



(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)



1-0040898

(51)⁷ A61K 39/395; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2019-07115

(22) 15/05/2018

(86) PCT/CN2018/086866 15/05/2018

(87) WO 2018/210230 22/11/2018

(30) 201710341680.7 16/05/2017 CN

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/08/2020 389

(73) 1. JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone

Lianyungang, Jiangsu 222047, China

2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD (CN)

No.279 Wenjing Road, Economic and Technological Development Zone, Minhang

District Shanghai 200245, China

(72) YAN, Zhen (CN); YANG, Jianjian (CN); YAN, Xiaodan (CN); WU, Shan (CN);
LIU, Xun (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) DƯỢC PHẨM BAO GỒM KHÁNG THỂ KHÁNG PD-L1 VÀ PHƯƠNG PHÁP
BẢO CHẾ DƯỢC PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1. Cụ thể, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong chất đệm suxinat. Ngoài ra, dược phẩm này còn bao gồm đường và chất hoạt động bề mặt không ion. Sáng chế còn đề xuất phương pháp bào chế dược phẩm nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể chết theo chương trình 1 (PD-1: Programmed death-1), là thụ thể protein được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T và được phát hiện vào năm 1992, có liên quan đến quá trình chết tế bào theo chương trình. PD-1 có hai phối tử, cụ thể là PD-L1 và PD-L2. PD-L1 chủ yếu được biểu hiện trên tế bào T, tế bào B, đại thực bào, và tế bào đuôi gai (DC: dendritic cell), và sự biểu hiện trên các tế bào hoạt hóa có thể được điều hòa tăng. Việc biểu hiện của PD-L2 tương đối bị giới hạn, chủ yếu được biểu hiện trên tế bào trình diện kháng nguyên, như đại thực bào và tế bào đuôi gai hoạt hóa.

PD-L1 ức chế hệ miễn dịch bằng cách liên kết với PD-1 và B7-1, và nhiều tế bào khối u trong vi môi trường khối u biểu hiện PD-L1. Các nghiên cứu gần đây đã phát hiện ra rằng sự biểu hiện cao của protein PD-L1 trong các mô khối u ở người như bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đường ruột, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư u melanin, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư gan và các bệnh ung thư khác, và mức biểu hiện của PD-L1 có liên quan mật thiết với tình trạng lâm sàng và tiên lượng cho bệnh nhân. Vì PD-L1 hoạt động như con đường truyền tín hiệu thứ hai để ức chế việc tăng sinh tế bào T, nên việc phong bế liên kết giữa PD-L1/PD-1 đã trở thành mục tiêu mới tiềm năng trong lĩnh vực liệu pháp miễn dịch khối u.

So sánh với dược chất hóa học khác, dược chất kháng thể trở nên không ổn

định do chúng có khối lượng phân tử lớn hơn, cấu trúc phức tạp hơn, và dễ dàng bị phân huỷ, bị polyme hoá, hoặc có biến đổi hoá học không mong muốn. Các nghiên cứu điều chế các dược chất kháng thể là đặc biệt quan trọng để tạo ra các phân tử kháng thể thích hợp để sử dụng, và để duy trì sự ổn định trong quá trình bảo quản và sử dụng sau đó và phát huy hiệu quả tốt hơn.

Nhiều công ty dược phẩm đa quốc gia hiện đang phát triển các dược phẩm bao gồm các kháng thể PD-L1/PD-1, như CN105793288A, CN103429264A, và CN105960415A.

Sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà đủ ổn định và thích hợp để sử dụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó và chất đệm, trong đó chất đệm này tốt hơn là chất đệm suxinat hoặc chất đệm axetat, tốt hơn nữa là chất đệm suxinat.

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của chất đệm là từ 5 mM đến 50 mM, tốt hơn là từ 10 mM đến 30 mM, tốt hơn nữa là từ 10 mM đến 20 mM; các phương án không giới hạn về nồng độ của chất đệm bao gồm 10 mM, 12 mM, 14 mM, 16 mM, 18 mM và 20 mM.

Theo các phương án của sáng chế, độ pH của dược phẩm này là từ 4,5 đến 6,0, tốt hơn là từ 4,8 đến 5,7, tốt hơn nữa là từ 5,0 đến 5,5, và có thể là 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 hoặc 5,5.

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của kháng thể trong dược phẩm này là từ 30 mg/mL đến 80 mg/mL, tốt hơn là từ 40 mg/mL đến 60 mg/mL, tốt hơn nữa là từ 45 mg/mL đến 55 mg/mL; các phương án không giới hạn về nồng độ của kháng thể bao gồm 45 mg/mL, 46 mg/mL, 47 mg/mL, 48 mg/mL, 49 mg/mL, 50 mg/mL, 51 mg/mL, 52 mg/mL, 53 mg/mL, 54 mg/mL và 55 mg/mL.

Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế còn bao gồm sacarit. “Sacarit” theo sáng chế bao gồm thành phần thông thường $(CH_2O)_n$ và các dẫn xuất của nó, bao gồm monosacarit, disacarit, trisacarit, polysacarit, rượu đường, đường khử, đường không khử và tương tự, có thể được chọn từ nhóm bao gồm glucoza, sucroza, trehaloza, lactoza, fructoza, maltoza, dextran, glyxerol, dextran, erythritol, glyxerol, arabitol, xylitol, sorbitol, manitol, melibioza, melezitosa, melitrioza, mannotrioza, stachyoza, maltoza, lactuloza, maltuloza, sorbitol, maltitol, lactitol, isomaltuloza và các chất tương tự. Sacarit này tốt hơn là disacarit không khử, tốt hơn nữa là trehaloza hoặc sucroza.

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của sacarit trong dược phẩm này là từ 30 mg/mL đến 90 mg/mL, tốt hơn là từ 50 mg/mL đến 70 mg/mL, tốt hơn nữa là từ 55 mg/mL đến 65 mg/mL; các phương án không giới hạn về nồng độ của sacarit này bao gồm 55 mg/mL, 57 mg/mL, 59 mg/mL, 60 mg/mL, 61 mg/mL, 63 mg/mL và 65 mg/mL.

Ngoài ra, dược phẩm còn bao gồm chất hoạt động bề mặt, có thể được chọn từ nhóm bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, poloxamer, Triton, natri dodecyl sulfat, natri lauryl sulfonat, natri octyl glycosit, lauryl-sulfobetain, myristyl-sulfobetain, linoleyl-sulfobetain, hoặc stearyl-sulfobetain, lauryl-sarcosin, myristyl-sarcosin, linoleyl-sarcosin, stearyl-sarcosin, linoleyl-betain, myristyl-betain, xetyl-betain, lauryl amidopropyl-betain, cocamidopropyl-betain, linoleamidopropyl-betain, myristamidopropyl-betain, palmitoylamidopropyl-betain, hoặc isostearamidopropyl-betain, myristamidopropyl-dimetylamin, palmitoylamidopropyl-dimetylamin, isostearamidopropyl-dimetylamin, natri metyl cocoyl-aurat, hoặc disnatri metyl oleyl-aurat, polyetylen glycol, polypropylen glycol, và copolyme của etylen và propylen glycol, v.v... Chất hoạt động bề mặt này tốt hơn là polysorbat 80 hoặc polysorbat 20, tốt hơn nữa là polysorbat 80.

Theo các phương án của sáng chế, nồng độ của chất hoạt động bề mặt trong dược phẩm này là từ 0,1 mg/mL đến 1,0 mg/mL, tốt hơn là từ 0,2 mg/mL đến 0,8

mg/mL, tốt hơn nữa là từ 0,4 mg/mL đến 0,8 mg/mL; các phương án không giới hạn về nồng độ của chất hoạt động bề mặt này bao gồm 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL và 0,8 mg/mL.

Theo các phương án của sáng chế, trong đó, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên bao gồm trình tự bất kỳ trong các trình tự vùng CDR hoặc các trình tự đột biến của chúng được chọn từ nhóm bao gồm: trình tự HCDR vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể: SEQ ID NO: 1-3, SEQ ID NO: 7-9; và/hoặc, các trình tự LCDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể: SEQ ID NO: 4-6, SEQ ID NO: 10-12;

Cụ thể như sau:

HCDR1 được chọn từ: NDYWX₁ SEQ ID NO: 1

hoặc SYWMH SEQ ID NO: 7,

HCDR2 được chọn từ: YISYTGSTYYNPSLKS SEQ ID NO: 2

hoặc RIX₄PNSG X₅TSYNEKFKN SEQ ID NO: 8, và/hoặc

HCDR3 được chọn từ: SGGWLAPFDY SEQ ID NO: 3

hoặc GGSSYDYFDY SEQ ID NO: 9; và/hoặc

LCDR1 được chọn từ: KSSQSLFY X₂ SNQK X₃SLA SEQ ID NO: 4

hoặc RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 10,

LCDR2 được chọn từ: GASTRES SEQ ID NO: 5

hoặc AASNLES SEQ ID NO: 11, và/hoặc

LCDR3 được chọn từ: QQYYGYPYT SEQ ID NO: 6

hoặc QQSFDPLT SEQ ID NO: 12;

trong đó, X₁ được chọn từ N hoặc T, X₂ được chọn từ R hoặc H, X₃ được chọn

từ N hoặc H, X₄ được chọn từ H hoặc G, và X₅ được chọn từ G hoặc F.

Theo các phương án của sáng chế, tốt hơn là, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên bao gồm trình tự CDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc trình tự đột biến của nó, và trình tự CDR vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 hoặc trình tự đột biến của nó; tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, và các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9;

hoặc, tốt hơn là, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên bao gồm trình tự CDR vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự đột biến của nó, và trình tự CDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự đột biến của nó; tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3, và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6.

Theo các phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên bao gồm trình tự CDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ tương đồng trình tự với các trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, và trình tự CDR vùng biến đổi chuỗi nặng có ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ tương đồng trình tự với các trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9.

Theo các phương án của sáng chế, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên có thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể người, tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người.

Theo các phương án của sáng chế, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi trong chuỗi nặng có ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14.

Theo các phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó trong được phẩm nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi trong chuỗi nặng có ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có nồng độ trong khoảng từ 30 mg/mL đến 80 mg/mL, chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-6,0 có nồng độ trong khoảng từ 5 mM đến 50 mM, disacarit có nồng độ trong khoảng từ 30 mg/mL đến 90 mg/mL, và polysorbat 80 có nồng độ trong khoảng từ 0,1 mg/mL đến 1,0 mg/mL.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 40 mg/mL-60 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM -30 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-5,5, 40 mg/mL-80 mg/mL sucroza và 0,4 mg/mL-0,8 mg/mL polysorbat 80.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 45 mg/mL-55 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM-20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-5,5, 55 mg/mL-65 mg/mL sucroza và 0,5 mg/mL-0,7 mg/mL polysorbat 80.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có nồng độ trong khoảng từ 30 mg/mL đến 80 mg/mL, chất đệm axetat ở độ pH=5,0-6,0 có nồng độ trong khoảng từ 5 mM đến 50 mM, disacarit có nồng độ trong khoảng từ 30 mg/mL đến 90 mg/mL, và polysorbat 80 có nồng độ trong khoảng từ 0,1 mg/mL đến 1,0 mg/mL.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,3 và 60 mg/mL sucroza.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM chất đệm axetat ở độ pH=5 và 90 mg/mL sucroza.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 30 mM chất đệm axetat ở độ pH=5 và 60 mg/mL trehaloza.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 30 mM chất đệm axetat ở độ pH=5 và 60 mg/mL trehaloza.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 30 mM chất đệm axetat ở độ pH=5,6 và 90 mg/mL sucroza.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-5,5, 60 mg/mL sucroza và 0,2 mg/mL polysorbat 20.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM-20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,2 mg/mL polysorbat 20.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm axetat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,1 mg/mL-0,3 mg/mL polysorbat 20.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm axetat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,1 mg/mL-0,3 mg/mL polysorbat 80.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,2 mg/mL-0,6 mg/mL polysorbat 20.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,4-0,8 mg/mL polysorbat 80.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,4 mg/mL polysorbat 80.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,6 mg/mL polysorbat 80.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm 50 mg/mL kháng thể PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,8 mg/mL polysorbat 80.

Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm suxinat trong dược phẩm này là từ 5 mM đến 50 mM. Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm suxinat trong

được phẩm này là từ 10 mM đến 30 mM. Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm suxinat trong được phẩm này là khoảng 20 mM.

Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm axetat trong được phẩm này là từ 5 mM đến 50 mM. Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm axetat trong được phẩm này là từ 10 mM đến 30 mM. Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm axetat trong được phẩm này là từ 20 mM.

Theo một số phương án, độ pH của được phẩm này là từ 5,0 đến 6,0. Theo một số phương án, độ pH của được phẩm này là từ 5,0 đến 5,5. Theo một số phương án, độ pH của được phẩm này là 5,2 hoặc 5,5.

Theo một số phương án, nồng độ của kháng thể trong được phẩm này là từ 30 mg/mL đến 80 mg/mL. Theo một số phương án, nồng độ của kháng thể trong được phẩm này là từ 40 mg/mL đến 60 mg/mL. Theo một số phương án, nồng độ của kháng thể trong được phẩm này là khoảng 50 mg/mL.

Theo một số phương án, nồng độ của disacarit trong được phẩm này là từ 30 mg/mL đến 90 mg/mL. Theo một số phương án, nồng độ của disacarit trong được phẩm này là từ 40 mg/mL đến 80 mg/mL. Theo một số phương án, nồng độ của disacarit trong được phẩm này là khoảng 60 mg/mL.

Theo một số phương án, polysorbat trong được phẩm này là polysorbat 20 hoặc polysorbat 80. Theo một số phương án, polysorbat trong được phẩm này là polysorbat 80. Theo một số phương án, nồng độ của polysorbat trong được phẩm này là từ 0,1 mg/mL đến 1,0 mg/mL. Theo một số phương án, nồng độ của polysorbat trong được phẩm này là từ 0,4 mg/mL đến 0,8 mg/mL. Theo một số phương án, nồng độ của polysorbat trong được phẩm này là khoảng 0,6 mg/mL.

Theo một số phương án, chế phẩm này ổn định ở 2-8°C trong ít nhất 3 tháng, ít nhất 6 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, hoặc ít nhất 24 tháng. Theo một số phương án, chế phẩm này ổn định ở 40°C trong ít nhất 7 ngày, ít nhất 14 ngày hoặc ít nhất 28 ngày.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm hoặc kit bao gồm đồ bao gói chứa các dược phẩm ổn định bất kỳ được mô tả ở đây. Theo một số phương án, đồ bao gói này là lọ thủy tinh, và lọ thủy tinh này là lọ thủy tinh borosilicat trung tính để tiêm.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế các dược phẩm đã mô tả trên đây, bao gồm hỗn hợp của kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó với tá dược được dụng.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng dược phẩm đã mô tả trên đây để sản xuất thuốc điều trị bệnh hoặc tình trạng qua trung gian bởi PD-L1, trong đó bệnh hoặc tình trạng này tốt hơn là bệnh ung thư; tốt hơn nữa là bệnh ung thư biểu hiện PD-L1; tốt nhất là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đường ruột, bệnh ung thư thận, u melanin hoặc bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ; còn tốt hơn nữa là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, u melanin, bệnh ung thư bàng quang hoặc bệnh ung thư thận.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng qua trung gian bởi PD-L1, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng liều có hiệu quả điều trị của dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó; trong đó, bệnh này tốt hơn là bệnh ung thư; tốt hơn nữa là bệnh ung thư biểu hiện PD-L1; bệnh ung thư này tốt nhất là bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đường ruột, bệnh ung thư thận, u melanin, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ hoặc bệnh ung thư bàng quang; tốt nhất là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, u melanin, bệnh ung thư bàng quang hoặc bệnh ung thư thận.

Được hiểu rõ rằng một, một số hoặc tất cả các dấu hiệu của các phương án khác nhau được mô tả ở đây còn có thể được kết hợp với nhau để tạo ra các phương án khác theo sáng chế. Các phương án khác thu được bằng cách kết hợp các phương án trên đây theo sáng chế cũng được mô tả trong phần mô tả chi tiết sáng chế sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Sơ đồ thiết kế môi trường trong quá trình tạo ra bản sao tương tích với người.

Fig. 2: Sơ đồ xây dựng vec-tơ trong quá trình tạo ra bản sao tương tích với người.

Fig. 3: Biểu đồ hiệu ứng chính cho các yếu tố Tm (bao gồm hệ chất đệm, nồng độ của chất đệm, độ pH của dược phẩm, nồng độ của sacarit, và loại sacarit).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ

Một số khái niệm kỹ thuật và khoa học được xác định cụ thể dưới đây để làm cho sáng chế này dễ hiểu hơn. Trừ khi được cụ thể xác định khác trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng trong đây sẽ được hiểu theo nghĩa thông thường bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế thuộc về.

“Chất đệm” đề cập đến chất đệm chống lại những sự thay đổi của độ pH nhờ sự liên hợp của nó với thành phần axit-bazơ. Giá trị pH của chất đệm theo sáng chế là từ 4,5 đến 6,0, tốt hơn là từ 5,0 đến 6,0, tốt hơn nữa là từ 5,0 đến 5,5, tốt nhất là 5,2. Các ví dụ về chất đệm kiểm soát độ pH trong phạm vi nêu trên bao gồm chất đệm axetat, chất đệm suxinat, chất đệm gluconat, chất đệm histidin, chất đệm oxalat, chất đệm lactat, chất đệm phosphat, chất đệm xitrat, chất đệm tartrat, chất đệm fumarat, glyxylglyxin và các chất đệm axit hữu cơ khác. Chất đệm theo sáng chế tốt hơn là chất đệm suxinat hoặc chất đệm axetat, tốt hơn nữa là chất đệm suxinat.

“Chất đệm suxinat” đề cập đến chất đệm bao gồm ion suxinat. Các ví dụ về chất đệm suxinat bao gồm axit suxinic-natri suxinat, suxinat histidin, axit suxinic-kali suxinat, axit suxinic-canxi suxinat, và tương tự. Chất đệm suxinat theo sáng chế tốt hơn là axit suxinic-natri suxinat.

“Chất đệm axetat” đề cập đến chất đệm bao gồm ion axetat. Các ví dụ về chất

đệm axetat bao gồm axit axetic-natri axetat, axit axetic histidin, axit axetic-kali axetat, canxi axetat axetat, axit axetic-magie axetat, và tương tự. Chất đệm axetat được ưu tiên theo sáng chế là axit axetic-natri axetat.

“Dược phẩm” đề cập đến hỗn hợp bao gồm một hoặc nhiều hợp chất được mô tả ở đây hoặc muối được dụng/sinh lý của chúng hoặc tiền dược chất của chúng với các thành phần hóa học khác. Các thành phần hóa học khác nêu trên là, ví dụ, các chất mang được dụng/sinh lý và các tá dược. Mục đích của dược phẩm này là cải thiện việc sử dụng cho sinh vật, tạo thuận lợi cho việc hấp thụ thành phần hoạt tính, nhờ vậy tạo ra hoạt tính sinh học.

Dược phẩm theo sáng chế có khả năng đạt được hiệu quả ổn định: kháng thể trong đó có thể gần như giữ được sự ổn định vật lý và/hoặc sự ổn định hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó sau khi bảo quản; tốt hơn là, dược phẩm gần như giữ được sự ổn định vật lý, sự ổn định hóa học và hoạt tính sinh học sau khi bảo quản. Thời gian bảo quản thường được chọn dựa trên thời gian bảo quản xác định trước của dược phẩm. Hiện nay có một số kỹ thuật phân tích để đo sự ổn định của protein mà đo sự ổn định sau khi bảo quản trong một khoảng thời gian đã chọn ở nhiệt độ đã chọn.

Chế phẩm dược kháng thể ổn định là chế phẩm trong đó không có sự thay đổi đáng kể quan sát được trong các điều kiện sau đây: bảo quản ở nhiệt độ lạnh (2-8°C) trong ít nhất 3 tháng, tốt hơn là 6 tháng, tốt hơn nữa là 1 năm, và thậm chí tốt hơn nữa là lên đến 2 năm. Ngoài ra, chế phẩm lỏng ổn định bao gồm chế phẩm lỏng thể hiện đặc tính mong muốn khi bảo quản ở nhiệt độ 25°C và 40°C trong khoảng thời gian 1 tháng, 3 tháng, và 6 tháng. Tiêu chí thường chấp nhận được cho sự ổn định là như sau: monome kháng thể bị phân hủy thường không lớn hơn khoảng 10%, tốt hơn là không lớn hơn khoảng 5%, khi được đánh giá bằng SEC-HPLC. Theo phân tích trực quan, chế phẩm dược lỏng này là không màu hoặc từ trong suốt đến hơi trắng đục. Nồng độ, độ pH và độ thẩm thấu của chế phẩm này có sự thay đổi không lớn hơn $\pm 10\%$. Thông thường, sự cắt xén quan sát được không lớn hơn 10%, tốt hơn là 5%. Thông thường, kết tụ được tạo thành không lớn hơn 10%, tốt hơn là 5%.

Kháng thể “giữ được sự ổn định vật lý của nó” trong chế phẩm được nếu nó không thể hiện sự tăng lên đáng kể của sự kết tụ, kết tủa và/hoặc biến tính khi đánh giá trực quan về màu sắc và/hoặc độ trong suốt, hoặc khi đo bằng tán xạ ánh sáng UV, sắc ký loại trừ kích thước (SEC : size exclusion chromatography) và tán xạ ánh sáng động (DLS : dynamic light scattering). Những sự thay đổi hình thể protein có thể được đánh giá bằng quang phổ huỳnh quang (xác định cấu trúc bậc ba của protein), và bằng quang phổ FTIR (xác định cấu trúc bậc hai của protein).

Kháng thể “giữ được sự ổn định hóa học của nó” trong chế phẩm được, nếu nó không thể hiện sự biến đổi hóa học đáng kể. Sự ổn định hóa học có thể được đánh giá bằng cách phát hiện và định lượng các dạng biến đổi hóa học của protein. Các quá trình phân hủy thường biến đổi cấu trúc hóa học của protein bao gồm thủy phân hoặc cắt xén (được đánh giá bằng các phương pháp như sắc ký loại trừ kích thước và SDS-PAGE), oxy hóa (được đánh giá bằng các phương pháp như lập bản đồ peptit kết hợp với quang phổ khối hoặc MALDI/TOF/MS), khử amit hóa (được đánh giá bằng các phương pháp như sắc ký trao đổi ion, hội tụ đẳng điện mao quản, lập bản đồ peptit, đo axit isoaspartic), và đồng phân hóa (được đánh giá bằng cách đo hàm lượng axit isoaspartic, lập bản đồ peptit, v.v...).

Kháng thể “giữ được hoạt tính sinh học của nó” trong chế phẩm được, nếu hoạt tính sinh học của kháng thể này trong khoảng thời gian đã cho là nằm trong phạm vi hoạt tính sinh học xác định trước được thể hiện tại thời gian chế phẩm được này được điều chế. Hoạt tính sinh học của kháng thể có thể được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên.

Các mã ba chữ cái và các mã một chữ cái cho các gốc axit amin được sử dụng trong đây được mô tả trong *J. Biol. Chem.* 243, p. 3558 (1968).

“Kháng thể” được sử dụng theo sáng chế đề cập đến globulin miễn dịch, là cấu trúc chuỗi tetra-peptit được nối với nhau bằng các liên kết disulfit giữa hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau. Sự khác nhau trong thành phần axit amin và trình tự vùng không đổi chuỗi nặng tạo nên những sự khác nhau trong tính kháng

nguyên của globulin miễn dịch. Theo đó, các globulin miễn dịch có thể được phân loại thành 5 lớp, hoặc được gọi là các isotyp globulin miễn dịch, tên là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, các chuỗi nặng tương ứng của chúng là chuỗi μ , chuỗi δ , và chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ . Tùy theo thành phần axit amin vùng khớp nối và số lượng hoặc vị trí của các liên kết disulfit chuỗi nặng của nó, isotyp của Ig có thể được chia thành các phân lớp khác nhau, ví dụ, IgG có thể được phân loại thành IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Các chuỗi nhẹ được phân loại thành chuỗi κ hoặc chuỗi λ tùy theo sự khác biệt trong vùng không đổi. Mỗi lớp trong 5 lớp của Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ .

Trong sáng chế, chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế còn có thể bao gồm vùng không đổi chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi κ , λ của người hoặc chuột hoặc biến thể của chúng.

Trong sáng chế, chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế còn có thể bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người hoặc chuột hoặc biến thể của chúng.

