 ở nồng độ cao

Protein dung hợp Fc kháng thể đơn miền PDL1 được cô đặc bằng UF/DF được trao đổi vào đệm PBS. Và xu hướng hình thành kết tụ được kiểm tra bằng SE-HPLC.

Khi cô đặc đến 200 mg/mL, độ tinh khiết của protein dung hợp Fc đơn miền PDL1 là 96,8%, theo thiết bị phát hiện SE-HPLC. Các kết tụ tăng lên khoảng 2,4% so với ở các nồng độ thấp (-2mg/mL). Trong quá trình cô đặc, không xảy ra hiện tượng vẩn đục hoặc kết tụ trong dung dịch protein.

Danh sách trình tự

>SEQ ID NO:1 kháng thể No.56

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERER
VAKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISQNNAKSTVYLQMNSLKPEDTAMYY
CAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSS

>SEQ ID NO:2 Hu56V1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID NO:3 Hu56V2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID NO:4 Hu56V3

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID NO:5 Hu56V4

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSS

>SEQ ID NO:6 Hu56V5

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSS

> SEQ ID NO:7 IgG1-Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:8 IgG1-Fc-m1

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAGIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:9 IgG1-Fc-m2

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:10 56-Fc

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERER
VAKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISQNNAKSTVYLQMNSLKPEDTAMYY
CAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:11 Hu56V1-Fc

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:12 Hu56V2-Fc

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:13 Hu56V3-Fc

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:14 Hu56V4-Fc

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:15 Hu56V5-Fc

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:16 56-Fc-m1

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERER
VAKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISQNNAKSTVYLQMNSLKPEDTAMYY
CAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAGIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:17 Hu56V1-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
GIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:18 Hu56V2-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
GIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:19 Hu56V3-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE

VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
GIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:20 Hu56V4-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
GIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:21 Hu56V5-Fc-m1

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
GIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:22 56-Fc-m2

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERER
VAKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISQNNAKSTVYLQMNSLKPEDTAMYY
CAADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:23 Hu56V1-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA

ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:24 Hu56V2-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:25 Hu56V3-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:26 Hu56V4-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKGLERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

> SEQ ID NO:27 Hu56V5-Fc-m2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERV
AKLLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCA
ADSFEDPTCTLVTSSGAFQYWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:28 PDL1 người-Fc

TVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV
HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEV
IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREENLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDP
EENHTAELVIPELPLAHPPNERTDDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

>SEQ ID NO:29

GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC

>SEQ ID NO:30

GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

>SEQ ID NO:31

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

>SEQ ID NO:32

GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT

>SEQ ID NO:33 PDL1 chuột-Fc

FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQF
VAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCII

SYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIW
TNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQP
GQNHTAELIIPELPATHPPQNRTHDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

>SEQ ID NO:34 PD1 người-Fc

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR
MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND
SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:35 PDL1-Chis

TVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV
HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEV
IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREENLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDP
EENHTAELVIPELPLAHPPNERTDGSHHHHHHHH

>SEQ ID NO:36 CD80-Fc

VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDM
NIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHL
AEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELN
AINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWN
TTKQEHFPDNDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:37 PDL1 khỉ

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQF
VHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRC
MISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKA
EVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRL
DPEENHTAELVIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFIFYLRKGRM
MDMKKSGIRVTNSKKQRDTQLEET

>SEQ ID NO:38 PDL1 người-muFc

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQF
VHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRC
MISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKA
EVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRL
DPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTDIEGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPEVS
SVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQ
TQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK
TKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQP
AENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHN
HHTEKSLSHSPGK

>SEQ ID NO:39 PD1 người-muFc

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR
MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND
SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQI
EGRMDPKSSDKTHTCPPCPAPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVD
ISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWL
NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVS
LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNV
QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử gắn kết phối tử gây chết tế bào theo chương trình đã định 1 (PDL1), mà có thể gắn kết đặc hiệu vào PDL1 và bao gồm trình tự axit amin A-L-B, trong đó A đại diện cho miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch, L không có mặt hoặc đại diện cho mối liên kết axit amin, và B đại diện cho vùng Fc của globulin miễn dịch của người.

trong đó miền biến đổi đơn tính globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:1-6,

2. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch là vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người.

3. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó vùng Fc globulin miễn dịch được biến đổi để loại bỏ các hoạt tính ADCC và CDC.

4. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó trình tự của vùng Fc globulin miễn dịch được chọn từ các SEQ ID NO: 7-9.

5. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó mối liên kết là 1-20 axit amin theo chiều dài.

6. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó phân tử này bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 10-27.

7. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó phân tử này có ít nhất một trong số các đặc tính sau:

(a) gắn kết với PD-PDL1 của người có KD nhỏ hơn 1×10^{-7} M;

(b) chặn tương tác giữa PDL1 và PD-1;

(c) tăng cường sự hoạt hóa của PBMC và/hoặc các tế bào T;

(d) ức chế sự phát triển khối u.

8. Phân tử gắn kết PDL1 theo điểm 1, trong đó phân tử này gắn kết với PDL1 có KD nhỏ hơn 1×10^{-7} M.

9. Phân tử axit nucleic mã hóa phân tử gắn kết PDL1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

10. Vectơ biểu hiện, trong đó vectơ này bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 9 được liên kết hoạt động với một yếu tố điều hòa biểu hiện.

11. Tế bào vật chủ, trong đó tế bào này bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 9 và có khả năng biểu hiện phân tử gắn kết PDL1.

12. Tế bào vật chủ, trong đó tế bào này được biến đổi bằng vectơ biểu hiện theo điểm 10 và có khả năng biểu hiện phân tử gắn kết PDL1.

13. Phương pháp sản xuất phân tử gắn kết PDL1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này bao gồm:

a) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện cho phép để biểu hiện phân tử gắn kết PDL1;

b) thu hồi phân tử gắn kết PDL1 được biểu hiện bằng tế bào vật chủ từ bước nuôi cấy là bước a); và

c) tùy chọn làm sạch thêm và/hoặc sửa phân tử gắn kết PDL1 thu được từ bước b).

14. Dược phẩm bao gồm phân tử gắn kết PDL1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang dược dụng.

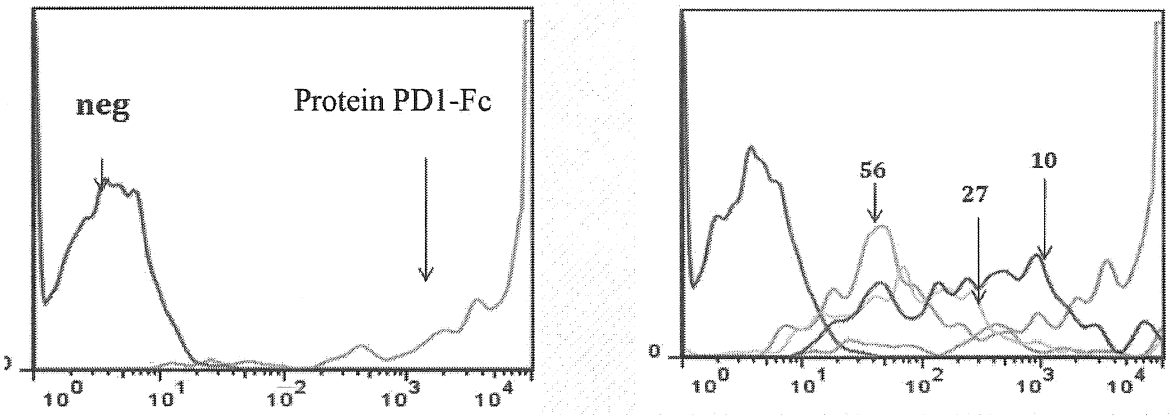
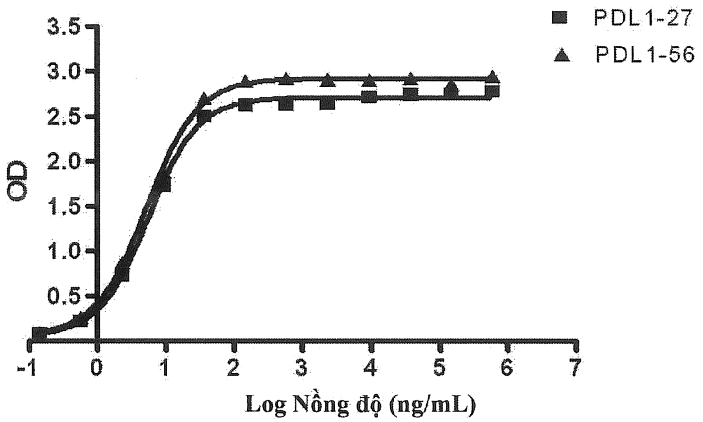
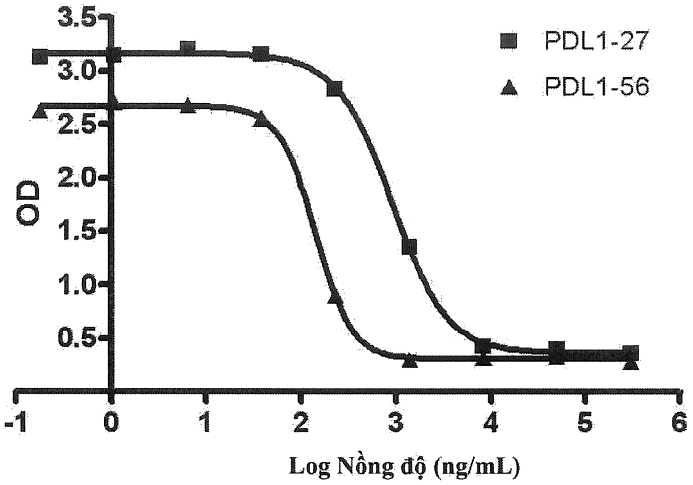


Figure 1



	PDL1-27	PDL1-56
EC50	5.680	5.304

Figure 2



	PDL1-27	PDL1-56
EC50	917.3	143.9

Figure 3

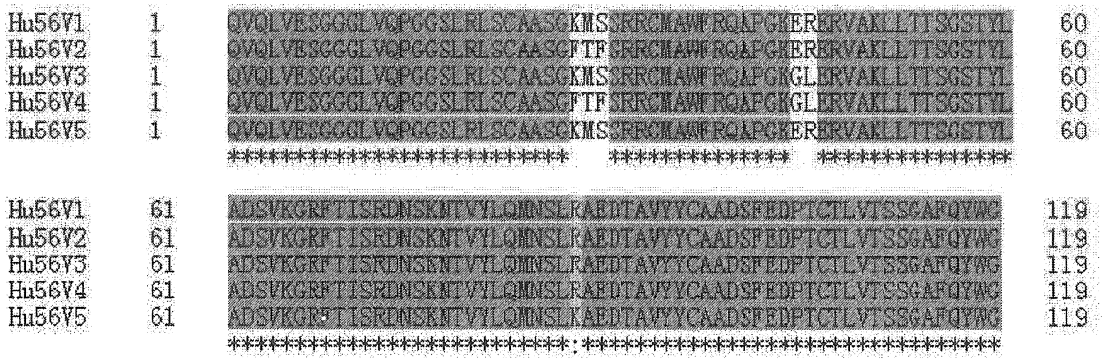

Hu56V1 1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKEREFVAKLLTTSGSTYL 60
Hu56V2 1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKEREFVAKLLTTSGSTYL 60
Hu56V3 1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKGLEFVAKLLTTSGSTYL 60
Hu56V4 1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCMAWFRQAPGKGLEFVAKLLTTSGSTYL 60
Hu56V5 1 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKEREFVAKLLTTSGSTYL 60
Hu56V1 61 ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCAADSPEDPTCTLVTSSGAFQYWG 119
Hu56V2 61 ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCAADSPEDPTCTLVTSSGAFQYWG 119
Hu56V3 61 ADSVKGRFTISRDNSENTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSPEDPTCTLVTSSGAFQYWG 119
Hu56V4 61 ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAADSPEDPTCTLVTSSGAFQYWG 119
Hu56V5 61 ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCAADSPEDPTCTLVTSSGAFQYWG 119