Khoảng 110 trình tự axit amin liền kề với đầu cùng N của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể là biến đổi rất nhiều, được biết đến như vùng biến đổi (vùng Fv); phần còn lại của trình tự axit amin gần với đầu cùng C là tương đối ổn định, được biết đến như các vùng không đổi. Vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến đổi (HVR : hypervariable region) và 4 vùng khung tương đối bảo toàn (FR : framework region). 3 vùng siêu biến đổi này quyết định sự đặc hiệu của kháng thể, còn được biết đến như vùng xác định bổ sung (CDR : complementarity determining region). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR : light chain variable region) và mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR : heavy chain variable region) bao gồm 3 vùng CDR và 4 vùng FR, với thứ tự lần lượt từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxyl theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. 3 vùng CDR của chuỗi nhẹ đề cập đến LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và 3 vùng CDR của chuỗi nặng đề cập đến HCDR1, HCDR2, và HCDR3. Số lượng và vị trí các gốc axit amin của vùng CDR trong các vùng LCVR và HCVR của kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên ở đây phù

hợp với tiêu chí đánh số Kabat đã biết (LCDR1-3, HCDE2-3), hoặc phù hợp với tiêu chí đánh số Kabat và Chothia (HCDR1).

Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể chuột, kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người, tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người.

Thuật ngữ “kháng thể chuột” theo sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng chống lại PD-L1 của người được điều chế theo kiến thức của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Trong khi điều chế, đối tượng thử nghiệm được tiêm với kháng nguyên PD-L1, và sau đó tách khỏi lai biểu hiện kháng thể có trình tự hoặc các đặc tính chức năng mong muốn. Trong phương án được ưu tiên theo sáng chế, kháng thể PD-L1 chuột hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có thể còn bao gồm vùng không đổi chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ ở chuột hoặc biến thể của nó, hoặc có thể còn bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 chuột hoặc biến thể của nó.

Thuật ngữ “kháng thể khảm” là kháng thể được tạo thành bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể chuột với vùng không đổi của kháng thể người, và kháng thể khảm có thể làm giảm bớt đáp ứng miễn dịch gây ra bởi kháng thể chuột. Để tạo ra kháng thể khảm, đầu tiên khối lai tiết kháng thể đơn dòng đặc hiệu của chuột được tạo ra, gen vùng biến đổi được tạo bản sao từ các tế bào khối lai chuột. Sau đó, gen vùng không đổi của kháng thể người được tạo bản sao như mong muốn, gen vùng biến đổi của chuột được nối với gen vùng không đổi của người để tạo thành gen khảm có thể được chèn vào vectơ người, và cuối cùng phân tử kháng thể khảm được biểu hiện trong hệ thống công nghiệp nhân chuẩn hoặc tiền nhân. Trong phương án được ưu tiên theo sáng chế, chuỗi nhẹ của kháng thể khảm PD-L1 còn bao gồm các vùng không đổi chuỗi nhẹ trong chuỗi κ , λ của người, hoặc biến thể của chúng. Chuỗi nặng của kháng thể khảm PD-L1 còn bao gồm các vùng không đổi chuỗi nặng trong IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người, hoặc biến thể của chúng. Vùng không đổi của kháng thể người có thể được chọn từ vùng không đổi chuỗi nặng trong IgG1, IgG2,

IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc biến thể của nó, tốt hơn là bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng trong IgG2 hoặc IgG4, hoặc IgG4 của người mà không có ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : tính gây độc tế bào qua trung gian bởi kháng thể) sau đột biến axit amin.

Thuật ngữ “kháng thể được làm tương thích với người”, còn được biết đến như kháng thể ghép CDR, đề cập đến kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR chuột vào khung vùng biến đổi của kháng thể người, là, kháng thể được tạo ra từ loại khác nhau của trình tự khung kháng thể mầm người. Kháng thể được làm tương thích với người khắc phục nhược điểm của đáp ứng kháng thể mạnh gây ra bởi kháng thể khảm, mang lượng lớn các thành phần protein của chuột. Các trình tự khung này có thể thu được từ cơ sở ADN công cộng bao gồm các trình tự gen kháng thể mầm hoặc tài liệu tham khảo đã được công bố. Ví dụ, các trình tự ADN mầm trong các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự mầm của người “VBase” (có sẵn trên trang web www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), cũng như có thể được tìm thấy trong *Kabat, E A, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.* Để tránh làm giảm hoạt động trong khi làm giảm tính gây miễn dịch, các trình tự khung trong vùng biến đổi của kháng thể người được tạo các đột biến đảo tối thiểu hoặc các đột biến ngược để duy trì hoạt động. Kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế còn bao gồm kháng thể được làm tương thích với người mà sự thuần thực ái lực CDR được thực hiện bằng biểu hiện thực khuẩn.

“Đoạn liên kết kháng nguyên” theo sáng chế đề cập đến đoạn Fab, đoạn Fab', hoặc đoạn F(ab')₂ có hoạt động liên kết kháng nguyên, cũng như đoạn Fv hoặc scFv liên kết với PD-L1 của người; Nó bao gồm một hoặc nhiều vùng CDR của các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 12. Đoạn Fv bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, không có vùng không đổi, và nó là đoạn kháng thể tối thiểu có tất cả các vị trí liên kết kháng nguyên. Thông thường, kháng thể Fv còn bao gồm đoạn liên kết polypeptit giữa các vùng chức năng VH và VL, và có khả năng tạo ra cấu trúc cần

thiết cho liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, các đoạn liên kết khác nhau có thể được sử dụng để nối các vùng biến đổi của hai kháng thể để tạo thành chuỗi polypeptit, được đề cập đến như kháng thể chuỗi đơn hoặc Fv chuỗi đơn (scFv). Thuật ngữ “liên kết với PD-L1” theo sáng chế có nghĩa là nó có khả năng tương tác với PD-L1 của người. Thuật ngữ “các vị trí liên kết kháng nguyên” theo sáng chế đề cập đến các vị trí ba chiều không liên tục trên kháng nguyên, được nhận ra bởi kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế các kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên là được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được tìm thấy trong, ví dụ, *Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbore*, Chapters 5-8 và 15. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch với PD-L1 của người hoặc một đoạn của PD-L1 của người, và kháng thể tạo ra có thể được hồi tính, được tinh chế, và được đưa vào giải trình tự axit amin bằng phương pháp thông thường. Đoạn liên kết kháng nguyên cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế được chỉnh sửa di truyền để đưa một hoặc nhiều vùng khung của người (Frs : framework regions) vào vùng CDR có nguồn gốc không từ người. Các trình tự mã FR của người có thể thu được từ ImMunoGeneTics (IMGT) qua trang web <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN012441351.

Kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên được chỉnh sửa theo sáng chế có thể được tạo ra và được tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tạo bản sao và được tái tổ hợp thành vectơ biểu hiện GS. Sau đó, vectơ biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể chuyển nạp ổn định vào các tế bào CHO. Như phương pháp được khuyến nghị nhiều hơn được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, các hệ thống biểu hiện ở động vật có vú sẽ tạo nên sự glycosyl hóa của các kháng thể, thường là ở đầu cùng N được bảo toàn cao trong vùng Fc. Các bản sao ổn định có thể thu được thông qua sự biểu hiện của kháng thể liên kết đặc hiệu với PD-L1 của người. Các bản sao dương tính có thể được phát triển trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh để sản

xuất kháng thể trong các bể phản ứng sinh học. Môi trường nuôi cấy, mà tại đó kháng thể được tiết vào, có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, môi trường này có thể được thuận tiện cho vào cột Protein A hoặc G Sepharose FF đã được cân bằng với chất đệm điều chỉnh. Cột này được rửa để loại bỏ các thành phần liên kết không đặc hiệu. Kháng thể đã liên kết được rửa giải bằng gradien pH và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE, và sau đó được gộp lại. Kháng thể có thể được lọc và được cô đặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Kết tụ hòa tan và các multimer có thể được hiệu quả loại bỏ bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm kỹ thuật loại trừ kích thước hoặc trao đổi ion. Sản phẩm tạo ra có thể được bảo quản lạnh ngay lập tức, ví dụ ở -70°C , hoặc có thể được đông khô.

“Các biến đổi bảo toàn” hoặc “thay thế hoặc thể bảo toàn” đề cập đến các thay thế các axit amin trong protein với các axit amin khác có các đặc tính tương tự (ví dụ điện tích, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/ưa nước, cấu trúc khung và độ cứng, v.v...), những sự thay đổi này có thể thường xuyên được tạo ra mà không làm biến đổi hoạt tính sinh học của protein. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này nhận biết rằng, nhìn chung, các thay thế axit amin đơn trong các vùng không thiết yếu của polypeptit không làm biến đổi đáng kể hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, *Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)*). Ngoài ra, các thay thế của các axit amin giống nhau về cấu trúc hoặc chức năng ít có khả năng gây rối loạn hoạt tính sinh học.

“Độ tương đồng” đề cập đến sự giống nhau về trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai polypeptit. Khi một vị trí trong cả hai trình tự so sánh được giữ bởi cùng bazơ hoặc tiểu đơn vị monome axit amin, ví dụ, nếu một vị trí trong mỗi phân tử trong hai phân tử ADN được giữ bởi adenin, thì các phân tử này là tương đồng tại vị trí đó. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là một hàm của số các vị trí tương thích hoặc phù hợp được chia sẻ bởi hai trình tự được chia bởi số vị trí được so sánh $\times 100$. Ví dụ, trong xếp thẳng hàng tối ưu cách trình tự, nếu có 6 vị trí tương thích hoặc phù hợp trong 10 vị trí của hai trình tự, thì hai trình tự đó có 60% tương đồng. Nhìn chung, các so sánh được thực hiện khi hai trình tự xếp thẳng hàng

để đạt được phần trăm tương đồng cao nhất.

“Việc sử dụng” và “việc điều trị” cho động vật, người, đối tượng thí nghiệm, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, đề cập đến việc tiếp xúc của động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan, hoặc chất lỏng sinh học với tác nhân chuẩn đoán, trị liệu, được ngoại sinh, hoặc chế phẩm. “Việc sử dụng” và “việc điều trị” có thể đề cập đến, ví dụ, nghiên cứu, chuẩn đoán, được động học, trị liệu và các phương pháp thí nghiệm. Việc điều trị tế bào bao gồm việc tiếp xúc của chất phản ứng với tế bào, cũng như việc tiếp xúc của chất phản ứng với chất lỏng, nơi chất lỏng này tiếp xúc với tế bào. “Việc sử dụng” và “việc điều trị” còn nghĩa là các điều trị *in vitro* và *ex vivo*, ví dụ, cho tế bào, bằng chất phản ứng, hợp chất liên kết, chuẩn đoán, hoặc bằng tế bào khác. “Việc điều trị”, khi áp dụng cho người, động vật, hoặc đối tượng nghiên cứu, đề cập đến các phương pháp điều trị chữa bệnh, phòng bệnh hoặc ngăn ngừa bệnh, nghiên cứu và các ứng dụng chuẩn đoán.

“Điều trị” nghĩa là sử dụng chất điều trị, như chế phẩm bao gồm hợp chất bất kỳ trong các hợp chất liên kết theo sáng chế, vào bên trong hoặc bên ngoài cho bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà chất điều trị này đã biết là có hoạt tính điều trị. Thông thường, chất này được sử dụng với lượng hiệu quả để giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng bệnh cho bệnh nhân hoặc cộng đồng được điều trị, sao cho tạo ra sự thoái lui hoặc ức chế sự tiến triển của (các) triệu chứng đến mức độ bất kỳ có thể đo được một cách lâm sàng. Lượng chất điều trị hiệu quả để làm giảm bớt triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ (còn được đề cập là “lượng có hiệu quả điều trị”) có thể khác nhau tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng của thuốc để gây ra đáp ứng mong muốn cho bệnh nhân. Việc giảm bớt triệu chứng bệnh có thể được đánh giá bằng phép đo lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi các bác sĩ điều trị hoặc những người chăm sóc sức khỏe có tay nghề khác để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng đó. Trong khi một phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc sản phẩm điều chế) có thể không hiệu quả trong việc giảm bớt (các) triệu chứng bệnh được quan tâm cho mọi bệnh nhân, nhưng nên làm giảm bớt (các) triệu chứng của bệnh đích được

quan tâm cho số lượng bệnh nhân đáng kể có ý nghĩa thống kê như được xác định bằng kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như kiểm định t Student, kiểm định chi bình phương (chi-square test), kiểm định U theo Mann và Whitney, kiểm định Kruskal-Wallis (Kiểm định H), kiểm định Jonckheere-Terpstra và kiểm định Wilcoxon.