Figure 4

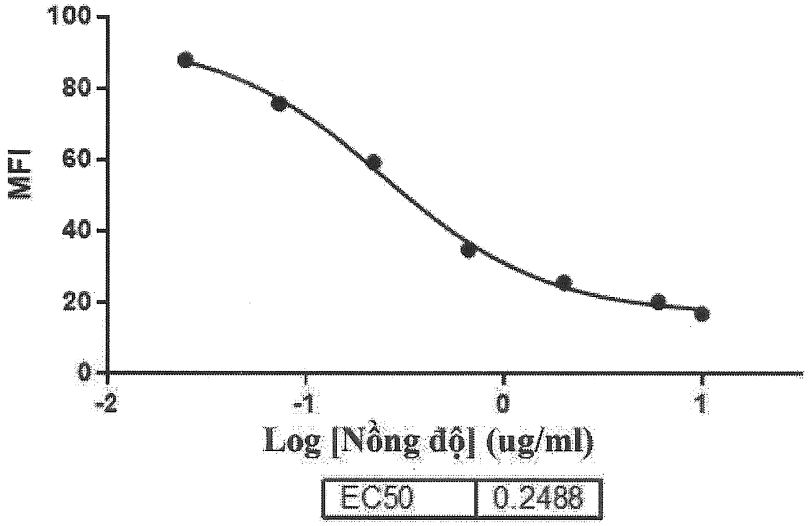


Figure 8

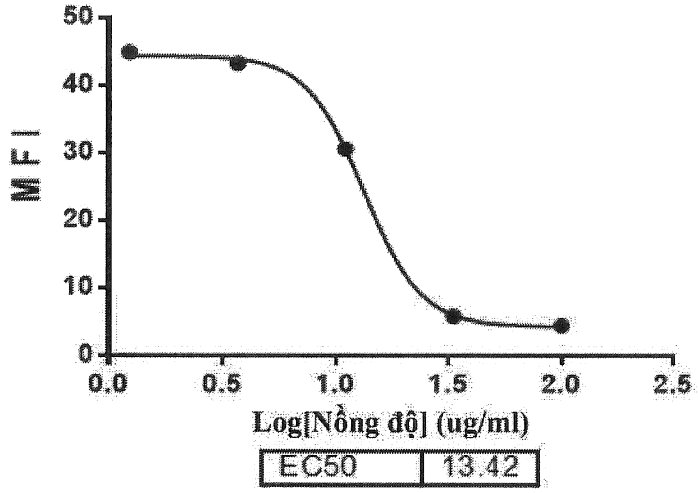


Figure 9

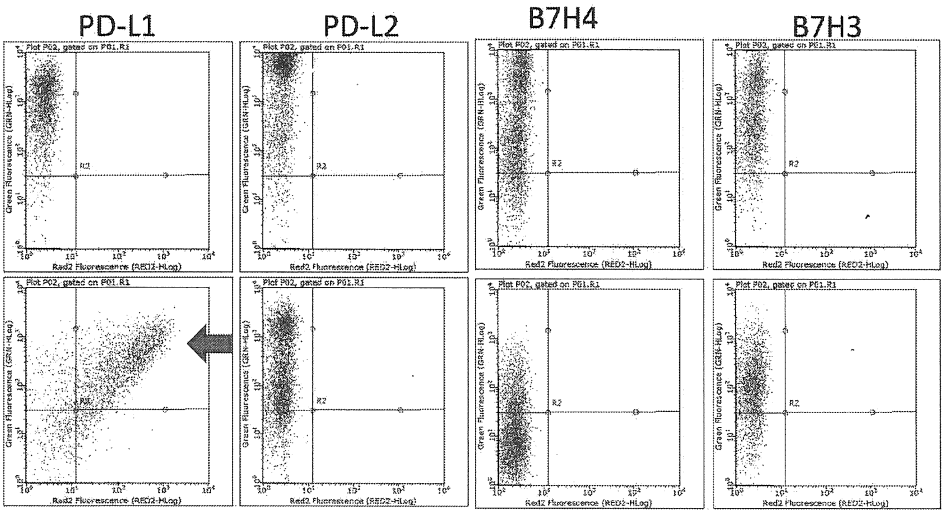


Figure 10

		MFI
A02	293 Chỉ có APC	8
A05	293 vecto-KN035	353
A03	293 hPD-L1-KN035	2874
A04	293 cmPD-L1-KN035	2821

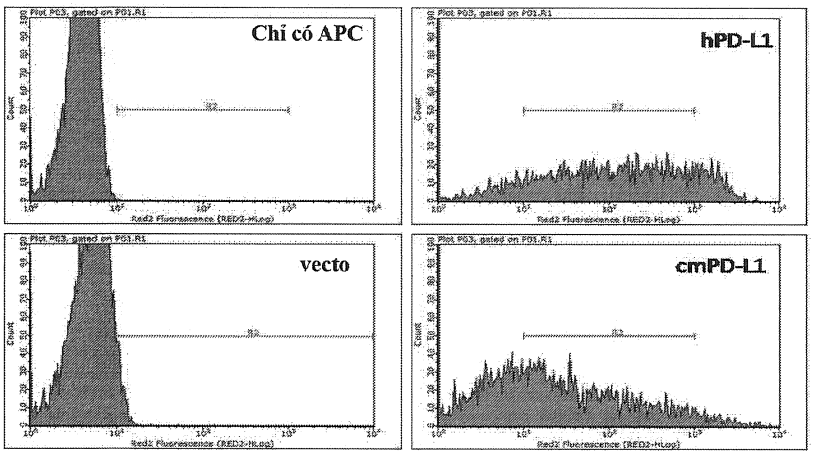


Figure 11

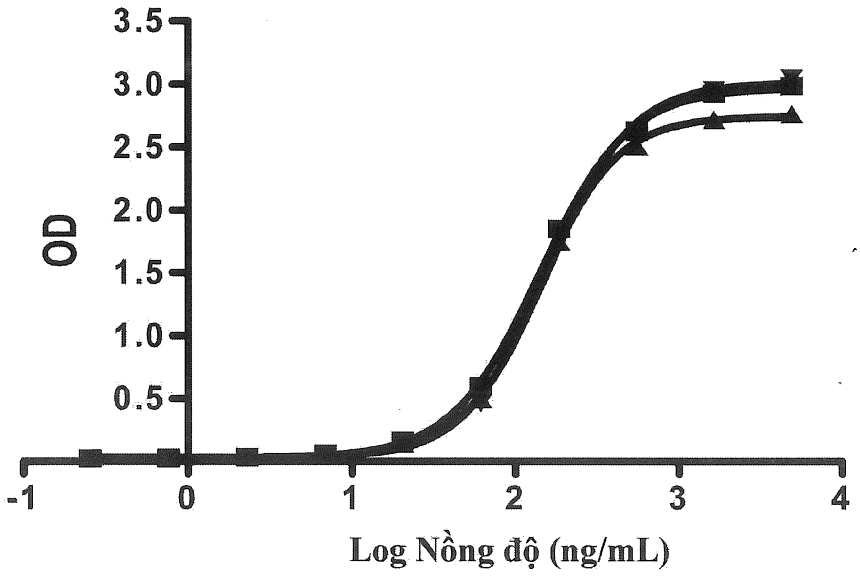


Figure 5

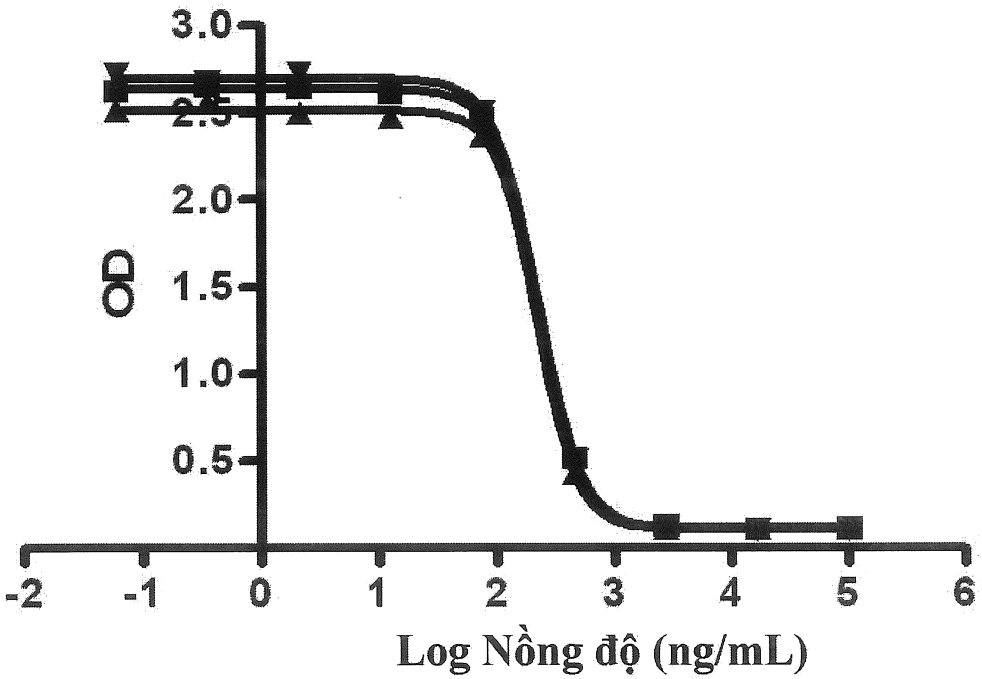


Figure 6

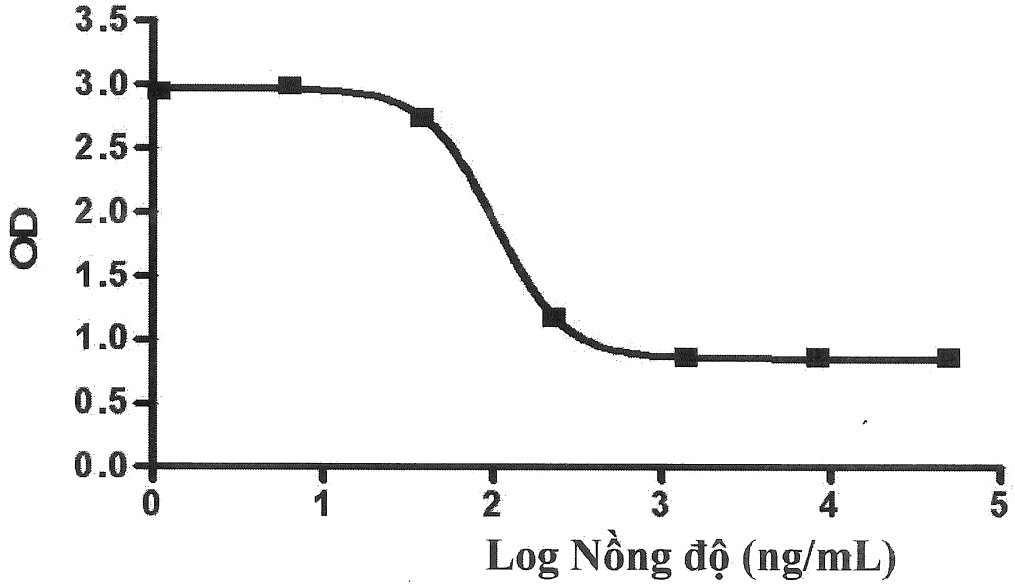
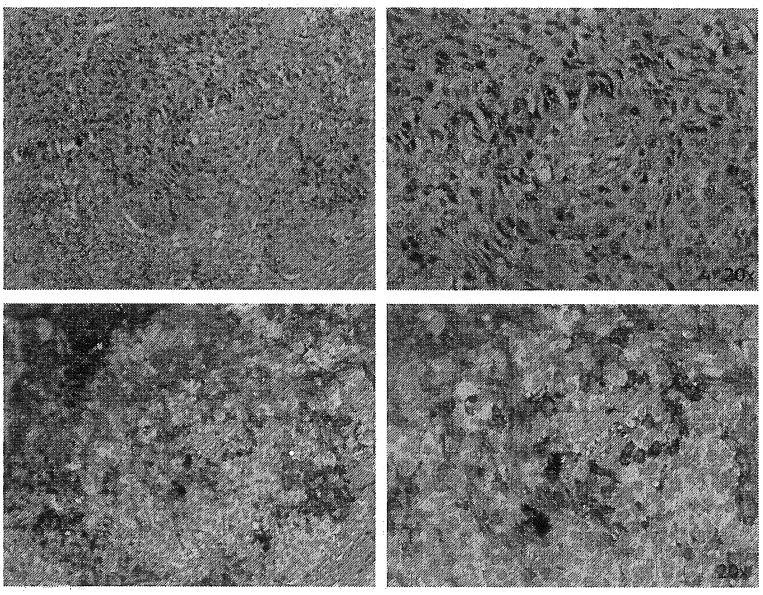