“Lượng có hiệu quả” bao gồm lượng đủ để cải thiện hoặc ngăn chặn triệu chứng hoặc dấu hiệu của tình trạng bệnh. Lượng có hiệu quả còn nghĩa là lượng đủ để cho phép hoặc hỗ trợ việc chuẩn đoán. Lượng có hiệu quả cho bệnh nhân hoặc đối tượng động vật cụ thể có thể khác nhau tùy vào các yếu tố như tình trạng được điều trị, sức khỏe tổng thể của bệnh nhân, con đường và liều sử dụng và mức độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ. Lượng có hiệu quả có thể là liều tối đa hoặc phác đồ sử dụng liều để tránh các tác dụng phụ đáng kể hoặc tác dụng độc hại.

“Giá trị T_m” đề cập đến điểm giữa biến tính nhiệt của protein, là, nhiệt độ mà một nửa protein bị mở gấp và cấu trúc không gian của protein bị phá hủy. Do đó, giá trị T_m càng cao, thì độ ổn định nhiệt của protein sẽ càng cao.

Sáng chế còn được mô tả với các phương án dưới đây, mà không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các phương pháp thử nghiệm trong các phương án của sáng chế không quy định các điều kiện cụ thể mà thường được thực hiện theo các điều kiện thông thường được khuyến nghị bởi nhà sản xuất nguyên liệu thô hoặc hàng hóa. Các chất phản ứng không có nguồn cụ thể là các chất phản ứng thông thường có sẵn trên thị trường.

Theo các phương án, sắc ký lỏng áp suất cao Agilent-HPLC 1260 (cột Waters Xbridge® BEH 200Å SEC 3,5 µm 7,8 × 300 mm và cột Thermo ProPac™ WCX-10 BioLC™, 250 × 4 mm) được sử dụng để đo SE-HPLC và IEC-HPLC. Thiết bị điện di mao quản Beckman PA800 plus (Kit phân tích SDS-Gel MW) được sử dụng để đo CE-SDS khử và CE-SDS không khử. Nhiệt lượng kế quét vi sai GE MicroCal VP-Capillary DSC được sử dụng để đo điểm giữa nhiệt độ biến tính nhiệt của protein (T_m). Chiết áp kích thước hạt nano Malvern Zetasizer Nano ZS được sử dụng để đo

kích thước hạt trung bình DLS (Dynamic Light Scattering : Tán xạ ánh sáng động).

Phương án 1: Điều chế kháng thể PD-L1

(1) Điều chế kháng nguyên PD-L1 và protein được sử dụng để phát hiện

Gen PD-L1 người độ dài đầy đủ (Sino Biological Inc., HG10084-M) của đồng dạng 1 phối tử 1 chết tế bào có lập trình UniProt (PD-L1 : Programmed Cell Death1 Ligand1) (SEQ ID NO: 19) được sử dụng làm khuôn cho PD-L1 theo sáng chế. Trình tự gen mã hóa kháng nguyên theo sáng chế và protein được sử dụng để phát hiện được tạo ra, tùy ý được tái tổ hợp với đoạn chuỗi nặng Fc của kháng thể (như IgG1 của người), được tách dòng vào vector pTT5 (Biovector, Cat#: 102762) hoặc vector pTarget (promega, A1410), được biểu hiện tạm thời trong các tế bào 293F (Invitrogen, R79007) hoặc biểu hiện ổn định trong các tế bào CHO-S (Invitrogen, k9000-20), và được tinh chế để thu được kháng nguyên và protein phát hiện theo sáng chế. Gen PD-1 của người được mua từ ORIGENE, Art. No. SC117011, NCBI Reference Sequence: NM_005018.1

1. Trình tự axit amin PD-L1 độ dài đầy đủ của người

MRIFAVFIEM TYWHLNNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD
QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV
NAPYNKINQR ILVDPVTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT
TTNSKREEKL FNVSTSLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP
LAHPPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR LKGRMMDVK KCGIQDTNSK
KQSDTHLEET

SEQ ID NO: 19

Lưu ý: Phần được gạch chân đôi là peptit tín hiệu (1-18); phần được gạch chân đơn là vùng ngoại bào (19-238) của PD-L1, trong đó 19-127 là vùng typ V giống Ig, 133-225 là vùng typ C2 giống Ig; phần được gạch chân nét đứt là vùng xuyên màng (239-259); và phần được in nghiêng là vùng trong tế bào chất (260-290).

2. Kháng nguyên: PD-L1 với các đuôi His và PADRE: PD-L1 (Vùng ngoại bào, abbr. ECD) -PADRE-His6

FT VTVPKDL YVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME

DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG
VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY
PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT
FRRLDPEENH TAE LVIPELP LAHPPNERGS GAKFVAAWTL
KAAAHHHHHH

SEQ ID NO: 20

Lưu ý: Phần được gạch chân đơn là vùng ngoại bào của PD-L1; phần được gạch chân nét đứt là nhãn PADRE; và phần được in nghiêng là nhãn đuôi His6.

3. PD-L1 với các đuôi FLAG và HIS được tạo ra; PD-L1(ECD)-Flag-His6 được sử dụng để kiểm tra hoạt động của các kháng thể theo sáng chế.

FT VTVPKDL YVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG
VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY
PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT
FRRLDPEENH TAE LVIPELP LAHPPNERDY KDDDDKHHHH HH

SEQ ID NO: 21

Lưu ý: Phần được gạch chân đơn là vùng ngoại bào của PD-L1; phần được gạch chân nét đứt là nhãn đuôi FLAG; và phần được in nghiêng là nhãn đuôi His6.

4. Protein dung hợp Fc của PD-L1: PD-L1 (ECD)-Fc được sử dụng làm kháng nguyên miễn dịch hoặc chất phản ứng phát hiện theo sáng chế.

VKL-PD-L1(ECD)-Fc(IgG1 của người)

FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG
FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVH
GEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG
GADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSS
DHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE
LVIPELPLAHPPNERDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22

Lưu ý: Phần được gạch chân đơn là vùng ngoại bào của PD-L1; và phần được in nghiêng là phần IgG1 Fc của người.

5. Protein dung hợp Fc của PD-L1: PD-L1 (ECD)-Fc được sử dụng để kiểm tra hoạt động của các kháng thể theo sáng chế.

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSP
SNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL
CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVEPKSSD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23

Lưu ý: Phần được gạch chân đơn là vùng ngoại bào (ECD) của PD-L1; và phần được in nghiêng là phần hFc (IgG1 của người).

(2) Tinh chế PD-L1, protein tái tổ hợp PD-1 cũng như kháng thể khối lai và kháng thể tái tổ hợp

1. Tinh chế “PD-L1 với đuôi His và PADRE”: Protein tái tổ hợp PD-L1 (ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 20)

Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ các tạp chất, và chất đệm được thay thế bằng PBS, sau đó thêm imidazol đến nồng độ cuối là 5 mM. Cột niken được cân bằng với dung dịch PBS bao gồm 5 mM imidazol và được rửa bằng 2-5 thể tích cột. Mẫu dịch nổi được nạp vào cột Ni (GE, 17-5318-01). Cột này được rửa bằng PBS bao gồm 5 mM imidazol cho đến khi chỉ số A280 giảm xuống đường cơ sở. Cột này được rửa bằng PBS cộng với 10 mM imidazol để loại bỏ protein không tinh khiết liên kết không đặc hiệu, và thu chất rửa thải ra. Protein đích được rửa giải bằng PBS bao gồm 300 mM imidazol, và đỉnh rửa giải được thu lại. Dịch rửa giải thu được được cô đặc và được tinh chế thêm bằng sắc ký gel Superdex 200 (GE) với PBS làm pha động. Các đỉnh polyme được loại bỏ và các đỉnh rửa giải được thu lại. Protein thu được được xác nhận bằng xác định điện di, lập bản đồ peptit (Agilent, 6530 Q-TOF) và LC-MS (Agilent, 6530 Q-TOF), và được chia ra để sử dụng sau đó. PD-L1 với đuôi His và PADRE: Protein tái tổ hợp PD-L1 (ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 2) được thu lại và được sử dụng làm kháng nguyên cho kháng thể theo sáng chế.

2. Tinh chế protein tái tổ hợp PD-L1 (ECD)-Flag-His6 (SEQ ID NO: 21) với đuôi His và đuôi Flag

Mẫu này được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ các tạp chất và được cô đặc đến thể thích mong muốn. Đỉnh protein được rửa giải từ cột IMAC trên đây được nạp vào cột ái lực flag đã được cân bằng bởi 0,5×PBS (Sigma, A2220) và được rửa bằng 2-5 thể tích cột. Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào được nạp vào cột này sau khi loại bỏ các tạp chất. Cột này được rửa bằng 0,5×PBS cho đến khi chỉ số A280 giảm xuống đường cơ sở. Cột này được rửa bằng PBS bao gồm 0,3 M NaCl, và protein không tinh khiết được rửa giải và được thu lại. Protein đích được rửa giải bằng 0,1 M axit axetic (pH

3,5-4,0) và được thu lại, sau đó điều chỉnh độ pH đến trung hòa. Dịch rửa thu được được cô đặc và được tinh chế thêm bằng sắc ký gel Superdex 200 (GE) với PBS làm pha động. Các đỉnh polyme được loại bỏ và các đỉnh rửa giải được thu lại. Mẫu thu được được xác nhận bằng xác định điện di, lập bản đồ peptit và LC-MS, và được chia ra để sử dụng sau đó. PD-L1 với đuôi His và đuôi Flag, tức là PD-L1 (ECD)-Flag-His6 (SEQ ID NO: 3) được thu lại để kiểm tra hoạt động của kháng thể theo sáng chế.

3. Tinh chế protein dung hợp Fc của PD-L1 và PD-1

Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ các tạp chất, được cô đặc đến thể tích mong muốn, và được nạp lên cột Protein A (GE, 17-5438-01). Cột này được rửa bằng PBS cho đến khi chỉ số A280 giảm xuống đến đường cơ sở. Protein quan tâm được rửa giải bằng 100 mM natri axetat ở độ pH 3,0. Protein được đã trung hoà bằng 1M TrisHCl được tinh chế thêm bằng sắc ký gel đã cân bằng với PBS Superdex 200 (GE). Các đỉnh polyme được loại bỏ và các đỉnh rửa giải được thu lại và được chia ra để sử dụng sau đó. Phương pháp này được sử dụng để tinh chế PD-L1 (ECD)-Fc (SEQ ID NO: 4) và PD-1 (ECD)-Fc (SEQ ID NO: 5). PD-L1 (ECD)-Fc có thể được sử dụng làm kháng nguyên gây miễn dịch hoặc thuốc thử phát hiện theo sáng chế, và PD-1 (ECD)-Fc có thể được sử dụng để kiểm tra hoạt động của kháng thể theo sáng chế.

(3) Điều chế kháng thể đơn dòng khối lai kháng PD-L1 của người

1. Gây miễn dịch

Kháng thể đơn dòng kháng PD-L1 của người được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột, trong đó chuột được sử dụng là chuột trắng SJL cái 6 tuần tuổi (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., số giấy phép sản xuất động vật: SCXK (Beijing) 2012-0001). Muôi trường nuôi dưỡng: Mức SPF. Sau khi mua, các con chuột được nuôi trong môi trường phòng thí nghiệm (điều chỉnh chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, nhiệt độ 20-25°C; độ ẩm 40-60%) trong 1 tuần. Các con chuột thích nghi với môi trường này được gây miễn dịch theo hai sơ đồ (Sơ đồ A và Sơ đồ B), 6-10

mỗi nhóm. Kháng nguyên gây miễn dịch là PD-L1 với đuôi His và PADRE: Protein tái tổ hợp PD-L1 (ECD)-PADRE-His6 (SEQ ID NO: 20).

Trong Sơ đồ A, tá dược Freund (sigma Lot Num: F5881/F5506) được sử dụng để nhũ hoá: tá dược Freund đầy đủ (CFA : complete Freund's adjuvant) được sử dụng để gây miễn dịch sơ cấp, và tá dược Freund không đầy đủ (IFA : incomplete Freund's adjuvant) được sử dụng để gây miễn dịch tăng cường nghỉ. Tỷ lệ của kháng nguyên so với tá dược là 1:1, 100 µg/chuột (gây miễn dịch sơ cấp), 50 µg/chuột (gây miễn dịch tăng cường). Kháng nguyên đã nhũ hoá được tiêm trong màng bụng với 100µg/chuột ở Ngày 0, và được tiêm một lần mỗi hai tuần sau khi gây miễn dịch sơ cấp trong tổng số 6-8 tuần.