Figure 7



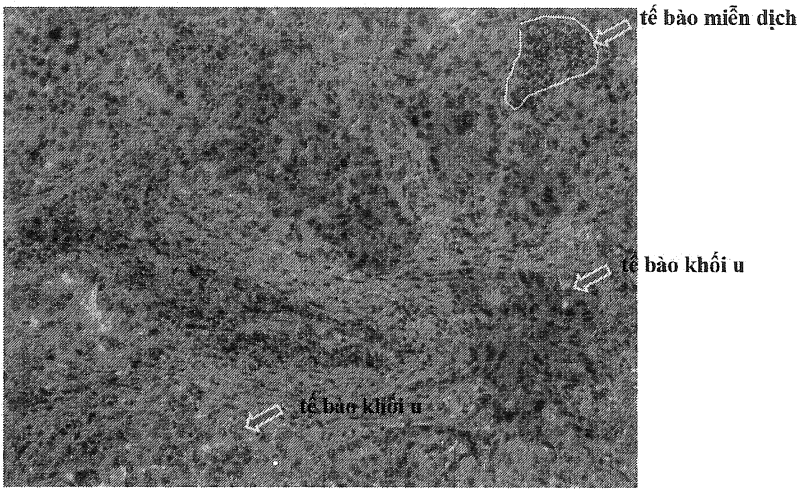


Figure 12

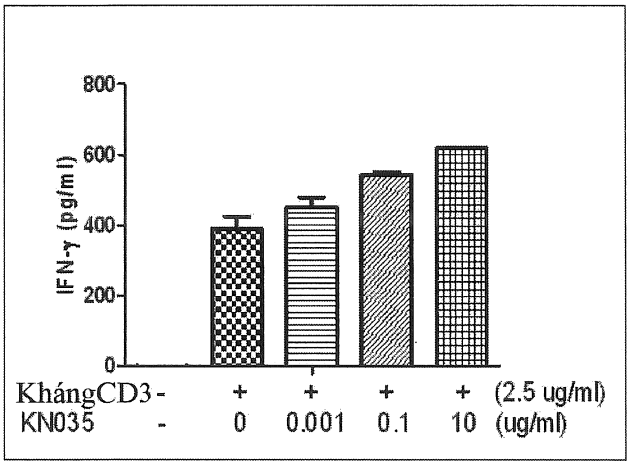

800
600
400
200
0
IFN-γ (pg/ml)
KhángCD3 - + + + + (2.5 ug/ml)
KN035 - 0 0.001 0.1 10 (ug/ml)

Figure 13

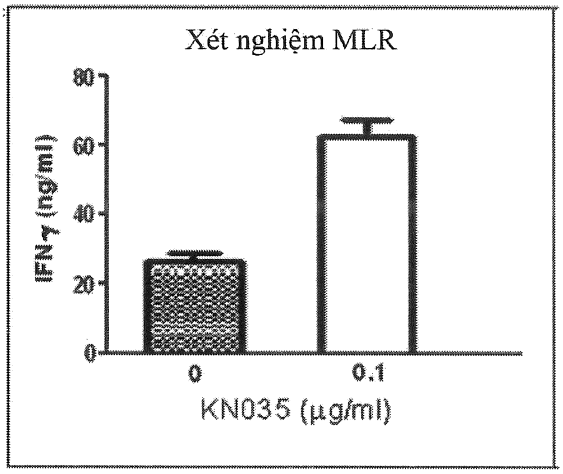


Figure 14A

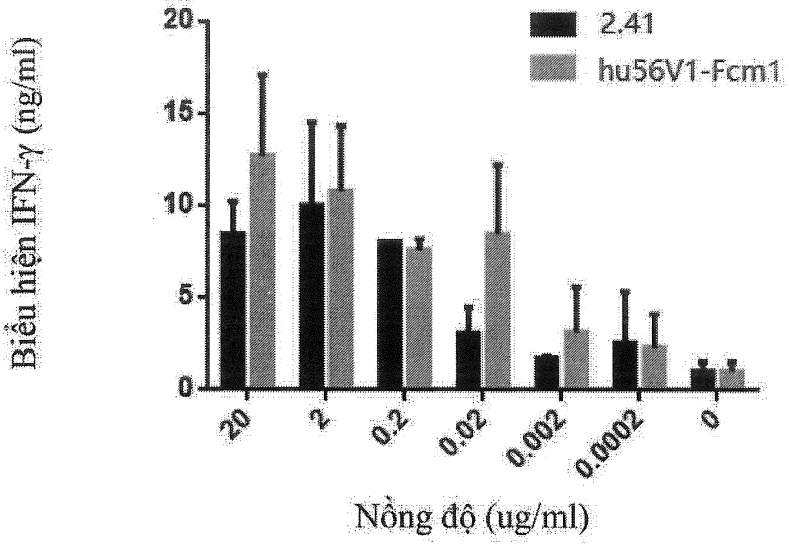


Figure 14B

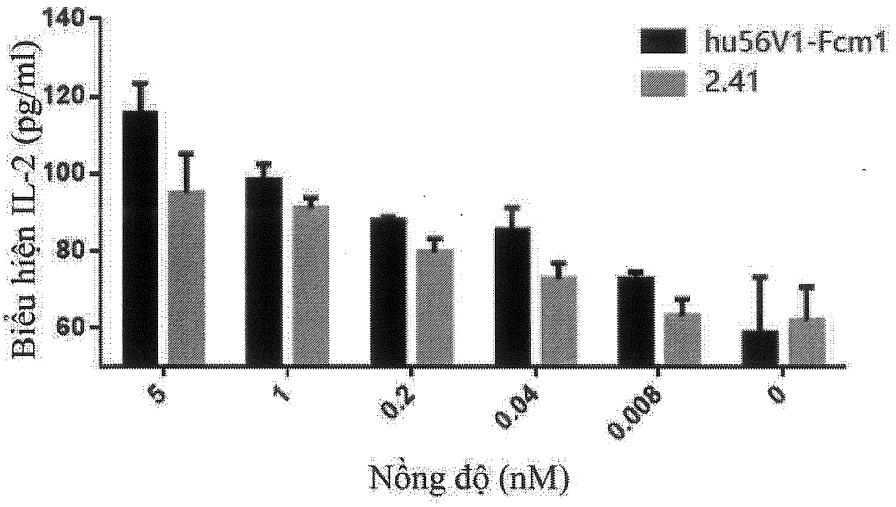

Biểu hiện IL-2 (pg/ml)
140
120
100
80
60
hu56V1-Fcm1
2.41
5
1
0.2
0.04
0.008
0
Nồng độ (nM)