Trong Sơ đồ B, Titermax (sigma Lot Num: T2684) và Alum (Thremo Lot Num: 77161) được sử dụng để gây miễn dịch chéo. Tỷ lệ của kháng nguyên so với tá dược (titermax) là 1:1, và tỷ lệ của kháng nguyên so với tá dược (Alum) là 3:1, 10-20 µg/mỗi chuột (gây miễn dịch sơ cấp), và 5 µg/muỗi chuột (gây miễn dịch tăng cường). Kháng nguyên đã nhũ hoá được tiêm trong màng bụng với 20/10µg/chuột ở Ngày 0, và được tiêm một lần một tuần sau khi gây miễn dịch sơ cấp. Titermax được sử dụng hoán đổi với Alum trong 6-11 tuần. Sau 4 tuần gây miễn dịch, kháng nguyên được đưa vào bằng cách tiêm lưng hoặc trong màng bụng tùy vào tình trạng của cục lưng và sự sưng của bụng.

2. Dung hợp tế bào

Các con chuột với hiệu giá kháng thể huyết thanh cao mà có xu hướng đạt đến trạng thái ổn định được chọn để dung hợp tế bào lách. Việc gây miễn dịch sóc được tiến hành bằng cách tiêm trong màng bụng 72 giờ trước khi dung hợp tế bào lách. Các tế bào khối lai thu được bằng cách dung hợp các tế bào lympho lá lách với các tế bào myeloma Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) thông qua quy trình dung hợp qua trung gian PEG được tối ưu hoá. Các tế bào khối lai được tái huyền phù trong môi trường đầu đủ HAT (môi trường RPMI-1640 bao gồm 20% FBS, 1×HAT và 1×OPI) và được chia ra vào các đĩa nuôi tế bào 96 giếng (1×10⁵/150 µL/giếng), sau đó ủ ở

37°C trong 5% CO₂. Ở ngày thứ 5 sau dung hợp, thêm môi trường đầy đủ HAT với 50 µL/giếng, và được ủ ở 37°C trong 5% CO₂. Từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 8 sau dung hợp, theo mật độ phát triển của tế bào, toàn bộ môi trường được thay bằng môi trường đầy đủ HT (môi trường RPMI-1640 bao gồm 20% FBS, 1×HT và 1×OPI) với 200 µL/giếng, và được ủ ở 37°C trong 5% CO₂.

3. Sàng lọc tế bào khối lai

Từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 11 sau dung hợp, phương pháp ELISA cho liên kết PD-L1 được tiến hành theo mật độ phát triển của tế bào. Các tế bào trong giếng dương tính mà được phát hiện trong ELISA được đưa vào phong bế ELISA cho liên kết PD-L1/PD-1. Môi trường trong các giếng dương tính được thay đổi, và các tế bào dương tính được mở rộng vào các đĩa 24 giếng theo mật độ tế bào. Các tế bào này được chuyển vào đĩa 24 giếng được đưa vào kiểm tra lại và sau đó được đưa vào bảo quản tế bào và tạo dòng thứ cấp ban đầu. Tế bào dương tính đã được sàng lọc sau khi tạo dòng thứ cấp ban đầu được đưa vào bảo quản tế bào, sau đó tạo dòng thứ cấp lần thứ hai. Tế bào được sàng lọc sau khi tạo dòng thứ cấp ban đầu được đưa vào bảo quản tế bào, sau đó biểu hiện protein. Các tế bào khối lai mà phong bế liên kết của PD-L1 và PD-1 thu được bằng nhiều dung hợp.

Các tế bào bản sao khối lai 1 và 2 được sàng lọc bằng thử nghiệm phong bế và thử nghiệm liên kết. Các kháng thể này còn được điều chế bằng phương pháp cổ trướng hoặc bằng phương pháp nuôi tế bào không huyết thanh, và các kháng thể này được tinh chế theo các phương án tinh chế để sử dụng trong các phương án thử nghiệm.

Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể chuột thu được bằng cách giải trình tự, trong đó các trình tự vùng biến đổi CDR của các bản sao khối lai được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ
--	------------	-----------

1	HCDR1	NDYWX1 SEQ ID NO: 1	LCDR1	KSSQSLFYX2SNQKX3SLA SEQ ID NO: 4
	HCDR2	YISYTGSTYYNPSLKS SEQ ID NO: 2	LCDR2	GASTRES SEQ ID NO: 5
	HCDR3	SGGWLAPFDY SEQ ID NO: 3	LCDR3	QQYYGYPYT SEQ ID NO: 6
2	HCDR1	SYWMH SEQ ID NO: 7	LCDR1	RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 10
	HCDR2	RIX4PNSGX5TSYNEKFKN SEQ ID NO: 8	LCDR2	AASNLES SEQ ID NO: 11
	HCDR3	GGSSYDYFDY SEQ ID NO: 9	LCDR3	QQSFEDPLT SEQ ID NO: 12

trong đó X_1 được chọn từ N hoặc T, X_2 được chọn từ R hoặc H, X_3 được chọn từ N hoặc H, X_4 được chọn từ H hoặc G, và X_5 được chọn từ G hoặc F.

(4) Làm tương thích với người kháng thể đơn dòng khối lai kháng PD-L1 của người

Các gen mẫu với độ tương đồng cao trong vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được chọn làm các khuôn bằng cách xếp thẳng hàng với cơ sở dữ liệu gen mẫu vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể người trong phần mềm IMGT và MOE. Các CDR của kháng thể chuột 1 và 2 được ghép vào khuôn được làm tương thích với người tương ứng, và được làm thuần thực ái lực để tạo thành trình tự vùng biến đổi của FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Khuôn chuỗi nhẹ được làm tương thích với người của kháng thể chuột 1 là IGKV4-1*01 và hjk4,1, khuôn chuỗi nặng được làm tương thích với người là IGHV4-30-4*01 và hjh2, và các trình tự vùng biến đổi được làm tương thích với người như sau:

>Ghép 1 hVH- CDR

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWNWIRQHPGKGLEWIGYI
SYTGSTYYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSGGWLAPFD
YWGRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 24

>Ghép 1 hVL CDR

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYRSNQKNSLAWYQQKPGQPP
KLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYGYPTF
GGGTKVEIK

SEQ ID NO: 25

Khuôn chuỗi nhẹ được làm tương thích với người của kháng thể chuột 2 là IGKV7-3*01 và hjk2,1, khuôn chuỗi nặng được làm tương thích với người là IGHV1-46*01 và hjh6,1, và trình tự vùng biến đổi được làm tương thích với người là như sau:

>2- hVH.1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWM
GRIHPNSGGTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGGSS
YDYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 26

>2-hVL.1

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQQSFEDPLTFGQGT
KLEIK

SEQ ID NO: 27

Lưu ý: Thứ tự là FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, trong đó phần được in nghiêng là trình tự FR và phần được gạch chân là trình tự CDR.

(5) Tạo ra bản sao tương tích với người

Các mồi được thiết kế để tạo ra đoạn gen VH/VK của từng kháng thể được làm tương thích với người, và sau đó được tái tổ hợp tương đồng với vectơ biểu hiện pHr (với peptit tín hiệu và đoạn gen vùng không đổi (CH1-FC/CL)) để tạo ra vectơ biểu hiện kháng thể độ dài đầy đủ VH- CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr.

1. Thiết kế mồi: Phần mềm trực tuyến DNAWorks (v3,2,2) (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) được sử dụng để thiết kế số lượng lớn các mồi cho tổng hợp các đoạn gen bao gồm VH/VK cần cho việc tái tổ hợp: 5'-30bp peptit tín hiệu + VH/VK + 30bp CH1/CL-3'. Nguyên tắc thiết kế mồi: Nếu có các axit amin khác nằm giữa gen Gen đích 2 và Gen đích 1, thì một mồi khác gồm vị trí đột biến được thiết kế, như được thể hiện trong Fig. 1.

2. Cắt nối đoạn: Theo hướng dẫn sử dụng của ADN polymeraza TaKaRa Primer STAR GXL, các đoạn gen bao gồm VH/VK cần cho việc tái tổ hợp được thu lại bằng hai bước khuếch đại PCR sử dụng số lượng lớn các mồi được thiết kế ở trên.

3. Xây dựng và cắt bằng enzym vectơ biểu hiện pHr (với peptit tín hiệu và đoạn gen vùng không đổi (CH1-FC/CL))

Vectơ biểu hiện pHr (với peptit tín hiệu và đoạn gen vùng không đổi (CH1-FC/CL)) được tạo ra bằng cách sử dụng một số endonucleaza giới hạn đặc biệt với thiết kế đặc biệt trong đó trình tự nhận biết khác với các vị trí giới hạn, như BsmBI. Sơ đồ xây dựng như được thể hiện trong Fig. 2. Vectơ này được cắt bằng BsmBI, và gel được tách ra để sử dụng.

4. Xây dựng tái tổ hợp vectơ biểu hiện VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr

Các đoạn gen bao gồm VH/VK cần cho việc tái tổ hợp và cắt bằng BsmBI và vectơ biểu hiện pHr phục hồi (với peptit tín hiệu và đoạn gen vùng không đổi (CH1-FC/CL)) được cho vào các tế bào khả nạp DH5H với tỷ lệ mol là 3:1, được giữ ở bể đá 0°C trong 30 phút, được đưa vào sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây, sau đó thêm 5 lần thể tích môi trường LB, được ủ ở 37°C trong 45 phút, và trải lên đĩa LB-Amp và

được ủ ở 37°C qua đêm. Bản sao duy nhất được chọn và được gửi đi giải trình tự để thu được bản sao đích.

(6) Sự thuần thực ái lực của kháng thể kháng PD-L1 được làm tương thích với người

1. Xây dựng các vector phagemid của các kháng thể PD-L1 1 và 2 được làm tương thích với người

Các kháng thể PD-L1 1 và 2 được làm tương thích với người được xây dựng thành các vector phagemid trong kiểu scFv (VH-(GGGGS)₃-VL), tương ứng làm các trình tự kiểu hoang (tức là, trình tự bắt đầu hoặc ban đầu của nó tương ứng với các trình tự đột biến được sàng lọc để thuần thực ái lực). VH, đoạn liên kết (GGGGS)₃ và VL được lắp ráp bằng PCR chồng chéo và được nối lại thành vector phagemid thông qua các vị trí nhận biết giới hạn NcoI và NotI.

2. Xây dựng thư viện biểu hiện thực khuẩn

scFv kiểu hoang đã được xây dựng được sử dụng làm khuôn và các môi dựa trên codon được sử dụng. Trong quá trình tổng hợp môi, mỗi codon trong vùng đột biến có 50% codon kiểu hoang và 50% NNK (mỗi ngược là MNN), đã đưa các đột biến vào tất cả các vùng CDR để xây dựng thư viện đột biến. Đoạn PCR được cắt bằng NcoI và NotI, được nối thành vector phagemid, và cuối cùng được biến nạp điện vào *E. coli* TG1. Một thư viện độc lập được xây dựng bằng mỗi môi dựa trên codon, trong đó kháng thể 1 được chia thành 7 thư viện và kháng thể 2 được chia thành 8 thư viện.

3. Quét thư viện

Sau khi thư viện được phục hồi và đóng gói cho các hạt thực khuẩn để quét, kháng nguyên PD-L1 đã biotin hoá của người (ECD) và các hạt từ streptavidin được sử dụng để quét pha lỏng, và nồng độ kháng nguyên sau mỗi vòng sàng lọc bị giảm xuống so với vòng trước đó. Sau 3 vòng quét, 250 bản sao được chọn từ kháng thể 1 và kháng thể 2 và được đưa lần lượt vào ELISA thực khuẩn để phát hiện hoạt động

liên kết, sau đó giải trình tự các bản sao dương tính.

4. Phát hiện ái lực bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR : surface plasmon resonance)

Sau khi giải trình tự các bản sao, các trình tự dư thừa được loại bỏ, và các trình tự không dư thừa được chuyển hoá thành IG độ dài đầy đủ ($\gamma 1$, κ) để biểu hiện tế bào động vật có vú. IG độ dài đầy đủ sau khi tinh chế ái lực được đưa vào phát hiện ái lực sử dụng thiết bị BIAcore™ X-100 (GE Life Sciences).

Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể được làm tương thích với người 2 sau khi thuần thực ái lực được thể hiện như dưới đây:

Vùng biến đổi trong chuỗi nặng:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWM
GRIGPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGGSSY
DYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 13

trong đó, X₄ trong CDR2 là G, X₅ là F.

Vùng biến đổi trong chuỗi nhẹ:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGVPARFSGSGTDFTLINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGT
KLEIK

SEQ ID NO: 14

Lưu ý: Phần được in nghiêng trong trình tự là trình tự FR; phần được gạch chân là trình tự CDR; và vị trí được gạch chân đôi là vị trí thu được sau khi sàng lọc thuần thực ái lực.

Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể được làm tương thích với người 1

sau khi thuần thực ái lực là như sau:

Vùng biến đổi trong chuỗi nặng:

QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGGSISNDYWWIRQHPGKGLEIYGYI
SYTGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCCARSGGWLAPFD
YWGRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 28

trong đó, X₄ trong CDR1 là T.

Vùng biến đổi trong chuỗi nhẹ:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFYHSNQKHSLAWYQQKPGQPP
KLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYGYPTF
GGGTKVEIK

SEQ ID NO: 29

trong đó, CDR1 X₂ là H và X₃ là H.

Bản sao thu được bằng thuần thực ái lực được chuyển hoá thành typ IgG4, và vùng khớp nối lõi của IgG4 bao gồm đột biến S228P được chọn để thu được kháng thể không có ADCC và CDC, trong đó kháng thể thu được từ kháng thể 2 có tên là HRP00052.

Ba nucleotit cuối “TGA” của các trình tự gen SEQ ID NO: 16 và 18 sau đây là các codong dừng và không mã hoá bất kỳ axit amin nào.

Trình tự chuỗi nặng của kháng thể HRP00052

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE
WMGRIGPNSGFTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSRLSEDTAVYYCA
RGGSSYDYFDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC
 NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 15

Trình tự gen mã hoá trình tự chuỗi nặng của kháng thể HRP00052

CAGGTGCAACTGGTGACAGAGCGGTGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGC
GCAAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCT
ACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGAT
GGGCAGGATCGGGCCCAACAGTGGTTTCACTAGCTACAATGAAAAGTTC
AAGAACAGGGTAACCATGACCAGGGACACCTCCACCAGCACAGTGTATA
TGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC
CAGAGGCGGCAGCAGCTACGACTACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC
ACCGTGACCGTGAGCAGTGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
 GCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGC
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC
 AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATG
 CCCAGCACCTGAGGCTGCTGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAA
 AACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGT
 GGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC
 GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
 CAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
 AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG

GCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCG
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA
 AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
 AGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
 CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 16

Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể HRP00052

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKL
 LIYAASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTNPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFG
 QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 17

Trình tự gen mã hoá trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể HRP00052

GACATCGTGCTGACCCAGAGTCCCGCCTCACTTGCCGTGAGCCCCGG
TCAGAGGGCCACCATCACCTGTAGGGCCAGCGAGAGCGTGAGCATCCAC
GGCACCCACCTGATGCACTGGTATCAACAGAAACCCGGCCAGCCCCCA
AACTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCCGCCAG
GTTTACGCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTCACTATCAACCCC
GTGGAGGCCGAGGACACCGCCAATACTACTGCCAGCAGAGCTTCGAGG
ACCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGT
 GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
 TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
 CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA

GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG
 CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA
 CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
 TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

SEQ ID NO: 18

Lưu ý: Phần được gạch chân là trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc trình tự nucleotit mã hóa trình tự vùng biến đổi này; phần không được gạch chân là trình tự vùng không đổi của kháng thể và trình tự nucleotit tương ứng mã hoá trình tự vùng không đổi này.

Plasmit biểu hiện để biểu hiện kháng thể PD-L1 HRP00052 được xây dựng. Các trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và trình tự khởi động tương ứng của chúng và các trình tự tín hiệu polyadenyl hoá của chúng được xác nhận bằng phân tích trình tự ADN. Vector biểu hiện được biến nạp vào dòng tế bào CHO. Các bản sao biểu hiện kháng thể được chọn dựa trên sự ổn định sinh trưởng và sinh sôi, sau đó tạo ra ngân hàng giống chủ, được sử dụng để điều chế các kháng thể và tạo ra ngân hàng tế bào chủ sau đó.

Các tế bào từ ngân hàng tế bào chủ được nhân giống trong các bình lắc, các túi nuôi và các bể phản ứng sinh học giống, và các tế bào giống tạo ra được sử dụng để điều chế các sản phẩm kháng thể bằng bể phản ứng. Kháng thể tạo ra được tinh chế thêm bằng sắc ký ái lực protein A, sắc ký trao đổi cation và sắc ký trao đổi anion, cũng như bất hoạt virus pH thấp và các bước lọc để loại bỏ virus. Các bước tinh chế đặc hiệu như sau. Mẫu dịch nổi biểu hiện tế bào được nạp vào cột Protein A được cân bằng bằng chất đệm PBS (Merck, 175118824). Cột này được rửa bằng PBS cho đến khi chỉ số A280 giảm xuống đường cơ sở, và sau đó được rửa bằng chất đệm PB để loại bỏ protein không tinh khiết. Protein đích được rửa giải bằng 50 mM natri xitrat ở độ pH=3,5 và đỉnh rửa giải được thu lại. Sản phẩm tinh chế được trung hoà bằng 1M Tris và được nạp lên cột sắc ký anion (GE, 17-5316-10) được cân bằng với chất đệm PB, và đỉnh chảy qua được thu lại và được điều chỉnh đến độ pH=5,0 bằng 1 M axit

xitric. Sau sắc ký anion, protein được tinh chế thêm trên cột sắc ký cation (Merck, 1,168882) được cân bằng với chất đệm xitrat (pH=5,0). Protein đích được rửa giải bằng chất đệm xitrat (pH=5,0) bao gồm 0,18 M natri clorua, và đỉnh rửa giải được thu lại và được chia ra để sử dụng sau đó.

Phương án 2

Các thử nghiệm này được thiết kế dựa trên hệ chất đệm, nồng độ chất đệm, giá trị pH, loại sacarit và nồng độ sacarit trong sản phẩm điều chế PD-L1 (1 mg/mL). Giá trị T_m của mẫu được xác định bằng kỹ thuật DSC để sàng lọc ban đầu chế phẩm điều chế.

Hệ chất đệm, nồng độ chất đệm, giá trị pH, loại sacarit và nồng độ sacarit được sử dụng làm các yếu tố, và giá trị T_m được sử dụng làm giá trị đáp ứng để thiết kế thử nghiệm và tạo ra bảng thiết kế. Giá trị T_m được xác định theo các nhóm thử nghiệm trong bảng thiết kế.

Bảng 2 Kết quả DSC với đám ứng giá trị T_m

	Hệ chất đệm	Nồng độ chất đệm (mM)	Độ pH	Loại sacarit	Nồng độ sacarit (%)	T_m
1	Axit suxinic-natri suxinat	10	5	Trehaloza	3	83,35
2	Axit suxinic-natri suxinat	10	5,3	Sucroza	6	84,13
3	Axit suxinic-natri suxinat	20	5,6	Sucroza	6	83,89
4	Axit suxinic-natri suxinat	30	5	Sucroza	6	83,06
5	Axit suxinic-natri suxinat	30	5,6	Trehaloza	3	83,49

6	Axit axetic-natri axetat	10	5	Sucroza	9	84,57
7	Axit axetic-natri axetat	10	5,6	Sucroza	3	84,15
8	Axit axetic-natri axetat	30	5	Trehaloza	6	84,03
9	Axit axetic-natri axetat	30	5,6	Sucroza	9	84,51
10	Histidin-histidin hydroclorua	10	5	Sucroza	6	82,41
11	Histidin-histidin hydroclorua	10	5,6	Trehaloza	9	83,96
12	Histidin-histidin hydroclorua	20	5,3	Trehaloza	3	81,92
13	Histidin-histidin hydroclorua	30	5	Trehaloza	9	80,85
14	Histidin-histidin hydroclorua	30	5,6	Sucroza	6	83,03
15	Axit xitric-dinatri phosphat	10	5	Trehaloza	6	83,41
16	Axit xitric-dinatri phosphat	10	5,6	Sucroza	3	83,53
17	Axit xitric-dinatri phosphat	30	5	Sucroza	3	82,61
18	Axit xitric-dinatri phosphat	30	5,6	Trehaloza	6	83,87

Giá trị T_m được sử dụng làm giá trị đáp ứng và mô hình được phù hợp theo các kết quả thử nghiệm. R^2 là 0,99987, R^2 được điều chỉnh là 0,9979113, và $P = 0,0348 < 0,05$ trong phân tích phương sai, chỉ ra rằng mô hình này là hiệu quả và các

kết quả là đáng tin cậy.

Lưu ý: Đơn vị của nồng độ sacarit là trong g/100mL.

Theo nguyên tắc tối đa hóa giá trị của T_m , chế phẩm lựa chọn sơ bộ bởi các sơ đồ hiệu ứng chính của các yếu tố T_m (Fig. 3). Đối với hệ chất đệm, (natri) axetat là tốt hơn, sau đó là (natri) suxinat; khi nồng độ chất đệm là 20-30 mM, thì giá trị T_m là cao hơn; độ pH=5-5,6 không có tác động đáng kể đến giá trị T_m ; nồng độ sacarit tốt nhất là 6%.

Phương án 3

Kháng thể kháng PD-L1 (HRP00052) được điều chế thành chế phẩm lần lượt bao gồm 10 mM (natri) suxinat, (natri) axetat, 60 mg/mL sucroza và 0,2 mg/mL polysorbat 20 ở độ pH=5,0-5,5 và nồng độ protein là 50 mg/mL. Từng chế phẩm được lọc và được nạp vào lọ tiêm thủy tinh borosilicat trung tính được bịt kín bằng nút cao su bromobutyl để quan sát ổn định lâu dài ở 2-8°C. Độ ổn định của mẫu được thể hiện bởi các đặc điểm khác nhau được hiển thị trong Bảng 3.

Màu, vẻ bề ngoài và độ rõ ràng của mẫu được xác định bằng kiểm tra trực quan mẫu dưới ánh sáng huỳnh quang trắng ở nhiệt độ trong phòng với nền đen. Độ tinh khiết của các mẫu được đánh giá thêm bằng sắc ký loại trừ kích thước hiệu năng cao (HP-SEC), trong đó phần trăm của monome cũng như phần trăm của chất khối lượng phân tử lớn (có thể là các chất kết tụ) và các đỉnh rửa giải ra muộn (có thể là các sản phẩm phân hủy) được xác định. Độ tinh khiết được đánh giá bằng tìm ra sự có mặt của các biến thể axit hoặc bazơ sử dụng sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao (HP-IEX) và các kết quả được thể hiện dưới dạng phần trăm trong tổng chất được quan sát. Các mẫu được phân tích bằng kỹ thuật CE-SDS trong đó các protein được biến tính bằng natri dodecyl sulfat (SDS) trong các điều kiện khử và không khử và được tách bằng cách sử dụng điện di mao quản (CE : capillary electrophoresis). Các protein được tách dựa trên khối lượng phân tử biểu kiến của chúng. Trong điều kiện không khử, tất cả các chất ngoại trừ đỉnh IgG chính được phân loại là các tạp chất. Trong điều

kiện khử, IgG được tách ra thành chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và tất cả các chất khác được phân loại là các tạp chất.

Các kết quả cho thấy rằng độ ổn định của kháng thể kháng PD-L1 trong hệ chất đệm suxinat là tốt hơn đáng kể so với hệ chất đệm axetat; và kháng thể kháng PD-L1 rất ổn định ở độ pH=5,0-5,5.