Figure 15

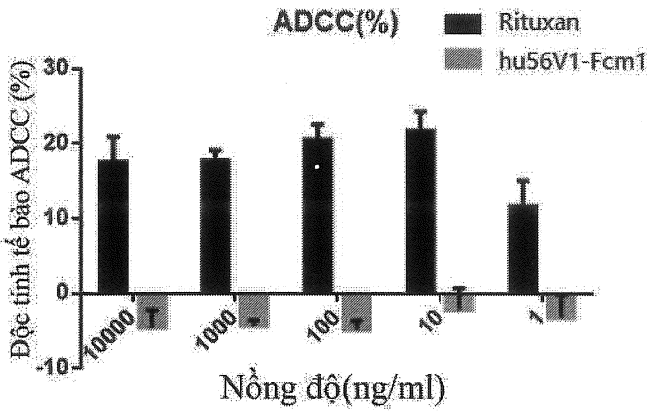


Figure 16A

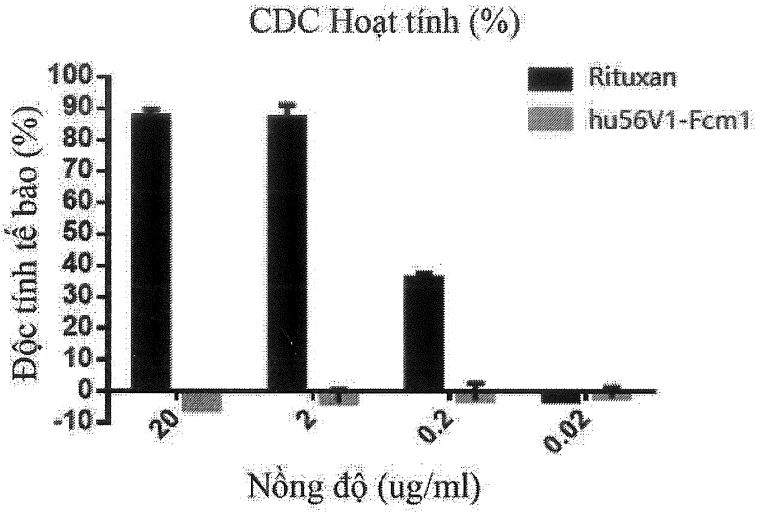


Figure 16B

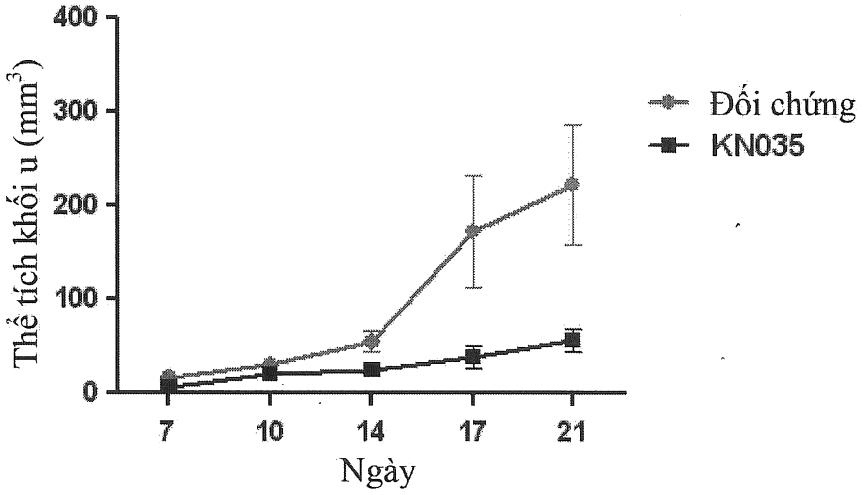


Figure 17A

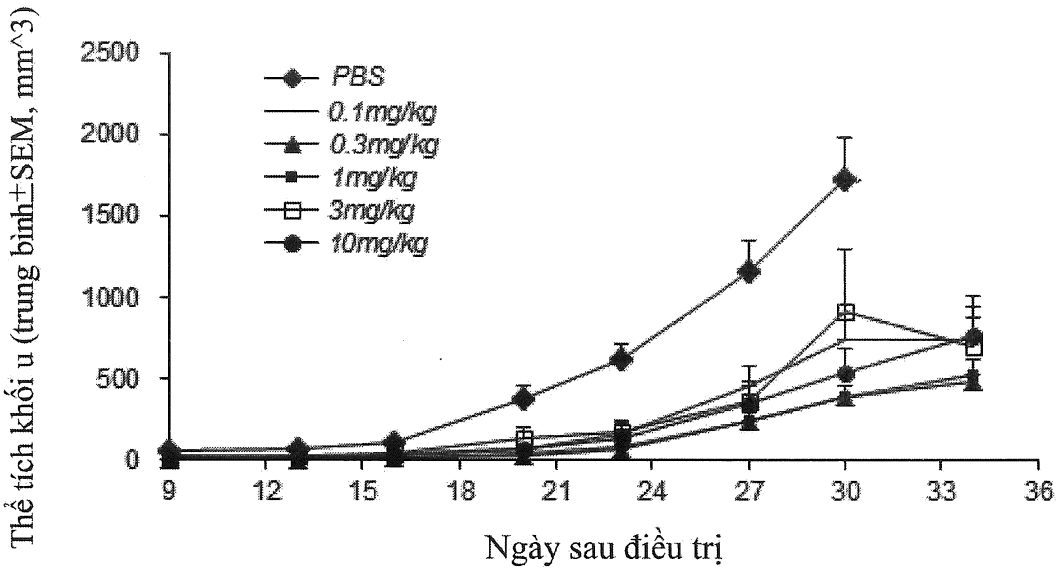


Figure 17B

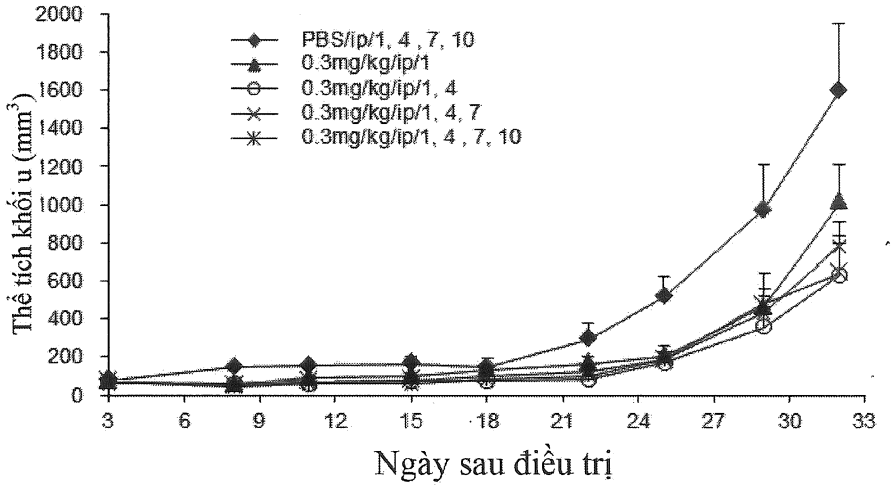

PBS/ip/1, 4 , 7, 10
0.3mg/kg/ip/1
0.3mg/kg/ip/1, 4
0.3mg/kg/ip/1, 4, 7
0.3mg/kg/ip/1, 4 , 7, 10
Thể tích khối u (mm3)
Ngày sau điều trị

Figure 18

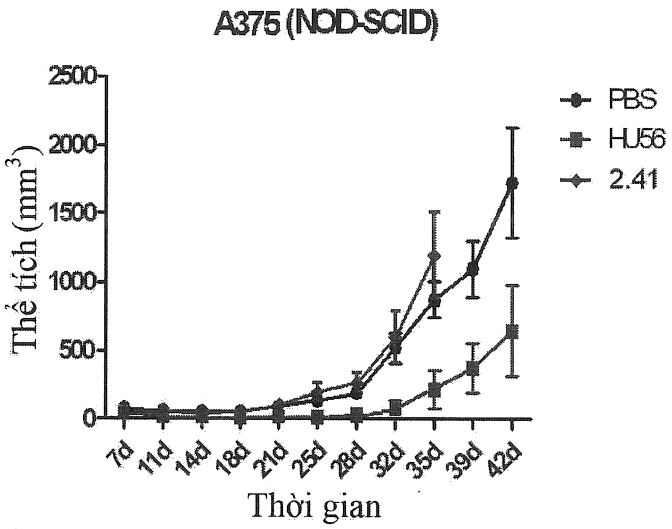


Figure 19A

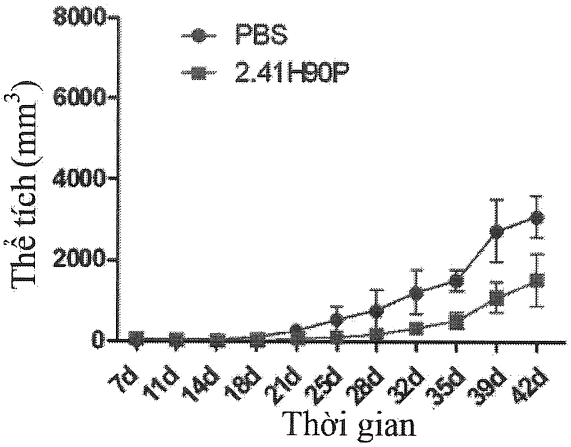
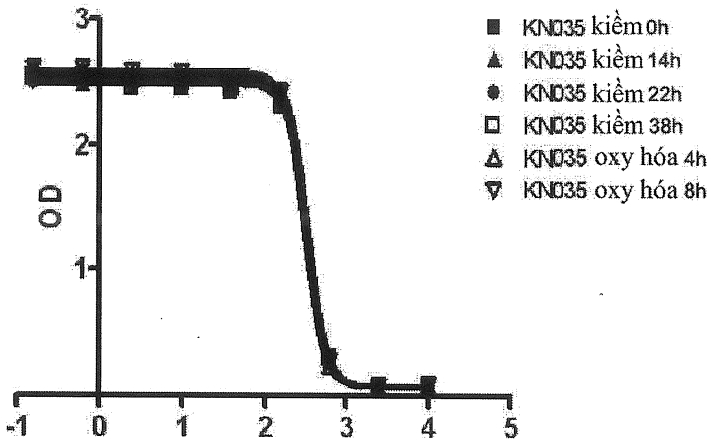


Figure 19B



	KN035 kiềm 0h	KN035 kiềm 14h	KN035 kiềm 22h	KN035 kiềm 38h	KN035 oxy hóa 4h	KN035 oxy hóa 8h
EC50	341.6	330.4	350.8	330.1	303.9	321.6

Figure 20

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.
3D MEDICINES (BEIJING) CO., LTD.

<120> Phân tử gắn kết phối tử gây chết tế bào theo chương trình đã định (PDL1) và phương pháp sản xuất phân tử này

<130> P2016TC300

<160> 39

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng thể số 56

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V1

<400> 2

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V2

<400> 3

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

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

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V3

<400> 4

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 5
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V4

<400> 5

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

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

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V5

<400> 6

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7
<211> 232
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IgG1-Fc

<400> 7

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 8
<211> 232
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IgG1-Fc-m1

<400> 8

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 9
<211> 232
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> IgG1-Fc-m2

<400> 9

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 10
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 56-Fc

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 11
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V1-Fc

<400> 11

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 12
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V2-Fc

<400> 12

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

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

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 13
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V3-Fc

<400> 13

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 14
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V4-Fc

<400> 14

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

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

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 15
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V5-Fc

<400> 15

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 16
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 56-Fc-m1

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 17
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V1-Fc-m1

<400> 17

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 18
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V2-Fc-m1

<400> 18

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

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

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 19
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Hu56V3-Fc-m1

<400> 19

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 20
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V4-Fc-m1

<400> 20

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

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

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 21
<211> 360

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V5-Fc-m1

<400> 21

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Gly Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 22
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 56-Fc-m2

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 23
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V1-Fc-m2

<400> 23

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 24
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V2-Fc-m2

<400> 24

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

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

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 25
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V3-Fc-m2

<400> 25

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 26
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V4-Fc-m2

<400> 26

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

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

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

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 27
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu56V5-Fc-m2

<400> 27

Gln 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 Lys Met Ser Ser Arg Arg
20 25 30

Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
35 40 45

Ala Lys Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ser Phe Glu Asp Pro Thr Cys Thr Leu Val Thr Ser Ser
100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
180 185 190

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
260 265 270

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
275 280 285

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
305 310 315 320

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

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 28
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PDL1 người-Fc

<400> 28

Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn
1 5 10 15

Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu Ala
20 25 30

Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln Phe
35 40 45

Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg Gln
50 55 60

Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys Met
85 90 95

Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val Asn
100 105 110

Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro Val
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys Thr
145 150 155 160

Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Asn Leu Phe Asn Val Thr Ser
165 170 175

Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Asp Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mồi PCR

<400> 29
gtcctggctg ctcttctaca aggc 24

<210> 30
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR

<400> 30
ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 31
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR

<400> 31
gatgtgcagc tgcaggagtc tggrggagg 29

<210> 32
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR

<400> 32
ggactagtgc ggccgctgga gacggtgacc tgggt 35

<210> 33
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PDL1 chuột-Fc

<400> 33

Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu
20 25 30

Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val Ile Gln
35 40 45

Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn Phe Arg
50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Cys Cys
85 90 95

Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala
130 135 140

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

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 374
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PD1 người-Fc

<400> 34

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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
145 150 155 160

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
165 170 175

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
180 185 190

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
195 200 205

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
210 215 220

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
225 230 235 240

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
245 250 255

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
260 265 270

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
275 280 285

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
290 295 300

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
305 310 315 320

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
325 330 335

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
340 345 350

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
355 360 365

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370

<210> 35
<211> 231
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PDL1-Chis

<400> 35

Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn
1 5 10 15

Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu Ala
20 25 30

Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln Phe
35 40 45

Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg Gln
50 55 60

Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys Met
85 90 95

Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val Asn
100 105 110

Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro Val
115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys Ala
130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys Thr
145 150 155 160

Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Asn Leu Phe Asn Val Thr Ser
165 170 175

Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe
180 185 190

Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro
195 200 205

Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Asp Gly Ser His
210 215 220

His His His His His His His
225 230

<210> 36
<211> 435
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD80-Fc

<400> 36

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
50 55 60

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

Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
85 90 95

Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100 105 110

Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140

Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
195 200 205

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
210 215 220

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
225 230 235 240

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
245 250 255

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
260 265 270

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
275 280 285

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
290 295 300

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
305 310 315 320

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
325 330 335

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
340 345 350

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
355 360 365

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
370 375 380

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
385 390 395 400

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
405 410 415

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
420 425 430

Pro Gly Lys
435

<210> 37
<211> 272
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PDL1 khỉ

<400> 37

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Ile
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
210 215 220

Ile Leu Gly Ala Ile Phe Leu Leu Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
225 230 235 240

Phe Tyr Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Met Lys Lys Ser Gly Ile
245 250 255

Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu Glu Thr
260 265 270

<210> 38
<211> 456
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PDL1 người-muFc

<400> 38

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Asp Ile Glu
210 215 220

Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
275 280 285

Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
325 330 335

Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
340 345 350

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala
355 360 365

Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu
370 375 380

Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
420 425 430

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
435 440 445

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 39
<211> 381
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PD1 người-muFc

<400> 39

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
165 170 175

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
180 185 190

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
195 200 205

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
225 230 235 240

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
245 250 255

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
260 265 270

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
275 280 285

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
290 295 300

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
305 310 315 320

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
325 330 335

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
340 345 350

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
355 360 365

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
370 375 380