Bảng 3. Tác động của độ pH và hệ chất đệm đến độ ổn định lâu dài của kháng thể PD-L1 ở 2-8°C

Chất đệm	Độ pH	Thời gian (tháng)	Vẻ bề ngoài	SEC (%khu vực)		IEC (%khu vực)			CE-SDS (%CPA)	
				Monome	Polyme	Đỉnh axit	Đỉnh chính	Đỉnh bazơ	Khử	Không khử
(natri) axetat	5,0	0	Rõ ràng và trong suốt	98,30	1,0	21,0	63,7	15,3	97,40	96,00
		3	Rõ ràng và trong suốt	98,30	1,0	24,1	62,2	13,7	98,76	95,30
		6	Với các hạt lơ lửng nhỏ như khói	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
(natri) axetat	5,2	0	Rõ ràng và trong suốt	98,3	1,0	21,1	63,7	15,2	97,20	96,10
		3	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,1	24,1	61,8	14,0	98,74	95,45
		6	Với các	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

			hạt lơ lửng nhỏ như khói							
(natri) axetat	5,5	0	Rõ ràng và trong suốt	98,3	1,0	21,0	64,1	15,0	97,2 0	96,10
		3	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,1	24,0	62,4	13,6	98,7 6	95,41
		6	Với các hạt lơ lửng nhỏ như khói	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
(natri) suxinat	5,0	0	Rõ ràng và trong suốt	98,4	1,0	21,4	63,6	14,9	97,8 0	96,10
		3	Rõ ràng và trong suốt	98,3	1,0	24,4	61,5	14,1	98,6 5	95,85
		6	Rõ ràng và trong suốt	97,2	0,7	25,0	60,6	14,4	98,4 3	96,11
(natri) suxinat	5,2	0	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,0	21,9	62,5	15,6	97,4 0	95,80
		3	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,0	24,3	61,1	14,6	98,6 4	95,20
		6	Rõ ràng	97,2	0,7	24,9	60,7	14,4	98,4	96,15

			và trong suốt						4	
(natri) suxinat	5,5	0	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,1	23,0	62,4	14,7	97,50	95,90
		3	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,1	24,1	61,6	14,3	98,61	95,45
		6	Rõ ràng và trong suốt	97,2	0,7	24,9	60,6	14,5	97,66	96,19

Phương án 4

Kháng thể kháng PD-L1 được điều chế thành chế phẩm lần lượt bao gồm 60 mg/mL sucroza và 0,2 mg/mL polysorbat 20 trong 10 mM và 20 mM (natri) suxinat ở độ pH=5,2, và nồng độ protein là 50 mg/mL. Từng chế phẩm được lọc và được nạp vào lọ tiêm thủy tinh borosilicat trung tính được bịt kín bằng nút cao su bromobutyl, sau đó tăng tốc ở 40°C và quan sát độ ổn định lâu dài ở 2-8°C. Các kết quả cho thấy rằng kháng thể kháng PD-L1 khá ổn định trong 10-20 mM chất đệm suxinat system.

Bảng 4. Kết quả độ ổn định của các chế phẩm có nồng độ hệ chất đệm khác nhau ở 40°C

Nồng độ	Thời gian (ngày)	Vẻ bề ngoài	SEC (%khu vực)		IEC (%khu vực)			Không khử CE-SDS (%CPA)
			Monome	Polyme	Đỉnh axit	Đỉnh chính	Đỉnh bazơ	
10 mM	0	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,2	23,4	60,4	16,2	95,28

	28	Rõ ràng và trong suốt	96,9	2,0	35,0	51,8	13,1	93,66
20 mM	0	Rõ ràng và trong suốt	98,1	1,2	23,5	60,9	15,6	95,30
	28	Rõ ràng và trong suốt	96,8	2,1	35,5	52,2	12,3	93,74

Bảng 5. Kết quả độ ổn định của các chế phẩm có nồng độ hệ chất đệm khác nhau ở 40°C

Nồng độ	Thời gian (tháng)	Vẻ bề ngoài	SEC (%khu vực)		IEC (%khu vực)			Không khử CE-SDS (%CPA)
			Monome	Polyme	Đỉnh axit	Đỉnh chính	Đỉnh bazơ	
10 mM	0	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,2	23,4	60,4	16,2	95,28
	1	Rõ ràng và trong suốt	98,1	1,1	24,2	60,4	15,4	96,31
	3	Rõ ràng và trong suốt	96,9	1,0	24,8	58,7	16,5	96,10
	6	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,1	23,6	60,9	15,5	94,86
20 mM	0	Rõ ràng	98,1	1,2	23,5	60,9	15,6	95,30

		và trong suốt						
	1	Rõ ràng và trong suốt	98,0	1,1	24,2	60,2	15,6	95,78
	3	Rõ ràng và trong suốt	96,9	1,0	24,9	58,7	16,4	96,05
	6	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,1	23,3	61,5	15,2	95,70

Phương án 5

Điều chế các chế phẩm kháng thể kháng PD-L1 bao gồm 50 mg/mL PD-LI kháng thể (HRP00052), 20 mM (natri) axetat ở độ pH=5,2 và 60 mg/mL sucroza, và các loại và các nồng độ khác nhau của chất hoạt động bề mặt. Từng chế phẩm được lọc và được nạp vào lọ tiêm thủy tinh borosilicat trung tính được bịt kín bằng nút cao su bromobutyl và được đặt lên máy lắc nhiệt độ không đổi 25°C, và được lắc ở 200 vòng mỗi phút.

DLS (Tán xạ ánh sáng động) được sử dụng để đo hệ số khuếch tán trung bình, được sử dụng để xác định đặc điểm kích thước hạt và phân phối kích thước hạt của các hạt kích thước nano trong dung dịch Hệ số phân phối chỉ số phân tán hạt (PDI: particle dispersion index) thể hiện độ đồng nhất của kích thước hạt. Giá trị PDI càng thấp, phân phối kích thước hạt càng hẹp và kích thước hạt càng đồng nhất.

Các kết quả độ ổn định chỉ ra rằng 0,1-0,3 mg/mL polysorbat 20 hoặc polysorbat 80 là hiệu quả để ngăn chặn sự kết tụ của các kháng thể kháng PD-L1 và chế phẩm của các hạt lớn kết tụ.

Bảng 6. Kết quả thử nghiệm lắc các loại và các nồng độ khác nhau của polysorbat

Loại	Nồng độ (mg/mL)	Thời gian (ngày)	Vẻ bề ngoài	DLS (nm)		SEC (%khu vực)	
				Z-Ave Trung bình	PDI	Monome	Polyme
Không có polysorbat	0	0	Rõ ràng và trong suốt	17,27	0,29	98,8	1,2
		3	Mờ	16,23	0,25	98,2	1,3
		7	Mờ	15,41	0,25	97,9	1,4
Polysorbat 20	0,1	0	Rõ ràng và trong suốt	13,98	0,13	98,7	1,3
		3	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,08	0,13	98,2	1,3
		7	Đôi khi có các hạt lơ lửng	13,80	0,10	97,8	1,4
Polysorbat 20	0,2	0	Rõ ràng và trong suốt	14,08	0,14	98,7	1,3
		3	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,13	0,14	98,0	1,4
		7	Đôi khi có các hạt lơ lửng	13,82	0,09	97,8	1,5
Polysorbat 20	0,3	0	Rõ ràng và trong suốt	14,13	0,14	98,7	1,3
		3	Đôi khi có các hạt lơ lửng	13,90	0,13	98,1	1,3
		7	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,13	0,15	97,8	1,5
Polysorbat	0,1	0	Rõ ràng và	14,22	0,16	98,7	1,3

80			trong suốt				
		3	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,07	0,12	98,1	1,4
		7	Đôi khi có các hạt lơ lửng	15,08	0,17	98,0	1,3
Polysorbat 80	0,2	0	Rõ ràng và trong suốt	14,51	0,18	98,7	1,3
		3	Đôi khi có các hạt lơ lửng	13,73	0,10	98,2	1,2
		7	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,15	0,13	97,4	1,9
Polysorbat 80	0,3	0	Rõ ràng và trong suốt	13,74	0,12	98,8	1,2
		3	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,10	0,14	98,3	1,2
		7	Đôi khi có các hạt lơ lửng	14,15	0,13	97,9	1,4

Phương án 6

Điều chế các chế phẩm kháng thể kháng PD-L1 bao gồm 50 mg/mL PD-LI kháng thể (HRP00052), 20 mM (natri) suxinat ở độ pH=5,2 và 60 mg/mL sucroza, và các loại và các nồng độ khác nhau của chất hoạt động bề mặt. Từng chế phẩm được lọc và được nạp vào lọ tiêm thủy tinh borosilicat trung tính được bịt kín bằng nút cao su bromobutyl và được đặt ở 2-8°C để kiểm tra độ ổn định. Các kết quả cho thấy rằng polysorbat 80 tốt hơn đáng kể so với polysorbat 20, và không có sự khác biệt đáng kể giữa mỗi nồng độ.

Bảng 7. Kết quả độ ổn định của các chế phẩm với các loại và các nồng độ khác nhau của polysorbat ở 2-8°C

Loại	Nồng độ mg/mL	Thời gian (tháng)	Vết bề ngoài	SEC (%khu vực)		IEC (%khu vực)			CE-SDS không khử (%CPA)
				Monome	Polyme	Đỉnh axit	Đỉnh chính	Đỉnh bazơ	
Polysorbat 20	0,2	0	Rõ ràng và trong suốt	98,1	1,20	24,3	60,5	15,2	95,9
		3	Với các hạt lơ lửng nhỏ	N/A	N/A	24,5	59,6	15,9	96,6
		6	Với các hạt lơ lửng có thể nhìn thấy	98,3	1,15	23,8	60,3	15,9	96,2
	0,4	0	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,20	24,4	59,4	16,2	96,0
		3	Với các hạt lơ lửng nhỏ	N/A	N/A	24,7	59,5	15,8	95,9
		6	Với các hạt lơ lửng có thể nhìn thấy	98,2	1,17	23,6	58,7	17,7	95,9
	0,6	0	Rõ ràng	98,1	1,20	24,3	60,2	15,5	95,3

			và trong suốt						
		3	Rõ ràng và trong suốt	N/A	N/A	24,6	59,3	16,1	95,9
		6	Với các hạt lơ lửng có thể nhìn thấy	98,3	1,16	24,1	60,0	15,9	95,9
Polysorbat 80	0,4	0	Rõ ràng và trong suốt	98,1	1,20	23,7	60,5	15,8	96,0
		3	Rõ ràng và trong suốt	N/A	N/A	24,7	59,5	15,8	95,3
		6	Rõ ràng và trong suốt	98,3	1,17	23,3	58,7	18,0	95,8
	0,6	0	Rõ ràng và trong suốt	98,2	1,10	24,7	59,8	15,5	94,8
		3	Rõ ràng và trong suốt	N/A	N/A	25,0	58,7	16,3	96,6
		6	Rõ ràng và trong suốt	98,3	1,15	23,6	58,5	17,9	95,7
	0,8	0	Rõ ràng	98,1	1,20	24,2	59,8	16,0	95,7

			và trong suốt						
		3	Rõ ràng và trong suốt	N/A	N/A	24,8	59,4	15,9	95,7
		6	Rõ ràng và trong suốt	98,3	1,14	23,9	59,9	16,2	95,4

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm, bao gồm kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, và chất đệm; trong đó:

chất đệm này tốt hơn là chất đệm suxinat hoặc chất đệm axetat, tốt hơn nữa là chất đệm suxinat;

kháng thể kháng PD-1 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, và SEQ ID NO: 12; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6, và trình tự CDR như sau:

HCDR1 là NDYWX₁ SEQ ID NO: 1

hoặc SYWMH SEQ ID NO: 7,

HCDR2 là YISYTGSTYYNPSLKS SEQ ID NO: 2

hoặc RIX₄PNSG X₅TSYNEKFKN SEQ ID NO: 8, và/hoặc

HCDR3 là SGGWLAPFDY SEQ ID NO: 3

hoặc GGSSYDYFDY SEQ ID NO: 9; và/hoặc

LCDR1 là KSSQSLFY X₂ SNQK X₃SLA SEQ ID NO: 4

hoặc RASESVSIHGTHLMH SEQ ID NO: 10,

LCDR2 là GASTRES SEQ ID NO: 5

hoặc AASNLES SEQ ID NO: 11, và/hoặc

LCDR3 là QQYYGYPYT SEQ ID NO: 6

hoặc QQSFDPLT SEQ ID NO: 12;

trong đó, X₁ được chọn từ N hoặc T, X₂ được chọn từ R hoặc H, X₃ được chọn từ N hoặc H, X₄ được chọn từ H hoặc G, và X₅ được chọn từ G hoặc F.

2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó độ pH của dược phẩm này là từ 4,5 đến 6,0, tốt hơn là từ 5,0 đến 6,0, tốt hơn nữa là từ 5,0 đến 5,5, tốt nhất là 5,2.

3. Dược phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ của chất đệm là từ 5 mM đến 50 mM, tốt hơn là từ 10 mM đến 30 mM, tốt hơn nữa là từ 10 mM đến 20 mM, tốt nhất là 20 mM.

4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của kháng thể kháng PD-L1 là từ 30 mg/mL đến 80 mg/mL, tốt hơn là từ 40 mg/mL đến 60 mg/mL, tốt hơn nữa là từ 45 mg/mL đến 55 mg/mL, tốt nhất là 50 mg/mL.

5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4, còn bao gồm sacarit; sacarit này tốt hơn là disacarit, tốt hơn nữa là trehaloza hoặc sucroza, tốt nhất là sucroza.

6. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó nồng độ của sacarit này là từ 30 mg/mL đến 90 mg/mL, tốt hơn là từ 40 mg/mL đến 80 mg/mL, tốt hơn nữa là từ 55 mg/mL đến 65 mg/mL, tốt nhất là 60 mg/mL.

7. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 6, còn bao gồm chất hoạt động bề mặt; chất hoạt động bề mặt này tốt hơn là polysorbat, tốt hơn nữa là polysorbat 80 hoặc polysorbat 20.

8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó nồng độ của chất hoạt động bề mặt này là từ 0,1 mg/mL đến 1,0 mg/mL, tốt hơn là từ 0,4 mg/mL đến 0,8 mg/mL, tốt hơn nữa là từ 0,5 mg/mL đến 0,7 mg/mL, tốt nhất là 0,6 mg/mL.

9. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 8, bao gồm:

(a) 30 mg/mL - 80 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó;

(b) 5 mM - 50 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-6,0;

(c) 30 mg/mL - 90 mg/mL disacarit; và,

(d) 0,1 mg/mL - 1,0 mg/mL polysorbat 80;

tốt hơn là, dược phẩm này bao gồm: 40 mg/mL-60 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM-30 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-5,5, 40 mg/mL-80 mg/mL sucroza và 0,4 mg/mL-0,8 mg/mL polysorbat 80;

tốt hơn nữa là, dược phẩm này bao gồm: 45 mg/mL-55 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 10 mM-20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,0-5,5, 55 mg/mL-65 mg/mL sucroza và 0,5 mg/mL-0,7 mg/mL polysorbat 80.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này được chọn từ một trong số các dược phẩm sau đây:

dược phẩm A bao gồm: 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,4 mg/mL polysorbat 80;

dược phẩm B bao gồm: 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,6 mg/mL polysorbat 80;

dược phẩm C bao gồm: 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,2, 60 mg/mL sucroza và 0,8 mg/mL polysorbat 80;

dược phẩm D bao gồm: 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết

kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,5, 60 mg/mL sucroza và 0,6 mg/mL polysorbat 80;

được phẩm E bao gồm: 50 mg/mL kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, 20 mM chất đệm suxinat ở độ pH=5,8, 60 mg/mL sucroza và 0,6 mg/mL polysorbat 80.

11. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 và các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO:9; và trong đó X₄ là G, và X₅ là F;

hoặc, kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3, và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện lần lượt trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6; và trong đó X₁ là T, X₂ là H, và X₃ là H.

12. Được phẩm theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 11, trong đó kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể người, tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người.

13. Được phẩm theo điểm 12, trong đó trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 13, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 14.

14. Được phẩm theo điểm 12, trong đó trình tự chuỗi nặng của kháng thể kháng PD-L1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD-L1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 17.

15. Phương pháp bào chế dược phẩm theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 14, bao gồm bước trộn kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó với tá dược được dụng.

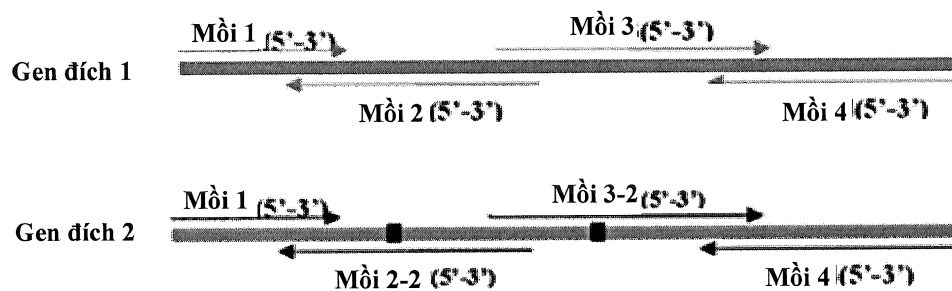


Fig. 1

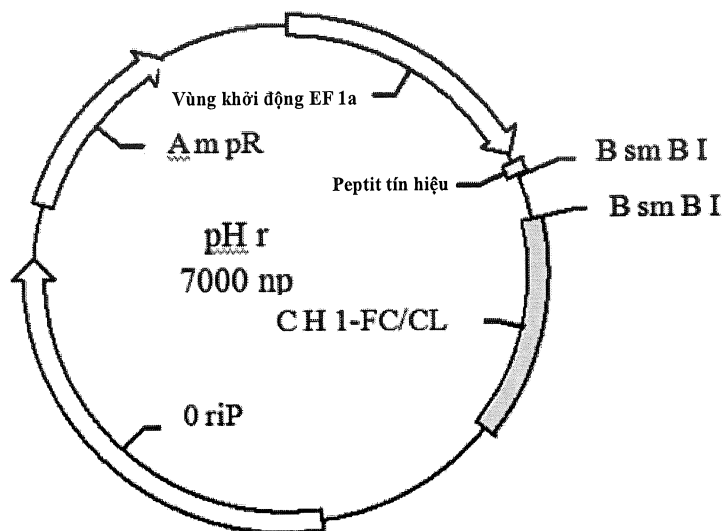


Fig. 2

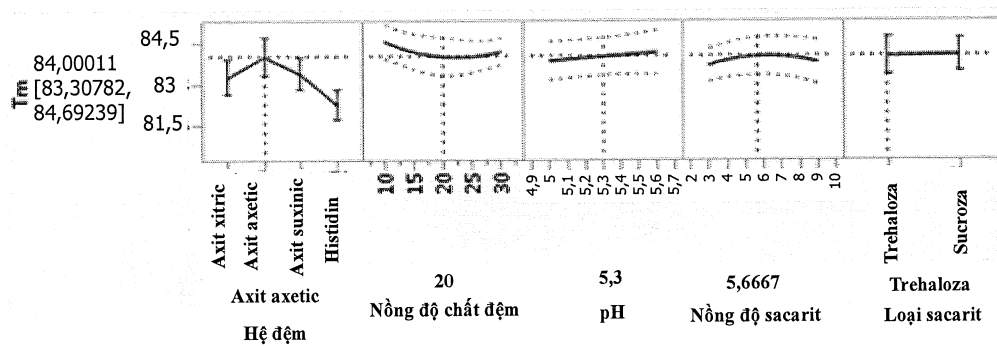


Fig. 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO. LTD.
 SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO. LTD
 <120> Dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD-L1 và phương pháp bào
 chế dược phẩm này
 <130> P184014191VN
 <150> CN2017110341680.7
 <151> 2017-05-16
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> HCDR1 của kháng thể 1
 <220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa là N hoặc T.
 <220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (5)..(5)
 <223> 'Xaa' ở vị trí 5 là Asn hoặc Thr.
 <400> 1
 Asn Asp Tyr Trp Xaa
 1 5
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> HCDR2 của kháng thể 1
 <400> 2
 Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PD-L1 (ECD)-Flag-His6

<400> 3

Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 của kháng thể 1

<220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (9)..(9)
 <223> 'Xaa' tại vị trí 9 là Arg hoặc His.

<220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa là N hoặc H.

<220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (14)..(14)
 <223> 'Xaa' tại vị trí 14 là Asn hoặc His.

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Xaa Ser Asn Gln Lys Xaa Ser Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 của kháng thể 1

<400> 5

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 của kháng thể 1

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 của kháng thể 2

<400> 7

Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 của kháng thể 2

<220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa là H hoặc G.

<220>
 <221> KHÔNG CHẮC CHẮN
 <222> (3)..(3)

<223> 'Xaa' tại vị trí 3 là His hoặc Gly.

<220>

<221> KHÔNG CHẮC CHẮN

<222> (8)..(8)

<223> Xaa là G hoặc F.

<220>

<221> KHÔNG CHẮC CHẮN

<222> (8)..(8)

<223> 'Xaa' tại vị trí 8 là Gly hoặc Phe. .

<400> 8

Arg	Ile	Xaa	Pro	Asn	Ser	Gly	Xaa	Thr	Ser	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Asn

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 của kháng thể 2

<400> 9

Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 của kháng thể 2

<400> 10

Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	His	Gly	Thr	His	Leu	Met	His
1				5					10					15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 của kháng thể 2

<400> 11

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của kháng thể 2

<400> 12

Gln Gln Ser Phe Glu Asp Pro Leu Thr

1

5

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người 2 sau khi thành thực ái lực

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Arg Ile Gly Pro Asn Ser Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65

70

75

80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người 2 sau khi thành thực ái lực

<400> 14

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

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

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15

<211> 446

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự chuỗi nặng của kháng thể HRP00052

<400> 15

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

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

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

Gly Arg Ile Gly Pro Asn Ser Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 1341

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự gen mã hoá trình tự chuỗi nặng của kháng thể HRP00052

<400> 16

caggtgcaac tgggtgcagag cgggtgccgag gtgaagaagc ctggcgcaag cgtgaaagtg
 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggcc
 120

cctggacagg gcctggagtg gatgggcagg atcgggccca acagtggttt cactagctac
 180

aatgaaaagt tcaagaacag ggtaaccatg accagggaca cctccaccag cacagtgtat
 240

atggagctga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcggc
 300

agcagctacg actacttcga ctattggggc cagggcacca ccgtgaccgt gagcagtgt
 360

tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcgccttgct ccaggagcac ctccgagagc
 420

acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg
 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga
 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac gaagacctac
 600

acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa
 660

tatggtcccc catgcccacc atgcccagca cctgaggctg ctggggggacc atcagtcttc
720

ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc
780

gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc
840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt
900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc
960

aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg
1020

cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac
1080

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg
1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac
1200

ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat
1260

gtctttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc
1320

tcctgtctc tgggtaaatg a
1341

<210> 17

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể HRP00052

<400> 17

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

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

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe
 85 90 95
 Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 18
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự gen mã hoá trình tự chuỗi nhẹ của kháng thể HRP00052

<400> 18

gacatcgtgc tgacccagag tcccgctca cttgccgtga gcccgggtca gagggccacc
60atcacctgta gggccagcga gagcgtgagc atccacggca cccacctgat gcactgggat
120caacagaaac cgggccagcc ccccaaactg ctgatctacg ccgccagcaa cctggagagc
180ggcgtgcccg ccaggttcag cggctccggc agcggcaccg acttcaccct cactatcaac
240cccgtggagg ccgaggacac cgccaactac tactgccagc agagcttcga ggacccctg
300accttcggcc agggcaccaa gctggagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc
360atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg
420aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg
480ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc
540agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc
600accatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga
657

<210> 19

<211> 290

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin độ dài đầy đủ PD-L1 của người

<400> 19

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

<210> 20
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PD-L1 với đuôi His, PADRE

<400> 20

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 Gly Ser Gly Ala
 210 215 220

Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala His His His His
 225 230 235 240

His His

<210> 21

<211> 234

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PD-L1 với đuôi FLAG, HIS: PD-L1(ECD)-Flag-His6

<400> 21

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 Asp Tyr Lys Asp
 210 215 220

Asp Asp Asp Lys His His His His His His
 225 230

<210> 22

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp Fc của PD-L1: PD-L1(ECD)-Fc

<400> 22

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 Asp Lys Thr His
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 382

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp Fc của PD-L1: PD-1(ECD)-Fc

<400> 23

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

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

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 145 150 155 160

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 165 170 175

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 180 185 190

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 195 200 205

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 210 215 220

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 225 230 235 240

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 245 250 255

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 260 265 270

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 275 280 285

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 290 295 300

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 305 310 315 320

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 325 330 335

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 340 345 350

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 355 360 365

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 24
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Ghép 1 hvH- CDR

<400> 24

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

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

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

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

Arg Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25
 <211> 113

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Ghép 1 hVL CDR

<400> 25

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 26
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 2- hVH.1

<400> 26

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

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

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

Gly Arg Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Ser Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 2-hVL.1

<400> 27

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

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

Gly Thr His Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 1 được làm tương thích với người sau khi thành thực ái lực

<400> 28

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

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

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

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Ser Gly Gly Trp Leu Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 1 được làm tương thích với người sau khi thành thực ái lực

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr His
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys