



(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)



1-0041636

C07K 16/28; A61K 48/00; A61P 29/00; (13) B

A61P 31/00; A61P 33/00; A61P 35/00;

(51)^{2020.01} A61K 39/395; C12N 1/15; C12N 1/19;

C12N 1/21; C12N 15/13; C12N 15/63;

C12N 5/10

(21) 1-2021-04977

(22) 31/01/2020

(86) PCT/CN2020/074098 31/01/2020

(87) WO2020/156509 06/08/2020

(30) 201910108743.3 03/02/2019 CN; 202010052351.2 17/01/2020 CN

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/10/2021 403

(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, Minhang District, Shanghai, 200245, China

(72) GU, Xiaoling (CN); YE, Xin (CN); GE, Hu (CN); TAO, Weikang (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO. 10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO. 12 và SEQ ID NO. 13, và LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO.47, SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50, SEQ ID NO.51 hoặc SEQ ID NO.52; và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 và dược phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phần mô tả ở đây chỉ cung cấp thông tin cơ bản liên quan đến sáng chế, và không nhất thiết phải tạo thành giải pháp kỹ thuật đã biết.

Liệu pháp miễn dịch khối u là phương pháp điều trị sử dụng và huy động triệt để tế bào T sát thủ trong cơ thể bệnh nhân khối u để tiêu diệt khối u. Đồng thời, sự lẩn tránh của tế bào khối u là một trở ngại rất lớn đối với liệu pháp miễn dịch khối u. Các tế bào khối u sử dụng tác dụng ức chế của chính chúng đối với hệ thống miễn dịch để thúc đẩy sự phát triển nhanh chóng của khối u. Có mối quan hệ rất phức tạp giữa cơ chế lẩn tránh miễn dịch của các khối u và đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với các khối u. Trong giai đoạn đầu của liệu pháp miễn dịch khối u, các tế bào T tiêu diệt khối u đặc hiệu có hoạt tính sinh học của chúng, nhưng khi khối u phát triển, chúng sẽ mất chức năng tiêu diệt trong giai đoạn sau.

Việc hoạt hóa các tế bào T trong cơ thể người thông qua hai hệ thống con đường tín hiệu. Ngoài tín hiệu đầu tiên được cung cấp cho tế bào T bằng cách trình diện các peptit kháng nguyên MHC bởi tế bào trình diện kháng nguyên, tín hiệu thứ hai được cung cấp bởi một loạt các phân tử đồng kích thích cũng được yêu cầu để cho phép tế bào T tạo ra các đáp ứng miễn dịch bình thường. Hệ thống con đường truyền tín hiệu kép này đóng vai trò quan trọng trong sự cân bằng của hệ thống miễn dịch trong cơ thể. Nó điều chỉnh nghiêm ngặt các đáp ứng miễn dịch khác nhau của cơ thể đối với các tự kháng nguyên và không tự kháng nguyên. Nếu không có tín hiệu thứ hai do phân tử đồng kích thích cung cấp, nó sẽ dẫn đến tế bào T không đáp ứng hoặc đáp ứng miễn dịch đặc hiệu duy trì, do đó dẫn đến hiện tượng dung nạp. Vì vậy, con đường tín hiệu thứ hai đóng vai trò điều tiết rất quan trọng trong toàn bộ quá trình đáp ứng miễn dịch của cơ thể.

Thụ thể gây chết theo chương trình -1 (PD-1) là thụ thể protein biểu hiện trên bề mặt của tế bào T được phát hiện vào năm 1992 và có liên quan đến quá trình gây chết tế bào theo chương trình. PD-1 thuộc họ CD28. Nó có 23% axit amin tương đồng với kháng nguyên 4 của tế bào lympho T gây độc tế bào (CTLA-4), nhưng biểu hiện của nó khác

với CTLA, và nó chủ yếu được biểu hiện trên tế bào T hoạt hóa, tế bào B và tế bào dòng tủy. PD-1 có hai phối tử, tương ứng 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), và sự biểu hiện trên tế bào có thể được điều chỉnh sau khi được hoạt hóa. Sự biểu hiện của PD-L2 tương đối hạn chế và chủ yếu được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên, như các đại thực bào đã hoạt hóa và các tế bào tua.

PD-L1 ức chế hệ thống miễn dịch bằng cách gắn kết với PD-1 và B7-1. Nhiều tế bào khối u và tế bào miễn dịch trong vi môi trường mô khối u biểu hiện PD-L1. Nghiên cứu mới đã phát hiện ra rằng mức biểu hiện cao của protein PD-L1 được phát hiện trong bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ), bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư thận, u ác tính, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tuyến tụy và bệnh ung thư gan và các mô khối u khác ở người, và mức biểu hiện của PD-L1 có liên quan chặt chẽ đến biểu hiện lâm sàng và tiên lượng của bệnh nhân.

Kháng thể đơn dòng kháng PD-1 có thể tối đa hóa phản ứng của hệ thống miễn dịch của chính bệnh nhân đối với khối u bằng cách ngăn chặn sự liên kết của PD-L1/PD-1, do đó đạt được mục đích tiêu diệt tế bào khối u. Hiện kháng thể kháng PD-1 Pembrolizumab (còn được gọi là Merck keytruda, keytruda, Merck-Pemb, Merck-keytruda, Merck-PD-1, pembrolizumab) và Nivolumab (còn được gọi là BMS Opdivo, Opdivo, BMS-Nivolumab, Nivolumab) đã được FDA chấp thuận để điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư hắc tố, bệnh ung thư hạch Hodgkin, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và các khối u khác. Ngoài ra, các tài liệu sáng chế, như WO200139722, WO2006121168, WO2010036959, WO2010089411, WO2011110604, WO2013173223, WO2013181634, US2014335093, US6803192B1, US8617546B2, và WO2015085847, cũng đề cập đến nhiều loại kháng thể đơn dòng kháng PD-1.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1, mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và dược phẩm chứa kháng thể này.

Theo một số phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, được chọn từ một trong các mục i) đến iii) bất kỳ sau:

i) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.8 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.9 hoặc có nhiều nhất 3, 2, hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.10 hoặc có nhiều nhất 8, 3, 2, hoặc 1 đột biến axit amin từ đó; vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.11 hoặc có nhiều nhất 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.12 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.13 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó;

ii) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.14 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.15 hoặc có nhiều nhất 3, 2, hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.16 hoặc có nhiều nhất 8, 3, 2, hoặc 1 đột biến axit amin từ đó; vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.17 hoặc có nhiều nhất 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.12 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.18 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó; và

iii) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.21 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.22 hoặc có nhiều nhất 3, 2, hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.23 hoặc có nhiều nhất 3, 2, hoặc 1 đột biến axit amin từ đó; vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.24 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.25 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó, và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.26 hoặc có nhiều nhất 3, 2 hoặc 1 đột biến axit amin từ đó.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế nêu trên gắn kết với PD-1 của người với hằng số cân bằng phân ly là 10^{-7} M hoặc thấp hơn. Theo một số phương án, nó gắn kết với PD-1 của người với hằng số cân bằng phân ly bằng hoặc thấp hơn 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M hoặc 10^{-11} M.

Theo một số phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm: HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.65, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.66, và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.67; vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng bao gồm: LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.68, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.12, và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.69; trình tự là như được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1

Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
HCDR1	DYE X_1 H, X_1 được chọn từ I hoặc M; (SEQ ID NO.65)	LCDR1	RSSQSX ₁₃ VHSX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ TYL E, trong đó X_{13} được chọn từ I hoặc L, X_{14} được chọn từ N, Q, L, T hoặc D, X_{15} được chọn từ G, A hoặc V, và X_{16} được chọn từ N hoặc K; (SEQ ID NO.68)
HCDR2	LX ₂ DPETGGX ₃ VYNQKFKX ₄ , X_2 được chọn từ F hoặc I, X_3 được chọn từ I/T và X_4 được chọn từ G hoặc D; (SEQ ID NO.66)	LCDR2	KVSNRFS; (SEQ ID NO.12)
HCDR3	EX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ YX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ DWYFDV, X_5 được chọn từ G hoặc R, X_6 được chọn từ F hoặc vắng mặt, X_7 là S hoặc vắng mặt, X_8 là Y hoặc vắng mặt, X_9 là G hoặc vắng mặt, X_{10} là S hoặc vắng mặt, X_{11} được chọn từ N hoặc T và X_{12} được chọn từ R hoặc S; (SEQ ID NO.67)	LCDR3	FQGSHPYX ₁₇ , X_{17} được chọn từ A hoặc T; (SEQ ID NO.69)

Theo một số phương án khác, trong kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.8, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.9, và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.10; vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO.12, LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO.13, và LCDR1 như được thể hiện trong công thức chung RSSQSX₁₃VHSX₁₄X₁₅X₁₆TYLE (SEQ ID NO.68), trong đó X_{13} được chọn từ L, X_{14} được chọn từ N, Q, L, T hoặc D, X_{15} được chọn từ G, A hoặc V, và X_{16} được chọn từ N.

Theo một số phương án khác, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng được chọn từ mục bất kỳ trong số các mục từ (a) đến (e) sau:

(a) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13, và LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.47, SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50, SEQ ID NO.51 hoặc SEQ ID NO.52;

(b) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.18;

(c) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22 và SEQ ID NO.23, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25 và SEQ ID NO.26;

(d) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16, và LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13, và LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.47, SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50, SEQ ID NO.51 hoặc SEQ ID NO.52; và

(e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa

LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22 và SEQ ID NO.23, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25 và SEQ ID NO.26.

Theo một số phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, được chọn từ mục bất kỳ trong số các mục từ iv) đến vi) sau:

iv) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 với trình tự tương tự như trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.4, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 với trình tự tương tự như trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.5;

v) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 với trình tự tương tự như trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.6, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 với trình tự tương tự như trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.7; và

vi) kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, vùng biến đổi chuỗi nặng của chúng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 với trình tự tương tự như trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 với trình tự tương tự như trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO.20.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng là kháng thể của chuột nhắt hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, kháng thể thể khảm hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, kháng thể hoàn toàn của người

hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, hoặc kháng thể nhân tạo hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng là kháng thể nhân tạo hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể nhân tạo chứa vùng khung có nguồn gốc từ kháng thể của người hoặc biến thể vùng khung của nó.

Theo một số phương án, biến thể vùng khung có nhiều nhất 11 đột biến ngược axit amin trên mỗi vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể của người.

Theo một số phương án, biến thể vùng khung bao gồm các đột biến được chọn từ mục bất kỳ trong số các mục từ (f) đến (h) sau:

(f) đột biến ngược axit amin 2G chứa trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ 27Y, 48I, 67T, 69L, 82F và 93T chứa trong vùng biến đổi chuỗi nặng;

(g) đột biến ngược axit amin 2V chứa trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và/hoặc một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ 26D, 27F, 30T, 38K, 43H, 48I, 66K, 67A, 69L, 82F và 93T chứa trong vùng biến đổi chuỗi nặng; và

(h) một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ 42G, 44V và 71Y chứa trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và/hoặc đột biến ngược axit amin 1K và/hoặc 94S chứa trong vùng biến đổi chuỗi nặng.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm:

(a2) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin của 27Y, 48I, 67T, 69L, 82F và 93T chứa trong vùng khung chuỗi nặng, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13, và LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.47, SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50, SEQ ID NO.51 hoặc SEQ ID NO.52, và 2G đột biến ngược axit amin chứa trong vùng khung chuỗi nhẹ;

(b2) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.16, và một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ 26D, 27F, 30T, 38K, 43H, 48I, 66K, 67A, 69L, 82F và 93T chứa trong vùng biến đổi chuỗi nặng; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.18, và đột biến ngược axit amin 2V chứa trong vùng khung chuỗi nhẹ;

(c2) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.22 và SEQ ID NO.23, và đột biến ngược axit amin 1K và/hoặc 94S chứa trong vùng khung chuỗi nặng, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.25 và SEQ ID NO.26, và một hoặc nhiều đột biến ngược axit amin được chọn từ 42G, 44V và 71Y chứa trong vùng khung chuỗi nhẹ.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi kháng thể được chọn từ mục bất kỳ trong số các mục từ (i) đến (o) sau:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.4 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.4, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.5 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.5;

(j) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.6 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.6, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.7 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.7;

(k) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.19 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.19, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.20 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.20;

(l) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.27, 30, 31 hoặc 32, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.27, 30, 31 hoặc 32, tương ứng, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, 34, 35, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, tương ứng;

(m) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.33, 36, 37, 38, 39 hoặc 40, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.33, 36, 37, 38, 39 hoặc 40, tương ứng, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.34, 35, 28, 29, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.34, 35, 28, 29, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, tương ứng;

(n) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.41, 45 hoặc 46, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.41, 45 hoặc 46, tương ứng, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.42, 43 hoặc 44, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.42, 43 hoặc 44, tương ứng;

(o) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.70 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.70, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.71 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.71; và

(p) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.27, 30, 31 hoặc 32, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.27, 30, 31 hoặc 32, tương ứng, và/hoặc

vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.34 hoặc 35, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.34 hoặc 35, tương ứng;

trong đó trình tự SEQ ID NO.70 và SEQ ID NO.71 được đại diện bởi trình tự có công thức chung như được thể hiện trong Bảng 2:

Bảng 2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASX₁₈X₁₉TFX₂₀<u>DYEX</u> <u>1</u><u>HWVX</u>₂₁<u>QAPGX</u>₂₂<u>GLEWX</u>₂₃<u>GLX</u>₂₄<u>DPETGGX</u>₂₅<u>VYNQKFK</u> <u>X</u>₄<u>X</u>₂₄<u>X</u>₂₅<u>TX</u>₂₆<u>TADKSTSTAYMEX</u>₂₇<u>SSLRSED</u><u>TAVYYCX</u>₂₈ <u>8</u><u>REX</u>₅<u>X</u>₆<u>X</u>₇<u>X</u>₈<u>YX</u>₉<u>X</u>₁₀<u>X</u>₁₁<u>X</u>₁₂<u>DWYFDVW</u><u>QGTTVT</u><u>VSS</u>, trong đó, X₁ được chọn từ I hoặc M, X₂ được chọn từ F hoặc I, X₃ được chọn từ I/T, X₄ được chọn từ G hoặc D, X₅ được chọn từ G hoặc R, X₆ is F hoặc vắng mặt, X₇ là S hoặc vắng mặt, X₈ là Y hoặc vắng mặt, X₉ là G hoặc vắng mặt, X₁₀ là S hoặc vắng mặt, X₁₁ được chọn từ N hoặc T, X₁₂ được chọn từ R hoặc S, X₁₈ được chọn từ G hoặc D, X₁₉ được chọn từ G, F hoặc Y, X₂₀ được chọn từ S hoặc T, X₂₁ được chọn từ R hoặc K, X₂₂ được chọn từ Q hoặc H, X₂₃ được chọn từ M hoặc I, X₂₄ được chọn từ R hoặc K, X₂₅ được chọn từ V, A hoặc T, X₂₆ được chọn từ R hoặc K, X₂₇ được chọn từ L hoặc F và X₂₈ được chọn từ A hoặc T (SEQ ID NO.70)	DX₂₉VMTQTPLSLPVTGPGE ASISCRSSQSX₁₃VHSX₁₄X₁₅X₁₆ <u>16</u><u>TYLEWYLQKPGQSPQLLI</u> <u>YK</u><u>VSNRFS</u><u>GVPDRFSGSGS</u> <u>GTDFTLKISRVEAEDVGVY</u> <u>YCFQGS</u><u>HPYX</u>₁₇<u>FGGGTKV</u> EIK, trong đó, X₁₃ được chọn từ I hoặc L, X₁₄ được chọn từ N, Q, L, T hoặc D, X₁₅ được chọn từ G, A hoặc V, X₁₆ được chọn từ N hoặc K, X₁₇ được chọn từ A hoặc T và X₂₉ được chọn từ I, V hoặc G (SEQ ID NO.71)
---	---

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng PD-1 là như được thể hiện trong SEQ ID NO.27 hoặc có độ tương đồng ít nhất bằng 90% với SEQ ID NO.27, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD-1 là như được thể hiện trong SEQ ID NO.55 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.55.

Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng PD-1 là như được thể hiện trong SEQ ID NO.46 hoặc có độ tương đồng ít nhất bằng 90% với SEQ ID NO.46, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD-1 là như được thể hiện trong SEQ ID NO.43 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.43.

“Độ tương đồng ít nhất bằng 90%” nêu trên bao gồm có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Theo một số phương án khác của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể còn bao gồm vùng hằng định kháng thể; theo một số phương án khác, vùng hằng định chuỗi nặng của vùng hằng định kháng thể được chọn từ vùng hằng định IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người và các biến thể thông thường của chúng, vùng hằng định chuỗi nhẹ của vùng hằng định kháng thể được chọn từ vùng hằng định chuỗi κ và λ của kháng thể của người và các biến thể thông thường của chúng; theo một số phương án khác, vùng hằng định kháng thể bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 mà một hoặc nhiều đột biến của S228P, F234A và L235A được đưa vào, ví dụ, bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 có đột biến ba axit amin của S228P, F234A và L235A; theo một số phương án khác, kháng thể bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc SEQ ID NO.79, và vùng hằng định chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể kháng PD-1 chứa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.78 và chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.77 hoặc 82; hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.75 và chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.74, 76, 80 hoặc 81.

Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 chứa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.74 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.75; hoặc chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.77 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.78.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, kháng thể gắn kết cạnh tranh với PD-1 của người hoặc gắn kết với cùng epitop PD-1 của người với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu.

Theo một số phương án của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, mảnh gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được dime hóa (kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch) và vùng V được làm ổn định liên kết disulfua (dsFv).

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, kháng thể này gắn kết cạnh tranh với PD-1 của người với kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm, bao gồm lượng hữu hiệu điều trị bệnh của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, hoặc lượng hữu hiệu điều trị bệnh của kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng nêu trên, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, chất đệm hoặc tá dược được dụng. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu điều trị bệnh để chỉ liều lượng đơn vị của dược phẩm chứa 0,1 đến 3000 mg kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, hoặc mã hóa kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến tế bào vật chủ chứa axit nucleic nêu trên.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định PD-1, bao gồm bước sử dụng kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, hoặc bước sử dụng kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến kit chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên hoặc kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên để bào chế tác nhân chẩn đoán các bệnh liên quan đến PD-1.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu điều trị bệnh của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, hoặc kháng thể đơn dòng

phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, hoặc được phẩm nhuộm trên, hoặc axit nucleic nhuộm trên.

Theo một số phương án, bệnh là khối u.

Theo một số phương án khác, bệnh được chọn từ: bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư hầu họng, bệnh ung thư vòm họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan, u gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đường tiêu hóa, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận tế bào sáng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư da, u ác tính, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư hạch, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư sụn, u tủy, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, bệnh ung thư tăng sinh tủy, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh ung thư tổ chức liên kết Ewing, bệnh tích tụ chuỗi nhẹ hệ thống và bệnh ung thư biểu mô tế bào Merkel; theo một số phương án trong số các phương án này, u lympho được chọn từ: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho nang, u lympho tế bào B lớn trung thất nguyên phát, u lympho tế bào lớp vỏ, bệnh ung thư hạch bạch huyết nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu tế bào T/mô bào và u lympho tương bào lympho, bệnh ung thư phổi được chọn từ: bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu được chọn từ: bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho mãn tính và bệnh bạch cầu dòng tủy; theo một số phương án khác, bệnh được chọn từ: khối u ác tính dương tính với PD-L1, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư ruột và bệnh ung thư đại tràng.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, hoặc kháng thể đơn dòng

phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, hoặc được phẩm nhuộm trên, hoặc axit nucleic nhuộm trên, để bào chế thuốc để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Theo một số phương án, bệnh là khối u.

Theo một số phương án khác, bệnh được chọn từ: bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy ở đầu và cổ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư hầu họng, bệnh ung thư vòm họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan, u gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đường tiêu hóa, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận tế bào sáng, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư da, u ác tính, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư hạch, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư sụn, u tủy, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, bệnh ung thư tăng sinh tủy, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh ung thư tổ chức liên kết Ewing, bệnh tích tụ chuỗi nhẹ hệ thống và bệnh ung thư biểu mô tế bào Merkel; theo một số phương án trong số các phương án này, u lympho được chọn từ: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho nang, u lympho tế bào B lớn trung thất nguyên phát, u lympho tế bào lớp áo, u lympho tế bào nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu tế bào T/mô bào và u lympho tương bào lympho, bệnh ung thư phổi được chọn từ: bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu được chọn từ: bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính và bệnh bạch cầu dòng tủy; theo một số phương án khác, bệnh được chọn từ: khối u ác tính dương tính với PD-L1, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư ruột và bệnh ung thư đại tràng.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng theo dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, hoặc

kháng thể đơn dòng phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên, hoặc axit nucleic nêu trên, hoặc được phẩm nêu trên, để sử dụng làm thuốc.

Theo một số phương án, thuốc được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến PD-1.

Theo một số phương án, bệnh là khối u.

Theo một số phương án khác, bệnh được chọn từ: bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư não, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u nguyên bào thần kinh, bệnh ung thư hệ thần kinh trung ương, u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư hầu họng, bệnh ung thư vòm họng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư tuyến giáp, u trung biểu mô màng phổi ác tính, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan, u gan, bệnh ung thư biểu mô tế bào gan, bệnh ung thư gan mật, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư đường tiêu hóa, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận tế bào trong, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư da, u ác tính, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư hạch, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư sụn, u tủy, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, bệnh ung thư tăng sinh tủy, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, bệnh ung thư tổ chức liên kết Ewing, bệnh tích tụ chuỗi nhẹ hệ thống và bệnh ung thư biểu mô tế bào Merkel; theo một số phương án trong số các phương án này, u lympho được chọn từ: u lympho Hodgkin, u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho nang, u lympho tế bào B lớn trung thất nguyên phát, u lympho tế bào lớp áo, u lympho tế bào nhỏ, u lympho tế bào B lớn giàu tế bào T/mô bào và u lympho tế bào lympho, bệnh ung thư phổi được chọn từ: bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh bạch cầu được chọn từ: bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu dòng lympho mãn tính và bệnh bạch cầu dòng tủy; theo một số phương án khác, bệnh được chọn từ: khối u ác tính dương tính với PD-L1, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư ruột và bệnh ung thư đại tràng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: kết quả thử nghiệm của kháng thể kháng PD-1 phong bế gắn kết của PD-1 với thụ thể của nó;

Fig.2: hiệu quả của kháng thể kháng PD-1 đối với việc tiết IFN γ từ tế bào PBMC;

Fig.3: hiệu lực của kháng thể kháng PD-1 đối với khối u ghép ngoại lai của bệnh ung thư đại tràng MC38 ở chuột nhắt nhắt;

Fig.4: hiệu quả của kháng thể kháng PD-1 đối với thể tích khối u của bệnh ung thư đại tràng MC38 ở chuột nhắt nhắt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tổng quan

Để làm cho sáng chế được hiểu dễ dàng hơn, một số thuật ngữ khoa học và kỹ thuật nhất định được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa rõ ràng theo cách khác ở đây, tất cả thuật ngữ khoa học và kỹ thuật khác được sử dụng ở đây có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế.

Thuật ngữ “gây chết theo chương trình 1”, “gây chết tế bào theo chương trình 1”, “protein PD-1”, “PD-1”, “PDCD1” và “hPD-1” được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm PD-1 của người biến thể, isotyp, các dạng tương đồng loài, và các chất tương tự có ít nhất một epitop chung với PD-1. Trình tự PD-1 hoàn chỉnh có thể được tìm thấy với số truy cập GenBank U64863.

Thuật ngữ “phối tử gây chết theo chương trình-1 (PD-L1)” là một trong hai phối tử glycoprotein bề mặt tế bào của PD-1 (phối tử kia là PD-L2), điều hòa dưới sự hoạt hóa tế bào T và sự tiết xytokin khi nó gắn kết với PD-1. Thuật ngữ “PD-L1” như được sử dụng ở đây bao gồm biến thể, isotyp và các dạng tương đồng giữa các loài PD-L1 (hPD-L1), hPD-L1 của người, và 5 chất tương tự có ít nhất một epitop chung với hPD-1. Trình tự hPD-L1 hoàn chỉnh có thể được tìm thấy với số truy cập GenBank Q9NZQ7.

Thuật ngữ “xytokin” là một thuật ngữ chung cho các protein được giải phóng bởi một quần thể tế bào và hoạt động trên các tế bào khác như chất trung gian tế bào. Ví dụ về các xytokin như vậy bao gồm lymphokin, monokin, chemokin và các hormon

polypeptit truyền thống. Xytokin được lấy làm ví dụ bao gồm: IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF α , IL-17 và IL-5 của người.

Mã ba chữ cái và mã một chữ cái của axit amin được sử dụng trong sáng chế là như được mô tả trong J. biol. chem, 243, p3558 (1968).

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ globulin miễn dịch nói chung. Kháng thể nguyên vẹn tự nhiên là cấu trúc chuỗi tetrapeptit bao gồm hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau liên kết bởi các liên kết disulfua liên chuỗi. Thành phần axit amin và trình tự của vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch là khác nhau, vì vậy tính kháng nguyên của chúng cũng khác nhau. Bằng cách ấy, globulin miễn dịch có thể được chia thành năm lớp, hoặc được đặt tên là isotyp của globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, và các chuỗi nặng tương ứng của chúng là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ , tương ứng. Cùng một lớp Ig có thể được chia thành các phân lớp khác nhau theo sự khác biệt về thành phần axit amin của vùng bản lề và số lượng và vị trí của liên kết disulfua chuỗi nặng. Ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ được chia thành chuỗi κ hoặc chuỗi λ bởi sự khác biệt của vùng hằng định. Mỗi lớp trong số năm lớp Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ . Các kháng thể được đề cập đến trong sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có đã được cải biến trên cơ sở globulin miễn dịch trong khi vẫn giữ được khả năng gắn kết kháng nguyên; bao gồm các kháng thể đơn đặc hiệu, kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu; cũng bao gồm kháng thể đơn hóa trị, kháng thể hóa trị hai hoặc kháng thể đa hóa trị. Mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, ví dụ, có thể là mảnh bao gồm ít nhất một cấu trúc VH-CH1 và ít nhất một VL-CL, trong đó cấu trúc VH và VL có thể tiếp cận nhau dựa trên sự tương tác giữa các chuỗi và duy trì khả năng gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể là mảnh Fab đơn hóa trị (mảnh Fab1), mảnh Fab hóa trị hai (F(ab)2), mảnh Fab hóa trị ba (F(ab)3), mảnh Fab đa hóa trị (hai hoặc nhiều), và có thể cũng là các mảnh gắn kết kháng nguyên đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu khác bao gồm ít nhất một mảnh Fab.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể (bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, như kháng thể chuỗi đơn) có thể gắn kết đặc hiệu với hai kháng nguyên khác nhau hoặc hai epitop khác

nhau của cùng một kháng nguyên. Giải pháp kỹ thuật đã biết đã bộc lộ kháng thể đặc hiệu kép với nhiều cấu trúc khác nhau. Theo tính toán vện của phân tử IgG, chúng có thể được chia thành kháng thể đặc hiệu kép giống IgG và kháng thể đặc hiệu kép dạng mảnh kháng thể. Theo số lượng và cấu hình của các vùng gắn kết kháng nguyên, chúng có thể được chia thành kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai, hóa trị ba, hóa trị bốn hoặc nhiều hóa trị. Theo cấu trúc có đối xứng hay không, chúng có thể được chia thành kháng thể đặc hiệu kép có cấu trúc đối xứng và kháng thể đặc hiệu kép có cấu trúc không đối xứng. Trong số chúng, kháng thể đặc hiệu kép trên cơ sở mảnh kháng thể, ví dụ, mảnh Fab thiếu hụt mảnh Fc, tạo ra kháng thể đặc hiệu kép bằng cách gắn kết hai hoặc nhiều mảnh trong một phân tử. Các kháng thể này có tính sinh miễn dịch thấp hơn và trọng lượng phân tử nhỏ hơn và tính thấm mô khối u cao hơn. Cấu trúc kháng thể điển hình của loại này là kháng thể đặc hiệu kép như F(ab)₂, scFv-Fab, (scFv)₂-Fab, v.v; Đối với kháng thể đặc hiệu kép giống IgG (ví dụ, với mảnh Fc), loại kháng thể này có trọng lượng phân tử lớn hơn. Mảnh Fc giúp tinh chế kháng thể trong các giai đoạn sau và cải thiện độ hòa tan và độ ổn định của nó. Gốc Fc có thể cũng gắn kết với FcRn thụ thể và tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể. Mô hình cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép điển hình là, như, KiH, CrossMAb, Triomab quadroma, FcΔAdp, ART-Ig, BiMAb, Biclomics, BEAT, DuoBody, Azymetric, XmAb, 2:1 TCBs, 1Fab-IgG TDB, FynomAb, two-in-one/DAF, scFv-Fab-IgG, DART-Fc, LP-DART, CODV-Fab-TL, HLE-BiTE, F(ab)₂-CrossMAb, IgG-(scFv)₂, Bs4Ab, DVD-Ig, Tetravalent-DART-Fc, (scFv)₄-Fc, CODV-Ig, mAb₂, F(ab)₄-CrossMAb và các kháng thể đặc hiệu kép khác (xem Aran F. Labrijn et al., Nature Reviews Drug Discovery volume 18, pages 585–608 (2019); Chen S1 et al., J Immunol Res. 2019 Feb 11; 2019:4516041).

Thuật ngữ “hóa trị một”, “hóa trị hai”, “hóa trị ba” hoặc “đa hóa trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự hiện diện của một số vị trí gắn kết kháng nguyên đặc hiệu trong phức hợp kháng thể hoặc polypeptit. Ví dụ, “kháng thể hóa trị một” có nghĩa là có một vị trí gắn kết kháng nguyên trong phức hợp polypeptit; “Phức hợp polypeptit hóa trị một” có nghĩa là có một vị trí gắn kết kháng nguyên trong phức hợp polypeptit; “Kháng thể hóa trị hai” có nghĩa là có hai vị trí liên kết kháng nguyên trong kháng thể, “Phức hợp polypeptit hóa trị hai” có nghĩa là có hai vị trí gắn kết kháng nguyên trong phức hợp polypeptit; “Kháng thể hóa trị ba” có nghĩa là có ba vị trí gắn kết kháng nguyên trong kháng thể, “Phức hợp polypeptit hóa trị ba” có nghĩa là có ba vị trí gắn kết kháng nguyên

trong phức hợp polypeptit; “Kháng thể đa hóa trị” có nghĩa là có nhiều (ba hoặc nhiều hơn) vị trí gắn kết kháng nguyên trong kháng thể, và “Phức hợp polypeptit đa hóa trị” có nghĩa là có nhiều (hai hoặc nhiều) vị trí gắn kết kháng nguyên trong phức hợp polypeptit.

Thuật ngữ “protein dung hợp kháng thể” để chỉ protein dung hợp có hoạt tính sinh học được hình thành bằng cách liên kết một protein quan tâm (polypeptit) với globulin miễn dịch. Protein dung hợp có hoạt tính sinh học của cả protein liên kết và của globulin miễn dịch.

Trình tự của khoảng 110 axit amin gần đầu tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thay đổi lớn và là vùng biến đổi (Fv region); trình tự axit amin còn lại gần đầu tận cùng C tương đối ổn định và là vùng hằng định. Vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến đổi (HVR) và 4 vùng khung (FR) với trình tự tương đối bảo toàn. 3 vùng siêu biến đổi xác định tính đặc hiệu của kháng thể còn được gọi là vùng xác định tính bổ thể (CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm 3 vùng CDR và 4 vùng FR. Thứ tự từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl là: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 3 vùng CDR của chuỗi nhẹ để chỉ LCDR1, LCDR2 và LCDR3; và 3 vùng CDR của chuỗi nặng để chỉ HCDR1, HCDR2 và HCDR3.

Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể của chuột nhắt, kháng thể thể khảm, kháng thể nhân tạo và kháng thể hoàn toàn của người, tốt hơn là kháng thể nhân tạo.

Thuật ngữ “kháng thể của chuột nhắt” trong sáng chế là kháng thể đơn dòng chống lại PD-1 của người được điều chế theo kiến thức và hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong quá trình điều chế, đối tượng thử nghiệm được tiêm kháng nguyên PD-1, và sau đó các thể lai hóa biểu hiện kháng thể với các đặc tính trình tự hoặc chức năng mong muốn được phân lập. Theo phương án được ưu tiên theo sáng chế, kháng thể kháng PD-1 của chuột nhắt hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có thể còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của chuột nhắt hoặc biến thể của chúng, hoặc còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 của chuột nhắt hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ “kháng thể thể khảm” là kháng thể được hình thành bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhắt với vùng hằng định của kháng thể của người, có thể giảm bớt đáp ứng miễn dịch gây ra bởi kháng thể của chuột nhắt. Việc thiết

lập kháng thể thể khảm yêu cầu đầu tiên thiết lập một thể lai hóa tiết ra kháng thể đơn dòng đặc hiệu của chuột nhắt, sau đó tách dòng vô tính gen vùng biến đổi từ tế bào lai hóa của chuột nhắt, và sau đó tách dòng vô tính gen vùng hằng định của kháng thể của người khi cần thiết, liên kết gen vùng biến đổi của chuột nhắt với gen vùng hằng định của người để tạo ra gen khảm, cài xen gen khảm vào véc-tơ biểu hiện, và cuối cùng biểu hiện phân tử kháng thể thể khảm trong hệ thống nhân chuẩn hoặc hệ thống nhân sơ. Theo phương án được ưu tiên theo sáng chế, kháng thể chuỗi nhẹ của kháng thể thể khảm PD-L1 còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của người hoặc biến thể của chúng. Kháng thể chuỗi nặng của kháng thể thể khảm PD-1 còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc bao gồm biến thể IgG1, IgG2, hoặc IgG4 với các đột biến axit amin (ví dụ, các đột biến L234A và/hoặc L235A, và/hoặc các đột biến S228P).

Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo”, còn được gọi là kháng thể ghép CDR, để chỉ kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR của chuột nhắt vào vùng khung của vùng biến đổi của kháng thể của người, nghĩa là, để chỉ kháng thể được tạo ra trong các dạng trình tự vùng khung kháng thể dòng mầm khác nhau của người. Nó có thể khắc phục được phản ứng dị thể gây ra bởi kháng thể thể khảm vì nó mang một lượng lớn các thành phần protein của chuột nhắt. Các trình tự vùng khung như vậy có thể thu được từ cơ sở dữ liệu DNA công cộng hoặc tài liệu tham khảo đã xuất bản bao gồm trình tự gen kháng thể dòng mầm. Ví dụ, trình tự DNA dòng mầm của gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người “VBase” (có sẵn trên Internet www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), cũng như trong Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, ấn bản thứ 5. Để tránh giảm hoạt tính đồng thời do giảm tính sinh miễn dịch, trình tự vùng khung vùng biến đổi của kháng thể của người có thể bị đột biến nghịch tối thiểu hoặc đột biến ngược để duy trì hoạt tính. Kháng thể nhân tạo theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể nhân tạo đã được đưa tiếp vào sự trưởng thành ái lực của CDR bằng cách hiển thị nấm men.

Do các gốc tiếp xúc với kháng nguyên, việc ghép CDR có thể làm giảm ái lực của kháng thể được tạo ra hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng với kháng nguyên do các gốc của vùng khung tiếp xúc với kháng nguyên. Những tương tác như vậy có thể là kết quả của sự siêu đột biến các tế bào xôma. Do đó, vẫn có thể cần phải ghép các axit

amin vùng khung của thể cho đó với vùng khung của kháng thể nhân tạo. Các gốc axit amin liên quan đến gắn kết kháng nguyên và từ các kháng thể không phải của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được xác định bằng cách kiểm tra trình tự và cấu trúc của vùng biến đổi kháng thể đơn dòng của động vật. Các gốc trong vùng khung thể cho CDR khác với dòng mầm có thể được coi là có liên quan. Nếu dòng mầm gần nhất không thể xác định được, trình tự có thể được so sánh với trình tự liên ứng của lớp phụ hoặc của trình tự kháng thể của động vật với tỷ lệ phần trăm mức tương tự cao. Các gốc vùng khung hiếm được cho là kết quả của sự siêu đột biến các tế bào soma và do đó đóng vai trò quan trọng trong việc gắn kết.

Theo một phương án theo sáng chế, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng có thể còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ của người hoặc chuột nhắt hoặc biến thể của chúng, hoặc còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của người hoặc IgG1, IgG2, IgG3 của chuột nhắt, IgG4 hoặc biến thể của chúng; tốt hơn là bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2 hoặc IgG4 của người, hoặc biến thể IgG1, IgG2 hoặc IgG4 với các đột biến axit amin (ví dụ, đột biến L234A và/hoặc L235A, và/hoặc đột biến S228P).

“Biến thể thông thường” của vùng hằng định chuỗi nặng kháng thể của người và vùng hằng định chuỗi nhẹ kháng thể của người được sử dụng trong bản mô tả để chỉ biến thể của vùng hằng định chuỗi nặng hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ đã được bộc lộ trong giải pháp kỹ thuật đã biết và không thay đổi cấu trúc và chức năng của vùng biến đổi của kháng thể. Các biến thể được lấy làm ví dụ bao gồm biến thể của vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 với các đột biến hướng vị trí và các thay thế axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng. Các thay thế đặc hiệu là, như đột biến YTE, L234A và/hoặc đột biến L235A, đột biến S228P, và/hoặc đột biến để thu được cấu trúc núp-vào-lỗ (tạo ra kháng thể chuỗi nặng có tổ hợp của Fc núp và Fc lỗ) đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các đột biến này đã được xác nhận là tạo ra kháng thể có đặc tính mới, nhưng không thay đổi chức năng của vùng biến đổi của kháng thể.

Thuật ngữ “HuMAb”, “kháng thể của người”, “kháng thể hoàn chỉnh của người” và “kháng thể hoàn toàn của người” có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và có thể để chỉ kháng thể có nguồn gốc từ người hoặc kháng thể thu được từ sinh vật được biến đổi di truyền được “xử lý di truyền” để tạo ra kháng thể của người đặc hiệu để đáp ứng với

kích thích kháng nguyên và có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong một số công nghệ, các yếu tố của các locut chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào dòng tế bào của sinh vật có nguồn gốc từ dòng tế bào gốc phôi, trong đó các locut chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nội sinh đã được phá vỡ đích bởi những gì hướng đích các locut chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nội sinh chứa trong các dòng tế bào này. Sinh vật chuyển gen có thể tổng hợp kháng thể của người đặc hiệu với kháng nguyên của người, và sinh vật có thể được sử dụng để sản xuất thể lai hóa tiết ra kháng thể của người. Kháng thể của người có thể cũng là kháng thể trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bởi trình tự nucleotit có nguồn gốc từ một hoặc nhiều nguồn DNA của người. Kháng thể hoàn toàn của người có thể cũng được xây dựng bằng phương pháp chuyển nạp gen hoặc nhiễm sắc thể và công nghệ hiển thị thể thực khuẩn, hoặc được xây dựng từ các tế bào B được hoạt hóa *in vitro*, tất cả các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn”, “kháng thể hoàn chỉnh” và “toàn bộ kháng thể” được sử dụng thay thế cho nhau ở đây và để chỉ kháng thể ở dạng gần như nguyên vẹn, như được phân biệt với mảnh gắn kết kháng nguyên được xác định dưới đây. Thuật ngữ này để chỉ cụ thể kháng thể trong đó chuỗi nặng bao gồm vùng Fc.

Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” hoặc “mảnh chức năng” của kháng thể để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể giữ lại khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên (ví dụ, PD-1). Đã thấy rằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể được sử dụng để thực hiện chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ về mảnh gắn kết bao gồm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một bao gồm các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, bao gồm các mảnh hóa trị hai của hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối disulfua trong vùng bản lề, (iii) mảnh Fd bao gồm các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv bao gồm các miền VH và VL của một nhánh của kháng thể; (v) các miền đơn hoặc mảnh dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), bao gồm miền VH; và (vi) phân lập vùng xác định bổ sung (CDR) hoặc (vii) tổ hợp của hai hoặc nhiều CDR đã được phân lập, liên kết tùy ý bởi các liên kết cầu nối tổng hợp. Ngoài ra, mặc dù hai miền VL và VH của mảnh Fv được mã hóa bằng các gen riêng biệt, phương pháp tái tổ hợp có thể được sử dụng để liên kết chúng bằng cầu nối liên kết tổng hợp để nó có thể được sản xuất dưới

dạng một chuỗi protein đơn trong đó cặp vùng VL và VH tạo ra phân tử hóa trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); xem, ví dụ, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; và Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879-5883). Kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được dự định được bao gồm trong thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” của kháng thể. Các mảnh kháng thể như vậy thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các chức năng của các mảnh được sàng lọc theo cách tương tự như các chức năng của kháng thể nguyên vẹn. Các gốc gắn kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt bằng enzym hoặc hóa học globulin miễn dịch nguyên vẹn. Kháng thể có thể là kháng thể của các isotyp khác nhau, ví dụ, kháng thể IgG (ví dụ, các phân nhóm IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm Fab, F(ab')₂, Fab', kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được dime hóa (kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch), vùng V đã được làm ổn định liên kết disulfua (dsFv), peptit chứa CDR và các dạng tương tự.

Fab là mảnh kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, và nó thu được bằng cách xử lý các phân tử kháng thể IgG với proteaza papain (phân cắt gốc axit amin ở vị trí 224 của chuỗi H), trong đó khoảng một nửa phía đầu tận cùng N của chuỗi H và toàn bộ chuỗi L được nối với nhau bằng các liên kết disulfua.

Fab theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng papain để xử lý kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 của người và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng. Ngoài ra, Fab có thể được sản xuất bằng cách cài xen DNA mã hóa Fab của kháng thể vào véc-tơ biểu hiện nhân sơ hoặc véc-tơ biểu hiện nhân chuẩn và đưa véc-tơ này vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn để biểu hiện Fab.

F(ab')₂ là mảnh kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 100.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên và bao gồm hai vùng Fab được liên kết ở vị trí bản lề, và nó thu được bằng cách phân cắt phần dưới của hai liên kết disulfua trong vùng bản lề của IgG bằng enzym pepsin.

$F(ab')_2$ theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng pepsin để xử lý kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 của người và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng. Ngoài ra, $F(ab')_2$ có thể được sản xuất bằng cách liên kết Fab 'được mô tả dưới đây với liên kết thioete hoặc liên kết disulfua.

Fab' là mảnh kháng thể có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên thu được bằng cách phân cắt liên kết disulfua trong vùng bản lề của $F(ab')_2$. Fab' theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng tác nhân khử, ví dụ, dithiothreitol để xử lý $F(ab')_2$ theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng.

Ngoài ra, Fab' có thể được sản xuất bằng cách cài xen DNA mã hóa mảnh Fab' của kháng thể vào véc-tơ biểu hiện nhân sơ hoặc véc-tơ biểu hiện nhân chuẩn và sau đó đưa véc-tơ này vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn để biểu hiện Fab'.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn", "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (hoặc vùng; VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc vùng; VL) được liên kết bởi cầu nối liên kết. Các phân tử scFv như vậy có thể có cấu trúc chung: NH_2 -VL-liên kết cầu nối-VH-COOH hoặc NH_2 -VH-liên kết cầu nối-VL-COOH. Liên kết cầu nối thích hợp trong giải pháp kỹ thuật đã biết bao gồm các trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc các biến thể của chúng, ví dụ, biến thể với 1 đến 4 trình tự lặp lại (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Các liên kết cầu nối khác có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong Alftan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 và Roovers et al. (2001), Cancer Immunol.

scFv theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: thu nhận cDNA mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 của người và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng, cấu trúc DNA mã hóa scFv, cài xen DNA vào véc-tơ biểu hiện nhân sơ hoặc véc-tơ biểu hiện nhân chuẩn, và sau đó đưa véc-tơ biểu hiện vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn để biểu hiện scFv.

Kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch là mảnh kháng thể trong đó scFv được dime hóa, và là mảnh kháng thể với hoạt tính gắn kết kháng nguyên hóa trị hai. Trong hoạt tính gắn kết kháng nguyên hóa trị hai, hai kháng nguyên có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: thu nhận cDNA mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 của người và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng, cấu trúc DNA mã hóa scFv sao cho liên kết cầu nối peptit có chiều dài là 8 hoặc thấp hơn gốc trình tự axit amin, cài xen DNA vào véc-tơ biểu hiện nhân sơ hoặc véc-tơ biểu hiện nhân chuẩn, và sau đó đưa véc-tơ biểu hiện vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn để biểu hiện kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch.

dsFv thu được bằng cách liên kết polypeptit trong đó một gốc axit amin trong mỗi VH và VL được thay thế bằng gốc xystein thông qua liên kết disulfua giữa các gốc xystein. Các gốc axit amin được thay thế bằng các gốc xystein có thể được chọn theo phương pháp đã biết (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) dựa trên dự đoán về kháng cấu trúc ba chiều của kháng thể.

DsFv theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: thu nhận cDNA mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 của người và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng, cấu trúc DNA mã hóa dsFv, cài xen DNA vào véc-tơ biểu hiện nhân sơ hoặc véc-tơ biểu hiện nhân chuẩn, và sau đó đưa véc-tơ biểu hiện vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn để biểu hiện dsFv.

Peptit chứa CDR được cấu trúc bằng một hoặc nhiều vùng bao gồm các CDR của VH hoặc VL. Peptit chứa nhiều CDR có thể được liên kết trực tiếp hoặc thông qua liên kết cầu nối peptit phù hợp.

Peptit chứa CDR theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: cấu trúc các DNA mã hóa các CDR của VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận diện đặc hiệu PD-1 của người và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng, cài xen các DNA vào véc-tơ biểu hiện nhân sơ hoặc véc-tơ biểu hiện nhân chuẩn, và sau đó đưa véc-tơ biểu hiện vào sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật

nhân chuẩn để biểu hiện peptit. Peptit chứa CDR có thể cũng được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học, ví dụ, phương pháp Fmoc hoặc phương pháp tBoc.

Thuật ngữ “sự khác biệt axit amin” hoặc “đột biến axit amin” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự có mặt của các thay đổi axit amin hoặc các đột biến trong protein hoặc biến thể polypeptit so với protein hoặc polypeptit ban đầu, bao gồm có 1, 2, 3 hoặc nhiều cái xen, khuyết đoạn hoặc thay thế axit amin trên cơ sở protein hoặc polypeptit ban đầu.

Thuật ngữ “vùng khung kháng thể” hoặc “vùng FR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc của VL hoặc VH của miền biến đổi, đóng vai trò như vùng khung cho vòng gắn kết kháng nguyên (CDR) của miền biến đổi. Về cơ bản, nó là miền biến đổi không có CDR.

Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung”, “CDR” hoặc “vùng siêu biến đổi” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một trong sáu vùng siêu biến đổi trong miền biến đổi của kháng thể điều đó chủ yếu góp phần vào việc gắn kết kháng nguyên. Nói chung, có ba CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng, và ba CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) trong mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Hệ thống đánh số thứ tự đã biết bất kỳ có thể được sử dụng để xác định ranh giới trình tự axit amin của CDR, bao gồm hệ thống đánh số thứ tự “Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, ấn bản thứ 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), hệ thống đánh số thứ tự “Chothia” (xem Al-Lazikani et al., (1997) hệ thống đánh số thứ tự JMB 273:927-948) và ImmunoGenTics (IMGT) (Lefranc M. P., Immunologist, 7, 132- 136 (1999); Lefranc, M. P., et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)), v.v. Ví dụ, đối với định dạng cổ điển, tuân theo tiêu chí Kabat, việc đánh số gốc axit amin CDR trong miền biến đổi chuỗi nặng (VH) là 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3); việc đánh số gốc axit amin CDR trong miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) là 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) và 89-97 (LCDR3). Theo tiêu chí Chothia, việc đánh số gốc axit amin CDR trong VH là 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3); và việc đánh số gốc axit amin trong VL là 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) và 91-96 (LCDR3). Theo sự kết hợp của các định nghĩa CDR của cả Kabat và Chothia, CDR bao gồm các gốc axit amin 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3) ở VH của người và các gốc axit amin 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) và 89-

97 (LCDR3) ở VL của người. Theo tiêu chí IMGT, việc đánh số gốc axit amin CDR trong VH là xấp xỉ 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) và 93-102 (CDR3), và việc đánh số gốc axit amin CDR trong VL là xấp xỉ 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) và 89-97 (CDR3). Theo tiêu chí IMGT, các vùng CDR của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình IMGT/DomainGap Align.

Thuật ngữ “epitop” hoặc “yếu tố quyết định kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn kết đặc hiệu (ví dụ, vị trí đặc hiệu trên phân tử PD-L1). Epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp trong cấu trúc không gian độc đáo. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E.Morris, Ed. (1996).

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu”, “gắn kết chọn lọc”, “gắn kết một cách chọn lọc” và “gắn kết đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gắn kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên đã được xác định sơ bộ. Nói chung, kháng thể gắn kết với ái lực (KD) thấp hơn khoảng 10^{-8} M, ví dụ, thấp hơn khoảng 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M hoặc thấp hơn.

Thuật ngữ “KD” hoặc “Kd” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hằng số cân bằng phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Nói chung, kháng thể theo sáng chế gắn kết với PD-1 với hằng số cân bằng phân ly (KD) thấp hơn khoảng 10^{-7} M, ví dụ, thấp hơn khoảng 10^{-8} M hoặc 10^{-9} M, ví dụ, như được đo trong thiết bị BIACORE sử dụng công nghệ cộng hưởng plasma bề mặt (SPR).

Khi thuật ngữ “cạnh tranh” được sử dụng trong bối cảnh các protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh cho cùng một epitop (ví dụ, trung hòa các protein gắn kết kháng nguyên hoặc trung hòa kháng thể), nó đề chỉ tính cạnh tranh giữa các protein gắn kết kháng nguyên, và có thể được xác định bằng thử nghiệm sau: trong thử nghiệm, protein gắn kết kháng nguyên cần thử nghiệm (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn chức năng miễn dịch của nó) phòng ngừa hoặc ức chế (ví dụ, giảm) gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu (ví dụ, phối tử hoặc kháng thể tham chiếu) với kháng nguyên chung (ví dụ, PD-1 hoặc mảnh của chúng). Nhiều dạng thử nghiệm nghiệm gắn kết cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định xem một protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh với protein khác không, các thử nghiệm này là, ví dụ: thử nghiệm miễn dịch phóng xạ trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym trực tiếp hoặc gián tiếp

pha rắn (EIA), thử nghiệm cạnh tranh kẹp (sandwich) (xem, ví dụ Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), thử nghiệm dán nhãn trực tiếp pha rắn, thử nghiệm kẹp (sandwich) dán nhãn trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA dán nhãn trực tiếp pha rắn với các nhãn I-125 (xem, ví dụ, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Cheung et al., 1990, *Virology* 176: 546-552); và RIA dán nhãn trực tiếp (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Nói chung, thử nghiệm liên quan đến việc sử dụng kháng nguyên tinh khiết gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào mang protein liên kết kháng nguyên không được dán nhãn đang được thử nghiệm hoặc protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu được dán nhãn. Sự ức chế cạnh tranh được đo bằng cách đo lượng nhãn gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào với sự có mặt của protein liên kết kháng nguyên đang được thử nghiệm. Thông thường, protein gắn kết kháng nguyên đang được thử nghiệm là vượt quá. Protein gắn kết kháng nguyên được nhận diện bằng thử nghiệm cạnh tranh (protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh) bao gồm: protein gắn kết kháng nguyên gắn kết với cùng epitop như protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu; và protein gắn kết kháng nguyên gắn kết với các epitop liền kề đủ gần với epitop gắn kết của protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu, hai epitop cản trở lẫn nhau trong không gian khỏi sự gắn kết. Chi tiết bổ sung về các phương pháp được sử dụng để xác định gắn kết cạnh tranh được cung cấp trong các ví dụ ở đây. Thông thường, khi protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh có mặt quá mức, nó sẽ ức chế (ví dụ, giảm) gắn kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu với kháng nguyên chung ít nhất 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70%-75% hoặc 75% hoặc nhiều hơn. Trong một số trường hợp, gắn kết này bị ức chế ít nhất 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, hoặc 97% hoặc nhiều hơn.

Thuật ngữ “axit nucleic” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ADN và ARN. Axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép, và tốt hơn là ADN sợi kép hoặc ARN thông tin sợi đơn hoặc ARN thông tin cải biến. Khi một axit nucleic được đặt trong môi quan hệ chức năng với một trình tự axit nucleic khác, axit nucleic được “liên kết có điều khiển”. Ví dụ, nếu trình tự khởi động hoặc trình tự tăng cường ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của trình tự ghi mã, thì trình tự khởi động hoặc trình tự tăng cường được liên kết có điều khiển với trình tự ghi mã.

Thuật ngữ “vector” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó đã được liên kết. Theo một số phương án, vector là “plasmid” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một vòng ADN sợi kép hình tròn mà các đoạn ADN bổ sung có thể được nối với nhau. Theo phương án khác, vector là vector virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được gắn vào bộ gen của virus. Vector được mô tả ở đây có khả năng tự sao chép trong tế bào vật chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có nguồn gốc vi khuẩn sao chép và vector động vật có vú theo chu kỳ) hoặc có thể được tích hợp vào bộ gen của tế bào vật chủ khi được đưa vào tế bào vật chủ, và do đó được sao chép cùng với bộ gen của vật chủ (ví dụ, vector không phải động vật có vú theo chu kỳ).

Phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là đã biết trong lĩnh vực này, như tài liệu *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Chapters 5-8 và 15. Ví dụ, chuột nhắt nhắt có thể được gây miễn dịch bằng PD-1 của người, hoặc mảnh của nó, sau đó các kháng thể thu được có thể được tái tạo, tinh chế, và giải trình tự axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Mảnh gắn kết kháng nguyên cũng có thể được sản xuất bằng các phương pháp thông thường. Một hoặc nhiều vùng khung của người (FR) được bổ sung vào các vùng CDR không phải của người của các kháng thể và các mảnh kháng thể gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bằng cách sử dụng phương pháp kỹ thuật gen. Các trình tự dòng mầm FR của người có thể thu được từ ImmunoGeneTics (IMGT) trang web <http://imgt.cines.fr> bằng cách so sánh cơ sở dữ liệu gen dòng mầm vùng biến đổi kháng thể của người và phần mềm MOE, và thu được từ *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN 012441351.

Thuật ngữ “tế bào vật chủ” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ tế bào mà vector biểu hiện đã được đưa vào. Tế bào vật chủ có thể bao gồm vi khuẩn, vi sinh vật, tế bào thực vật hoặc động vật. Vi khuẩn có thể dễ dàng biến đổi bao gồm các thành viên của các chủng *enterobacteriaceae*, ví dụ *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; *Bacillaceae* ví dụ *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Dòng tế bào vật chủ động vật thích hợp bao gồm các tế bào CHO (*Chinese Hamster Ovary Cell Line*: Dòng tế bào buồng trứng chuột nhắt đồng Trung Quốc) và NS0.

Kháng thể được thiết kế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sản xuất và tinh chế bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, trình tự ADN bổ sung mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tách dòng và tái tổ hợp vào vectơ biểu hiện GS. Sau đó, vectơ biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp này có thể được chuyển nạp ổn định vào tế bào CHO. Theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này được khuyến cáo nhiều hơn, các hệ biểu hiện của động vật có vú sẽ dẫn đến glycosyl hóa kháng thể, thông thường ở các vị trí đầu tận cùng N có độ bảo thủ cao trong vùng Fc. Các dòng ổn định thu được nhờ biểu hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu PD-1 của người. Các dòng dương tính có thể được tăng sinh trên môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh trong thiết bị phản ứng sinh học để sản sinh kháng thể. Môi trường nuôi cấy trong đó các kháng thể được bài tiết, có thể được tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, bằng cách sử dụng cột A hoặc G Sepharose FF với dung dịch đệm được điều chỉnh để tinh chế. Các thành phần gắn kết không đặc hiệu được rửa sạch. Sau đó, các kháng thể gắn kết được rửa giải bằng phương pháp gradien pH, và các đoạn kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE và được thu thập. Kháng thể này có thể được lọc và cô bằng các kỹ thuật thông thường. Các hỗn hợp và polyme hòa tan có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, ví dụ rây phân tử và trao đổi ion. Sau đó, sản phẩm thu được được làm đông lạnh ngay, ví dụ ở nhiệt độ -70°C , hoặc có thể được làm đông khô.

Liên quan đến động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, thuật ngữ “sử dụng”, “cấp cho” hoặc “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quá trình tiếp xúc của dược chất hoặc dược phẩm điều trị, chẩn đoán ngoại sinh với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. Thuật ngữ “sử dụng”, “cấp cho” hoặc “điều trị” cũng được sử dụng trong bản mô tả để chỉ, ví dụ phương pháp điều trị bệnh, nghiên cứu dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thử nghiệm. Phương pháp điều trị tế bào bao gồm quá trình tiếp xúc của chất phản ứng với tế bào, cũng như quá trình tiếp xúc của chất phản ứng với dịch thể, trong đó dịch thể này tiếp xúc với tế bào. Thuật ngữ “sử dụng”, “cấp cho” hoặc “điều trị” cũng sử dụng để chỉ việc điều trị, ví dụ bằng chất phản ứng, chẩn đoán, chế phẩm gắn kết, hoặc bằng tế bào khác *in vitro* hoặc *ex vivo*. Liên quan đến người, động vật, hoặc đối tượng nghiên cứu, thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ứng dụng điều trị bệnh, phòng ngừa hoặc phòng ngừa, nghiên cứu và chẩn đoán.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc sử dụng tác nhân điều trị bên trong hoặc bên ngoài, ví dụ chế phẩm chứa hợp chất gắn kết theo sáng chế, cho đối tượng bị bệnh có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh trong đó được chất này có hoạt tính điều trị bệnh đã biết. Thông thường, dược chất này được sử dụng ở lượng hữu hiệu để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở đối tượng bị bệnh hoặc quần thể đối tượng bị bệnh cần điều trị, để gây ra sự hồi quy của các triệu chứng này hoặc ức chế tiến triển của các triệu chứng này ở mức độ bất kỳ đo được trên lâm sàng. Lượng của dược chất hữu hiệu để làm giảm triệu chứng bệnh bất kỳ (cũng được gọi là “lượng hữu hiệu điều trị bệnh”) có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố, như tình trạng bệnh, độ tuổi, và cân nặng của đối tượng bị bệnh, và khả năng của dược chất để tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng bị bệnh. Triệu chứng bệnh đã được làm giảm có thể được đánh giá bằng đại lượng đo bất kỳ trên lâm sàng thông thường được sử dụng bởi các bác sĩ hoặc nhân viên chăm sóc sức khỏe khác để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tiến triển của triệu chứng đó. Mặc dù các phương án của sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc vật phẩm sản xuất) có thể không hữu hiệu trong việc làm giảm triệu chứng bệnh cụ thể ở mọi đối tượng bị bệnh, nhưng như được xác định bằng phép kiểm định thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này như phép kiểm định Student t, phép kiểm định chi bình phương, phép kiểm định U theo Mann và Whitney, phép kiểm định Kruskal-Wallis (phép kiểm định H), phép kiểm định Jonckheere-Terpstra và phép kiểm định Wilcoxon, chúng có thể sẽ làm giảm triệu chứng bệnh đích ở một số đáng kể về mặt thống kê các bệnh nhân.

Thuật ngữ “gốc cải biến bảo thủ” hoặc “phần tử hoặc gốc thay thế bảo thủ” được sử dụng để chỉ gốc thay thế axit amin trong protein bằng các axit amin khác có đặc tính tương tự (ví dụ, điện tích, kích cỡ chuỗi bên, đặc tính kỵ nước/thân nước, cấu trúc vùng khung và độ bền, v.v.), sao cho các gốc thay đổi này có thể được tạo ra thường xuyên mà không làm giảm hoạt tính sinh học của protein. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng gốc thay thế axit amin duy nhất trong các vùng không thiết yếu của polypeptit gần như không làm thay đổi hoạt tính sinh học (ví dụ, xem Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Ngoài ra, các gốc thay thế bằng các axit amin tương tự về cấu trúc hoặc chức năng ít có khả năng làm biến đổi hoạt tính sinh học. Các gốc thay thế bảo thủ tiêu biểu được chỉ ra trong Bảng “Gốc thay thế bảo thủ của các axit amin tiêu biểu”.

Bảng 3. Gốc cải biến bảo thủ của các axit amin tiêu biểu

Gốc ban đầu	Gốc thay thế bảo thủ
Ala(A)	Gly; Ser
Arg(R)	Lys; His
Asn(N)	Gln; His; Asp
Asp(D)	Glu; Asn
Cys(C)	Ser; Ala; Val
Gln(Q)	Asn; Glu
Glu(E)	Asp; Gln
Gly(G)	Ala
His(H)	Asn; Gln
Ile(I)	Leu; Val
Leu(L)	Ile; Val
Lys(K)	Arg; His
Met(M)	Leu; Ile; Tyr
Phe(F)	Tyr; Met; Leu
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val(V)	Ile; Leu

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” hoặc “liều hữu hiệu” được sử dụng để chỉ lượng được chất, hợp chất hoặc được phẩm cần thiết để thu được một hoặc nhiều kết quả điều trị có lợi hoặc mong muốn bất kỳ. Để sử dụng phòng ngừa, kết quả điều trị có lợi hoặc mong muốn bao gồm loại trừ hoặc làm giảm nguy cơ, làm giảm triệu chứng hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh, bao gồm cả các triệu chứng sinh hóa, mô học và hành vi của bệnh, các biến chứng của bệnh và các kiểu hình bệnh lý trung gian xảy ra trong quá trình phát triển của bệnh. Đối với các ứng dụng điều trị, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm các kết quả lâm sàng, ví dụ giảm tỷ lệ mắc các rối loạn liên quan đến kháng nguyên đích khác nhau theo sáng chế hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn, giảm liều của các tác nhân khác cần thiết để điều trị rối loạn, tăng cường hiệu quả điều trị của một tác nhân khác, và/hoặc trì hoãn sự tiến triển của rối loạn liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế của bệnh nhân.

Thuật ngữ “ngoại sinh” được sử dụng để chỉ các chất được sản sinh bên ngoài sinh vật, tế bào hoặc cơ thể người, tùy thuộc vào ngữ cảnh. Thuật ngữ “nội sinh” được sử dụng để chỉ các chất được sản sinh bên trong sinh vật, tế bào hoặc cơ thể người, tùy thuộc vào ngữ cảnh.

Thuật ngữ “độ tương đồng” được sử dụng để chỉ độ tương đồng trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai polypeptit. Khi các vị trí trong hai trình tự được so sánh được chiếm bởi cùng một đơn vị gốc hoặc đơn vị axit amin, ví dụ, nếu mỗi vị trí của

hai phân tử ADN bị chiếm bởi adenin, thì các phân tử là tương đồng ở vị trí đó. Tỷ lệ phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là một hàm của số vị trí phù hợp hoặc tương đồng được chia sẻ bởi hai trình tự chia cho số vị trí được so sánh $\times 100$. Ví dụ, trong cách sắp xếp trình tự tối ưu, nếu có 6 vị trí trong số 10 vị trí trong hai trình tự tương đồng hoặc tương tự với nhau, thì hai trình tự này có độ tương đồng là 60%; nếu có 95 vị trí trong số 100 vị trí trong hai trình tự tương đồng hoặc tương tự với nhau, thì hai trình tự này có độ tương đồng là 95%. Nói chung, khi hai trình tự được sắp thẳng hàng, so sánh được thực hiện để đưa ra tỷ lệ phần trăm tương đồng tối đa. Ví dụ, phép so sánh có thể được thực hiện bằng thuật toán BLAST, trong đó các tham số của thuật toán được chọn để tạo ra sự phù hợp lớn nhất giữa mỗi chuỗi trên toàn bộ chiều dài của mỗi chuỗi tham chiếu. Các tài liệu tham khảo sau liên quan đến thuật toán BLAST thường được sử dụng để phân tích trình tự: BLAST ALGORITHMS: Altschul, S. F. et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. et al., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L. et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F. et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. et al., (1997) Genome Res. 7:649-656. Các thuật toán BLAST thông thường khác như được cung cấp bởi NCBI BLAST cũng là đã biết với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “tế bào”, “dòng tế bào” và “chủng tế bào” được sử dụng thay thế cho nhau và để chỉ tế bào và các thế hệ sau của nó. Do đó, thuật ngữ “chuyển gen” và “tế bào chuyển gen” được sử dụng để chỉ tế bào sơ cấp và các chủng có nguồn gốc từ tế bào này mà không phụ thuộc vào số lần cấy chuyển. Cần hiểu rằng, do các đột biến vô ý hoặc cố ý, toàn bộ các tế bào thế hệ sau có thể không giống hệt nhau về khía cạnh hàm lượng ADN. Đột biến thế hệ sau có thể có chức năng hoặc hoạt tính sinh học tương tự như tế bào chuyển gen gốc thu được bằng cách sàng lọc. Nó sẽ được hiểu rõ ràng từ ngữ cảnh khi một tên khác được đề cập đến.

“Phản ứng chuỗi polymeraza” hoặc “PCR” như được sử dụng ở đây là để chỉ quy trình hoặc kỹ thuật trong đó một lượng vết của một phần cụ thể của axit nucleic, ARN và/hoặc ADN được khuếch đại như được mô tả trong ví dụ patent Mỹ số 4,683,195. Nói chung, cần có thông tin trình tự từ phần cuối hoặc bên ngoài vùng đích để có thể thiết kế các đoạn mồi oligonucleotit; các mồi này giống nhau hoặc tương tự về trình tự đối với các sợi tương ứng của khuôn mẫu cần khuếch đại. Các nucleotit đầu tận 5' của hai đoạn mồi có thể trùng với các đầu của vật liệu cần khuếch đại. PCR có thể được sử dụng để

khuếch đại trình tự ARN cụ thể, trình tự ADN cụ thể từ tổng số ADN bộ gen và ADN bổ sung, trình tự thực khuẩn thể hoặc plasmit được phiên mã từ tổng số ARN tế bào, v.v.. Xem tài liệu Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). PCR được sử dụng ở đây được coi là một ví dụ, nhưng không phải là ví dụ duy nhất, về phương pháp phản ứng polymeraza axit nucleic để khuếch đại mẫu thử axit nucleic và phương pháp này bao gồm việc sử dụng axit nucleic đã biết làm mồi và polymeraza axit nucleic để khuếch đại hoặc tạo ra phần cụ thể của axit nucleic.

Thuật ngữ “được phân lập” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ trạng thái tinh khiết và trong trường hợp này có nghĩa là phân tử được chỉ định về cơ bản không chứa các phân tử sinh học khác, ví dụ axit nucleic, protein, lipid, carbohydrat hoặc các vật liệu khác, ví dụ như mảnh vụn tế bào và môi trường tăng trưởng. Nói chung, thuật ngữ “được phân lập” không có ý nghĩa là sự vắng mặt hoàn toàn của các vật liệu này hoặc không có nước, chất đệm hoặc muối, trừ khi chúng có mặt với một lượng gây cản trở đáng kể đến việc sử dụng thử nghiệm hoặc điều trị của hợp chất như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “tùy ý” hoặc “hoặc tùy chọn” được sử dụng để chỉ sự việc hoặc tình huống có thể xuất hiện, nhưng không nhất thiết phải xuất hiện, và sự mô tả bao gồm các trường hợp trong đó sự việc hoặc tình huống xuất hiện hoặc không xuất hiện. Ví dụ, “tùy ý chứa 1 tới 3 vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể” có nghĩa là vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể có trình tự cụ thể, nhưng không nhất thiết phải có mặt.

Thuật ngữ “được phẩm” sử dụng để chỉ hỗn hợp của một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế này hoặc muối chấp nhận được về mặt sinh lý/muối được dụng của nó với các thành phần hóa học khác, và khác thành phần khác như chất mang và tá dược chấp nhận được về mặt sinh lý/được dụng. Mục đích của được phẩm là để tạo thuận lợi cho việc sử dụng hợp chất cho các cơ quan, có lợi cho việc hấp thu hoạt chất, nhờ đó sẽ thể hiện hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” sử dụng để chỉ chất không hoạt tính bất kỳ thích hợp để sử dụng trong chế phẩm để phân phối các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên. Chất mang có thể là chất chống kết dính, chất gắn kết, chất bao, chất gây rã, chất độn hoặc chất pha loãng, chất bảo quản (như chất chống oxy hóa, chất kháng khuẩn hoặc chất chống nấm), chất làm ngọt, chất làm chậm hấp thu, chất làm ướt, chất

nhũ hóa, chất đệm, v.v. Ví dụ về chất mang được dụng bao gồm nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propandiol, polyetylen glycol, v.v.) dextroza, dầu thực vật (ví dụ dầu ô liu), nước muối, dung dịch đệm, dung dịch muối đệm, và các chất đẳng trương ví dụ đường, polyol, sorbitol và natri clorua.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm các tác nhân để điều trị bệnh liên quan đến các tế bào dương tính kháng nguyên đích (ví dụ PD-1), các tác nhân này chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế làm hoạt chất.

Các bệnh liên quan đến PD-1 trong sáng chế không bị giới hạn, miễn là nó là bệnh liên quan đến PD-1. Ví dụ, đáp ứng điều trị được tạo ra bởi phân tử theo sáng chế có thể đạt được bằng cách gắn kết với PD-1 của người, và sau đó ức chế sự gắn kết của PD-1 và các phối tử của nó là PD-L1 và PD-L2, hoặc giết chết các tế bào khối u biểu hiện quá mức PD-1. Do đó, khi ở trong các chế phẩm và dược phẩm thích hợp cho các ứng dụng điều trị, các phân tử theo sáng chế rất hữu ích cho những người bị khối u hoặc bệnh ung thư, tốt hơn là u ác tính, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ, bệnh ung thư bàng quang, v.v.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ PD-1), các chất phản ứng để phát hiện miễn dịch hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ PD-1), phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định các tế bào biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ PD-1) và các tác nhân chẩn đoán để chẩn đoán bệnh liên quan đến các tế bào dương tính kháng nguyên đích (ví dụ PD-1), bao gồm kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế, đặc biệt nhận ra kháng nguyên đích (ví dụ PD-1 của người) và gắn kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc 3 chiều của nó, được sử dụng làm hoạt chất.

Theo sáng chế, phương pháp được sử dụng để phát hiện hoặc đo lường của kháng nguyên đích (ví dụ PD-1) có thể là phương pháp đã biết bất kỳ. Ví dụ, nó bao gồm phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc đo miễn dịch.

Phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc đo miễn dịch là phương pháp phát hiện hoặc đo lường kháng thể hoặc kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng thể hoặc kháng nguyên được dán nhãn. Ví dụ về phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc đo miễn dịch bao gồm thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA hoặc

ELISA), thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang (FIA), thử nghiệm miễn dịch nhấp nháy, tách chiết, các phương pháp lý-hóa, v.v..

Các bệnh liên quan đến tế bào dương tính PD-1 nêu trên có thể được chẩn đoán bằng cách phát hiện hoặc đo tế bào biểu hiện PD-1 bằng cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế.

Để phát hiện các tế bào biểu hiện polypeptit, có thể sử dụng các phương pháp phát hiện miễn dịch đã biết, tốt hơn là sử dụng kết tủa miễn dịch, nhuộm tế bào huỳnh quang, nhuộm hóa mô miễn dịch, v.v. Ngoài ra, có thể sử dụng phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang sử dụng hệ thống FMAT8100HTS (Applied Biosystem).

Theo sáng chế, không có giới hạn cụ thể nào đối với mẫu *in vivo* được sử dụng để phát hiện hoặc đo lường kháng nguyên đích (ví dụ PD-1), miễn là nó có khả năng chứa các tế bào biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ PD-1), ví dụ mô tế bào, máu, huyết tương, huyết thanh, dịch tụy, nước tiểu, phân, dịch mô hoặc dịch nuôi cấy.

Theo phương pháp chẩn đoán bắt buộc, chất chẩn đoán bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể của nó theo sáng chế cũng có thể bao gồm chất phản ứng để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể hoặc chất phản ứng để phát hiện phản ứng. Chất phản ứng được sử dụng để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể bao gồm chất đệm, muối, v.v. Chất phản ứng được sử dụng để phát hiện bao gồm chất phản ứng thường được sử dụng trong phương pháp đo hoặc phát hiện miễn dịch, ví dụ kháng thể thứ hai được đánh dấu nhận biết kháng thể đơn dòng, đoạn kháng thể của chúng hoặc liên hợp của chúng, và chất nền tương ứng với nhãn, v.v.

Điều chế kháng nguyên

1. Cấu trúc của kháng nguyên:

Protein dung hợp PD-1-IgG1Fc của người được thiết kế và tổng hợp, với 150 axit amin của vùng ngoại bào của PD-1 của người ở đầu cuối N và đoạn Fc của IgG1 của người (hIgG1Fc) ở đầu cuối C. Protein PD-1-Fc tái tổ hợp có độ tinh khiết cao có thể thu được sau khi tinh chế bằng cột ái lực của Protein A và được sử dụng để phát hiện sự gắn kết của kháng thể kháng PD-1 với kháng nguyên.

PD-1 của người-IgG1Fc (SEQ ID NO.1):

MEFGLSWLFLVAILKGVQCPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGADNT
 FTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
 HMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
 PAGQFQTLVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK.

Lưu ý: Phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần bình thường là vùng ngoại bào của PD-1 của người và phần in nghiêng là hIgG1Fc (peptit tín hiệu + vùng ngoại bào + hIgG1Fc).

PD-1-his của người (SEQ ID NO.2):

MEFGLSWLFLVAILKGVQCPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGADNT
 FTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
 HMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
 PAGQFQTLVGSSDYKDDDDKHHHHHH.

Kháng nguyên PD-1 được mã hóa bởi axit nucleic được chuyển nạp vào tế bào (SEQ ID NO.3):

MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGAD
 NTFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR
 DFHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
 PRPAGQFQTLVVGVGGLLGSLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDP
 SAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSA
 DGPRSAQPLRPEDGHCSWPL.

Điều chế các kháng thể

Kháng thể kháng PD-1 của người có thể được tạo ra bằng cách gây đáp ứng miễn dịch cho chuột nhắt và cũng có thể được lấy từ thư viện gây đáp ứng miễn dịch chuột nhắt thực khuẩn kháng PD-1 của người

Phương pháp điều chế kháng thể kháng PD-1 của người bằng cách gây miễn dịch cho chuột nhắt như sau:

1. Gây đáp ứng miễn dịch: chuột nhắt bạch SJL quy mô phòng thử nghiệm, cái, 6-8 tuần tuổi và chuột nhắt bạch Balb/c, cái, 6-8 tuần tuổi. Môi trường nuôi nhốt: Mức độ SPF. Sau khi mua chuột nhắt, chúng được nuôi trong môi trường phòng thử nghiệm trong 1 tuần dưới sự điều chỉnh của chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ 20-25°C; độ ẩm 40-60%. Các chuột nhắt thích nghi với môi trường được gây đáp ứng miễn dịch theo các giao thức khác nhau, với 6-10 con chuột nhắt trong mỗi nhóm. Kháng nguyên miễn dịch có thể là protein tái tổ hợp tinh khiết PD-1-IgG1Fc (xem SEQ ID NO.1), PD-1-his (xem SEQ ID NO.2), hoặc các tế bào Jurkat/CHO-PD-1 được truyền PD-1 làm kháng nguyên (xem SEQ ID NO.3). Một kháng nguyên đơn lẻ kết hợp với các chất bổ trợ miễn dịch khác nhau hoặc các loại kháng nguyên khác nhau có thể được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch chéo. Vị trí gây đáp ứng miễn dịch có thể là khoang bụng hoặc dưới da ở lưng, hoặc gây đáp ứng miễn dịch luân phiên tại hai vị trí. Chất bổ trợ miễn dịch TiterMax® Gold Adjuvant (sau đây gọi là Titermax, được mua từ Sigma, Cat. Số T2684) và Imject Alum Adjuvant (sau đây gọi là Alum, mua từ Pierce, Cat. Số 77161) được sử dụng cho gây đáp ứng miễn dịch. Tỷ lệ kháng nguyên với tá được (Titermax) là 1:1, tỷ lệ kháng nguyên với tá được (Alum) là 3:1, 25-50µg/con (gây đáp ứng miễn dịch lần đầu), 50 µg/con (gây đáp ứng miễn dịch tăng cường), hoặc 1×10^7 Jurkat/CHO-PD-1 tế bào/động vật. Vào ngày 0, 25-50µg/mỗi con kháng nguyên đã được nhũ hóa được tiêm trong màng bụng, mỗi tuần một lần hoặc hai tuần một lần sau lần gây đáp ứng miễn dịch đầu tiên, Titermax và Alum được sử dụng luân phiên, tổng cộng 5-8 lần.

2. Dung hợp tế bào: các chuột nhắt có hiệu giá kháng thể cao trong huyết thanh được chọn để dung hợp tế bào lá lách. Mất của chuột nhắt bị chảy máu trong 72 giờ sau khi gây đáp ứng miễn dịch nước rút. Các chuột nhắt bị giết bằng cách kéo cổ và cho vào 75% etanol để khử trùng. Tế bào lympho lách được dung hợp với tế bào u tủy bào Sp2/0 (Chinese Academy of Sciences) để thu được tế bào u lai bằng cách áp dụng quy trình dung hợp qua trung gian PEG được tối ưu hóa. Các tế bào thể lai được dung hợp được tái định chỉ trong môi trường hoàn chỉnh HAT (môi trường RPMI-1640 chứa 20% FBS, $1 \times$ HAT và $1 \times$ OPI), và được trích dẫn vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng ($1 \times 10^5/150\mu\text{l}$ /giếng), ủ ở 37°C, 5% CO₂, và được gieo mầm kết tinh hoàn toàn vào khoảng 10-30 đĩa. Vào ngày thứ 5 sau khi dung hợp, môi trường hoàn chỉnh HAT được bổ sung vào ở 50µl/giếng, và ủ ở 37°C, 5% CO₂. Từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 8 sau khi dung hợp,

theo mật độ tăng trưởng của tế bào, môi trường được thay đổi hoàn toàn ở 200 μ l/giếng, và được ủ ở 37°C, 5% CO₂.

3. Sàng lọc tế bào thể lai: 7-9 ngày sau khi dung hợp, theo mật độ tăng trưởng tế bào, phương pháp ELISA được thực hiện để phát hiện sự gắn kết của kháng thể với PD-1, và các tế bào trong giếng dương tính được phát hiện thêm bằng ELISA để phát hiện sự phong bế liên kết PD-1/PDL1. Môi trường trong các giếng dương được thay đổi và các ô được mở rộng thành các đĩa 24 giếng theo thời gian theo mật độ tế bào. Các dòng tế bào được chuyển vào các đĩa 24 giếng được kiểm tra lại, sau đó được bảo quản và tạo dòng vô tính phụ lần đầu tiên. Các mẫu dương tính trong lần sàng lọc tạo dòng vô tính phụ đầu tiên được bảo toàn, và tạo dòng vô tính phụ thứ hai hoặc thứ ba được thực hiện cho đến khi thu được các dòng vô tính đơn bào. Tế bào thể lai với tác dụng ngăn chặn sự liên kết của PD-1 và PDL1 được thu được bằng cách kết hợp nhiều lần.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người thông qua thư viện miễn dịch của thực khuẩn thể của chuột nhắt kháng PD-1 của người như sau:

1. Xây dựng thư viện miễn dịch của thực khuẩn thể của chuột nhắt kháng PD-1 của người: lá lách của chuột nhắt có hiệu giá kháng thể cao trong huyết thanh được chọn và ARN tổng số của mô được chiết xuất bằng cách sử dụng Trizol (Invitrogen Cat No. 15596-018). ADN bổ sung thu được bằng cách sử dụng PrimeScript™ II 1st Strand ADN bổ sung Synthesis Kit (Takara Cat No. 6210A) để phiên mã ngược. Các môi xây dựng thư viện được thiết kế và tổng hợp theo cơ sở dữ liệu IMGT. Các đoạn kháng thể chuỗi đơn thu được thông qua ba vòng phản ứng PCR. Các đoạn kháng thể chuỗi đơn và vector xây dựng thư viện được cải biến pCantab5E (Amersham Biosciences/GE Cat No. 27-9400-01) được tiêu hóa bằng SfiI (NEB Cat No. # R0123L), được tinh chế và phục hồi bằng E. Z. N. A.® Gel Extraction Kit (Omega Cat No. D2500-02) sau khi điện di. Sau đó T4 DNA ligaza (NEB Cat No. #M0202L) được sử dụng để thất ở 16°C trong 16-18 giờ, và bộ kit trên được sử dụng để tinh chế và phục hồi, và cuối cùng quá trình rửa giải được thực hiện bằng nước khử ion. 1 μ g sản phẩm thất được lấy và trộn với 1 lọ TG1 có hiệu lực (Lucigen Cat số 60502-2) để biến đổi electro, và quá trình biến đổi electro được thực hiện với máy điện cực (Bio Rad Micropulser), với các thông số được đặt ở 2,5kV, 200 Ω và 25 μ F. Sự biến đổi được lặp lại trong 10 lần. Sản phẩm được trải trên các đĩa và nuôi cấy từ dưới lên ở 37°C trong 16-18 giờ. Sau đó, tất cả các khuẩn lạc được tách ra và trộn

với nhau, được bổ sung với glycerin ở nồng độ cuối cùng là 15%, và được bảo quản ở -80°C để sử dụng.

2. Sàng lọc thư viện miễn dịch của chuột nhắt thực khuẩn thể PD-1 kháng người: thư viện miễn dịch thực khuẩn thể PD-1 kháng người được đóng gói (1×10^{12} - 1×10^{13}) và 100µl vi khuẩn streptomycin (Milenvi Biotec, Auburn, CA) được bổ sung vào 1ml dung dịch muối đệm phosphat có chứa 2% sữa gầy (MPBS) và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, đặt trên giá đỡ từ tính, và dịch nổi phía trên được thu thập. 10µg/mL protein người được đánh dấu sinh học PD-1-ECD-his (mua từ Sino Biological) được bổ sung vào dịch nổi phía trên và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, 100µl hạt từ phủ streptavidin (đã ủ sơ bộ với 1ml MPBS) được bổ sung vào và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Và nó được đưa lên hệ thống giá đỡ từ tính để phân loại, và dịch nổi phía trên được hút ra. 1ml PBST (đệm phosphat chứa 0,1% Tween-20) được bổ sung vào và đảo qua nhiều lần. Dung dịch rửa mới được bổ sung vào sau khi hút hoàn toàn, lặp lại 11 lần để loại bỏ các mảnh kháng thể không liên kết, và thêm 0,5ml dung dịch rửa giải (50 µl 10 mg/mL dung dịch gốc trypsin được bổ sung vào 450µl PBS). Nó được lắc trong 15 phút ở nhiệt độ phòng, đặt trên một giá đỡ từ tính, và dịch nổi phía trên được hút vào một ống EP mới. TG1 được cấy giống vào môi trường 2YT và mở rộng cho đến khi mật độ vi khuẩn nuôi cấy OD600 = 0,4. 1,75ml TG1 (OD600 = 0,4) được bổ sung vào mỗi ống, và 250µl thực khuẩn (phage) đã được rửa giải được bổ sung vào, ủ trong nồi cách thủy 37°C trong 30 phút, và trải trên đĩa có pha loãng gradien để kiểm tra hiệu giá. Dung dịch TG1 còn lại được ly tâm, trải trên đĩa và ủ qua đêm ở 37°C

Thư viện miễn dịch của thực khuẩn thể chuột nhắt được sàng lọc 2-3 vòng bằng cách sử dụng kháng nguyên PD-1-ECD-của người được đánh dấu sinh học, với sàng lọc MACS (hạt từ tính streptomycin, Invitrogen), và các kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với PD-1 và có khả năng ngăn chặn sự liên kết của PD-1 với PD-L1 cuối cùng đã được thu thập và xác minh bằng cách giải trình tự. Thu được trình tự vùng biến đổi của các kháng thể.

Tinh chế protein/kháng thể kháng nguyên tái tổ hợp

1. Tách và tinh chế dịch nổi hybridoma/Sắc ký ái lực protein G:

Để tinh chế dịch nổi phía trên của hybridoma của chuột nhắt, Protein G đối với sắc ký ái lực là lựa chọn đầu tiên. Khối hybridoma đã được nuôi cấy được ly tâm để thu dịch

nổi phía trên, và 10-15% thể tích Tris-HCl 1M (pH 8,0-8,5) được bổ sung vào tùy theo thể tích của dịch nổi phía trên để điều chỉnh độ pH của dịch nổi phía trên. Đối với cột Protein G, guanidin hydroclorua 6M được sử dụng để rửa 3-5 lần thể tích cột, và sau đó nước tinh khiết được sử dụng để rửa 3-5 lần thể tích cột; hệ thống đệm như $1 \times$ PBS (pH 7,4) làm đệm cân bằng được sử dụng để cân bằng cột cho 3-5 lần thể tích cột; Dịch nổi phía trên tế bào được nạp và gắn kết bằng cách sử dụng tốc độ dòng chảy thấp, tốc độ này được kiểm soát sao cho thời gian lưu khoảng 1 phút hoặc lâu hơn; $1 \times$ PBS (pH 7,4) được sử dụng để rửa cột sắc ký 3-5 lần thể tích cột cho đến khi độ hấp thụ UV giảm xuống mức cơ bản: dung dịch đệm 0,1M axit axetic/natri axetat (pH 3,0) được sử dụng để rửa giải mẫu, các đỉnh rửa giải được thu thập bằng cách phát hiện tia cực tím, và Tris-HCl 1M (pH 8,0) được sử dụng để nhanh chóng điều chỉnh pH của sản phẩm rửa giải đến 5-6 để lưu trữ tạm thời. Đối với sản phẩm rửa giải, việc thay thế dung dịch có thể được thực hiện bằng các phương pháp được những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ, chẳng hạn như sử dụng ống siêu lọc để siêu lọc và cô đặc và thay thế dung dịch vào hệ thống đệm cần thiết hoặc sử dụng loại trừ phân tử như G-25 để khử muối và thay thế vào hệ thống đệm cần thiết, hoặc sử dụng cột loại trừ phân tử có độ phân giải cao như Superdex 200 để loại bỏ các thành phần tập hợp trong sản phẩm rửa giải nhằm cải thiện độ tinh khiết của mẫu.

2. Tinh chế sắc ký ái lực protein A cho protein hoặc kháng thể:

Đầu tiên, dịch nổi phía trên của môi trường nuôi cấy tế bào biểu hiện protein kháng nguyên hoặc kháng thể được ly tâm ở tốc độ cao để thu lấy dịch nổi phía trên. Đối với cột có ái lực Protein A, guanidin hydroclorua 6M được sử dụng để rửa 3-5 lần thể tích cột, và sau đó nước tinh khiết được sử dụng để rửa 3-5 lần thể tích cột. Một hệ đệm như $1 \times$ PBS (pH 7,4) được sử dụng làm đệm cân bằng để cân bằng cột sắc ký cho 3-5 lần thể tích cột. Dịch nổi phía trên tế bào được nạp và gắn kết bằng cách sử dụng tốc độ dòng chảy thấp, tốc độ này được kiểm soát sao cho thời gian lưu khoảng 1 phút hoặc lâu hơn. Sau khi hoàn thành liên kết, $1 \times$ PBS (pH 7,4) được sử dụng để rửa cột sắc ký 3-5 lần thể tích cột cho đến khi độ hấp thụ UV giảm xuống mức cơ bản. Dung dịch đệm axit axetic/natri axetat 0,1M (pH 3,0-3,5) được sử dụng để rửa giải mẫu, các đỉnh rửa giải được thu thập theo phát hiện tia cực tím và Tris-HCl 1M (pH 8,0) được sử dụng để nhanh chóng điều chỉnh độ pH của dung dịch rửa giải sản phẩm để 5-6 để lưu trữ tạm thời. Đối với sản phẩm rửa giải, việc thay thế dung dịch có thể được thực hiện bằng các phương

pháp được những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, chẳng hạn như sử dụng ống siêu lọc để siêu lọc và cô đặc và thay thế dung dịch vào hệ thống đệm cần thiết hoặc sử dụng loại trừ phân tử như G-25 để khử muối và thay thế vào hệ thống đệm cần thiết, hoặc sử dụng cột loại trừ phân tử có độ phân giải cao như Superdex 200 để loại bỏ các thành phần tập hợp trong sản phẩm rửa giải nhằm cải thiện độ tinh khiết của mẫu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này. Các phương pháp thử nghiệm để thử nghiệm các điều kiện cụ thể không được thể hiện cụ thể theo sáng chế thường được thực hiện trong các điều kiện thông thường, như *Antibodies: A Laboratory Manual and Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor hoặc theo các điều kiện được khuyến cáo bởi các nhà sản xuất vật liệu thô và sản phẩm. Các chất phản ứng làm nguồn mà không được thể hiện theo sáng chế là các chất phản ứng có bán trên thị trường.

Ví dụ 1. Sản xuất kháng thể của chuột nhắt kháng PD-1 của người

Các kháng thể của chuột nhắt kháng PD-1 của người thu được bằng phương pháp nói trên được đưa vào thử nghiệm gắn kết kháng nguyên và được sàng lọc để thu được nhiều chủng kháng thể có hoạt tính tốt: trong đó M23, M32 và M33 được đưa vào. Các dòng đơn tế bào được mở rộng và nuôi cấy, RNA được chiết, và các đoạn mRNA của Ig chuột nhắt được sử dụng để thực hiện khuếch đại phiên mã ngược (RT-PCR) để thu được trình tự vùng biến đổi của kháng thể. Trình tự vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhắt được gắn kết với trình tự vùng không đổi kháng thể của người. Kháng thể thể khảm của kháng thể đơn dòng của chuột nhắt được nhân bản và biểu hiện tái tổ hợp, và các thử nghiệm hoạt tính trong ống nghiệm đã được thực hiện để xác nhận rằng trình tự vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng thu được là chính xác.

Trình tự vùng biến đổi của các kháng thể của chuột nhắt M23, M32 và M33 được xác định như sau:

Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể của chuột nhắt M23 (SEQ ID NO.4):

QVQLQQSGAELVRPGASVTLCKASGYTFTDYEMHWVKQTPHGLEWIG
LIDPETGGTVYNQKFKDKTILTADKSSSTAYMEFRSLTSEDSAVYHCTRERFSYY
GSTSDWYFDVWGTGTTVTVSS.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhất M23 (SEQ ID NO.5):

DGLMTQTPLSLPVSLGDHASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK
LLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPYTFGGG
TKLEIK.

Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể của chuột nhất M32 (SEQ ID NO.6):

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASDFTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGL
FDPETGGIVYNQKFKGKAILTADKSSNTAYMEFRSLTSEDSAVYYCTREGYNRD
WYFDVWGTGTTVTVSS.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhất M32 (SEQ ID NO.7):

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPYAFGGGT
KLEIK.

Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể của chuột nhất M33 (SEQ ID NO.19):

KVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVA
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRADNKNLTLYLQMSSLRSEDALYYCASPYGHG
YFDVWGTGTTVTVSS.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhất M33 (SEQ ID NO.20):

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNFLNWFYQQKPDGTVKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIK.

Lưu ý: trong các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể nêu trên, gạch dưới là các trình tự CDR được xác định bởi hệ thống đánh số thứ tự Kabat, theo thứ tự như sau: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Bảng 4. trình tự vùng CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhất M23, M32 và M33

Tên kháng thể	Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
M23	HCDR1	DYEMH (SEQ ID NO.8)	LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLE (SEQ ID NO.11)
	HCDR2	LIDPETGGTVYNQKFKD (SEQ ID NO.9)	LCDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO.12)
	HCDR3	ERFSYYGSTSDWYFDV (SEQ ID NO.10)	LCDR3	FQGSHVPYT (SEQ ID NO.13)

M32	HCDR1	DYEIH (SEQ ID NO.14)	LCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE (SEQ ID NO.17)
	HCDR2	LFDPETGGIVYNQKFKG (SEQ ID NO.15)	LCDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO.12)
	HCDR3	EGYNRDWYFDV (SEQ ID NO.16)	LCDR3	FQGSHPVYA (SEQ ID NO.18)
M33	HCDR1	SYAMS (SEQ ID NO.21)	LCDR1	RASQDINNFLN (SEQ ID NO.24)
	HCDR2	TISGGGVDTYYQDNVQG (SEQ ID NO.22)	LCDR2	YTSSLHS (SEQ ID NO.25)
	HCDR3	PYGHGYFDV (SEQ ID NO.23)	LCDR3	QQGNTLPWT (SEQ ID NO.26)

Lưu ý: trình tự của kháng thể CDR trong Bảng được xác định theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat.

Ví dụ 2. Nhân tạo hóa kháng thể đơn dòng kháng PD-1 của người

Bằng cách căn chỉnh dựa trên cơ sở dữ liệu gen mầm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể IMGT và phân tích phần mềm MOE, các gen mầm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có độ đồng nhất cao với trình tự chuỗi nhẹ và nặng M23, M32 và M33 đã được chọn làm mẫu. CDR của 3 kháng thể của chuột nhất này được ghép vào các mẫu kháng thể tương ứng của người để tạo ra các kháng thể được nhân tạo hóa tương ứng của chúng.

1. Nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhất M23

1.1 Lựa chọn vùng khung nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M23

Các mẫu chuỗi nhẹ nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M23 là IGKV2-40*01 và IGKJ4*01, và các mẫu chuỗi nặng nhân tạo hóa là IGHV1-69*02 và IGHJ6*01. Trình tự của các vùng biến đổi sau khi nhân tạo hóa như sau (được gạch dưới là trình tự CDR):

Hu23VH-CDR được ghép: (SEQ ID NO.27)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWM
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERFSY
YGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS.

Hu23VL-CDR được ghép: (SEQ ID NO.28)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK.

1.2 Lựa chọn mẫu nhân bản và thiết kế đột biến ngược của kháng thể của chuột nhất M23

Bảng 5. Các đột biến ngược của kháng thể của chuột nhất M23 kháng thể nhân tạo hóa

VL		VH	
Hu23VL1	Được ghép	Hu23VH1	Được ghép
Hu23VL2	I2G	Hu23VH2	G27Y I69L
		Hu23VH3	G27Y M48I V67T I69L L82F
		Hu23VH4	G27Y M48I V67T I69L L82F A93T

Lưu ý: ghép có nghĩa là các CDR của kháng thể của chuột nhất được cấy vào trình tự vùng FR của dòng mầm của người. Các gốc axit amin được xác định và chú thích bởi hệ thống đánh số thứ tự Kabat, ví dụ I2G có nghĩa là I ở vị trí 2 của hệ thống đánh số thứ tự Kabat bị đột biến ngược G theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của các kháng thể được nhân tạo hóa M23 như sau:

> Hu23VL1 (tương tự như Hu23VL-CDR được ghép): (SEQ ID NO.28)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK.

> Hu23VL2 (SEQ ID NO.29)

DGVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK.

> Hu23VH1 (tương tự như Hu23VH-CDR được ghép): (SEQ ID NO.27)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSYEMHWVRQAPGQGLEWM
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERFSY
YGSTSDWYFDVWGQGTITVTVSS.

> Hu23VH2 (SEQ ID NO.30)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWM
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERFS
YVGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS.

> Hu23VH3 (SEQ ID NO.31)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWI
GLIDPETGGTVYNQKFKDRTTLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCARERFSY
YVGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS.

> Hu23VH4 (SEQ ID NO.32)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWI
GLIDPETGGTVYNQKFKDRTTLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTRERFSY
YVGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSS.

1.3 Sự kết hợp trình tự nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M23

Các kháng thể và sự kết hợp vùng thay đổi của chúng thu được bằng cách nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhất M23 được thể hiện trong Bảng dưới đây.

Bảng 6. Sự kết hợp của các vùng biến đổi kháng thể Hu23 được nhân tạo hóa

VH \ VL	Hu23VL1	Hu23VL2
Hu23VH1	Hu23-1	Hu23-5
Hu23VH2	Hu23-2	Hu23-6
Hu23VH3	Hu23-3	Hu23-7
Hu23VH4	Hu23-4	Hu23-8

Lưu ý: “Hu23-1” sử dụng để chỉ kháng thể trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ là Hu23VL1 và vùng biến đổi chuỗi nặng là Hu23VH1, v.v.

Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu23-1) được đề cập trong Bảng trên có thể được liên kết với các vùng không đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể để tạo thành các kháng thể có chiều dài đầy đủ, tương ứng; trừ khi có quy định khác trong sáng chế, khi tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng không đổi chuỗi Kappa được thể hiện trong SEQ ID NO.73 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nặng là liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P được thể hiện trong ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nặng của

kháng thể và tên trong Bảng là để chỉ sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu23-1) cộng với hậu tố “.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được tạo thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA, cộng với hậu tố “.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P, ví dụ, “Hu23-1.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu23VH1 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như được thể hiện trong SEQ ID NO.72, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23VL1 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73. “Hu23-1.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết Hu23VH1 vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P như được thể hiện trong SEQ ID NO.79 và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23VL1 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

2. Nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhất M32

2.1 Lựa chọn vùng khung nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M32

Các mẫu chuỗi nhẹ nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M32 là IGKV2-40*01 và IGKJ4*01, và các mẫu chuỗi nặng nhân tạo hóa là IGHV1-69*02 và IGHJ6*01. Trình tự của các vùng biến đổi được nhân tạo hóa như sau (được gạch dưới là trình tự CDR):

Hu32VH-CDR được ghép: (SEQ ID NO.33) IGHV1-69*02 và IGHJ6*01

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYEIHWRQAPGQGLEWM
GLFDPETGGIVYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGYN
RDWYFDVWGQGTTVTVSS.

Hu32VL-CDR được ghép: (SEQ ID NO.34)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYAFGGGT
KVEIK.

2.2 Lựa chọn mẫu nhân bản và thiết kế đột biến ngược của kháng thể của chuột nhất M32

Bảng 7. Các đột biến ngược của kháng thể được nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhất M32

VL		VH	
Hu32VL1	Được ghép	Hu32VH1	Được ghép
Hu32VL2	I2V	Hu32VH2	G27F, I69L, A93T
		Hu32VH3	G26D, G27F, I69L, A93T
		Hu32VH4	G27F, M48I, V67A, I69L, L82F, A93T
		Hu32VH5	G26D, G27F, S30T, M48I, V67A, I69L, L82F, A93T
		Hu32VH6	G26D, G27F, S30T, R38K, Q43H, M48I, R66K, V67A, I69L, L82F, A93T

Lưu ý: ghép có nghĩa là các CDR của kháng thể của chuột nhất được cấy vào trình tự vùng FR của dòng mầm của người. Các gốc axit amin được xác định và chú thích bởi hệ thống đánh số thứ tự Kabat, ví dụ I2V có nghĩa là I ở vị trí 2 của hệ thống đánh số thứ tự Kabat bị đột biến ngược V theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể được nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M32 là như sau:

> Hu32VL1 (tương tự như Hu32VL-CDR được ghép): (SEQ ID NO.34)

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPIYAFGGGT
KVEIK.

> Hu32VL2 (SEQ ID NO.35)

DVVMQTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPIYAFGGG
TKVEIK.

> Hu32VH1 (tương tự như Hu23VH-CDR được ghép): (SEQ ID NO.33)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSQDYEIHWVRQAPGQGLEWM
GLFDPETGGIVYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGYN
RDWYFDVWGQGTTVTVSS.

> Hu32VH2 (SEQ ID NO.36)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG
LFDPETGGIVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGYNR
DWYFDVWGQGTTTVTVSS.

> Hu32VH3 (SEQ ID NO.37)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASDFTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG
LFDPETGGIVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGYNR
DWYFDVWGQGTTTVTVSS.

> Hu32VH4 (SEQ ID NO.38)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWIGL
FDPETGGIVYNQKFKGRATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTREGYNRD
WYFDVWGQGTTTVTVSS.

> Hu32VH5 (SEQ ID NO.39)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASDFTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIGL
FDPETGGIVYNQKFKGRATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTREGYNRD
WYFDVWGQGTTTVTVSS.

> Hu32VH6 (SEQ ID NO.40)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASDFTFTDYEIHWVKQAPGHGLEWIG
LFDPETGGIVYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTREGYNR
DWYFDVWGQGTTTVTVSS.

2.3 Sự kết hợp trình tự được nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhắt M32

Các kháng thể và sự kết hợp vùng thay đổi của chúng thu được bằng cách nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhắt M32.

Bảng 8. Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể được nhân tạo hóa Hu32

VH \ VL	VL	
	Hu32VL1	Hu32VL2
Hu32VH1	Hu32-1	Hu32-7
Hu32VH2	Hu32-2	Hu32-8
Hu32VH3	Hu32-3	Hu32-9
Hu32VH4	Hu32-4	Hu32-10

Hu32VH5	Hu32-5	Hu32-11
Hu32VH6	Hu32-6	Hu32-12

Lưu ý: trong Bảng, ví dụ, “Hu32-1” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể của Hu32VL1 và vùng biến đổi chuỗi nặng của Hu32VH1, v.v.

Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu32-1) được đề cập trong Bảng trên có thể được liên kết với các vùng không đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể để tạo thành các kháng thể có chiều dài đầy đủ, tương ứng; trừ khi có quy định khác trong sáng chế, khi tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng không đổi chuỗi Kappa được thể hiện trong SEQ ID NO.73 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nặng là liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P được thể hiện trong ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể và tên trong Bảng là để chỉ sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu32-1) cộng với hậu tố “.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA, cộng với hậu tố “.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P, ví dụ, “Hu32-1.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu32VH1 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như được thể hiện trong SEQ ID NO.72, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu32VL1 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73. “Hu32-1.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết Hu32VH1 vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P như được thể hiện trong SEQ ID NO.79 và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu32VL1 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

3. Nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhất M33

3.1 Lựa chọn vùng khung nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M33

Các mẫu chuỗi nhẹ nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M33 là IGKV1-39*01 và IGKJ4*01, và các mẫu chuỗi nặng nhân tạo hóa là IGHV3-7 và IGHJ6*01. Trình tự của các vùng biến được nhân tạo hóa như sau (được gạch dưới là trình tự CDR):

Hu33VH-CDR được ghép (SEQ ID NO.41):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYGH
GYFDVWGQGTTVTSS.

Hu33VL-CDR được ghép (SEQ ID NO.42):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWWYQQKPGKAPKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK.

3.2 Lựa chọn mẫu nhân bản và thiết kế đột biến ngược của kháng thể của chuột nhất M33

Bảng 9. Các đột biến ngược của kháng thể nhân tạo hóa kháng thể của chuột nhất M33

VL		VH	
Hu33VL1	Được ghép	Hu33VH1	Được ghép
Hu33VL2	F71Y	Hu33VH2	R94S
Hu33VL3	K42G P44V F71Y	Hu33VH3	E1K R94S

Lưu ý: ghép có nghĩa là các CDR của kháng thể của chuột nhất được cấy vào trình tự vùng FR của dòng mầm của người. Các gốc axit amin được xác định và chú thích bởi hệ thống đánh số thứ tự Kabat, ví dụ F71Y có nghĩa là F ở vị trí 71 của hệ thống đánh số thứ tự Kabat bị đột biến ngược Y theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể được nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M33 như sau:

> Hu33VL1 (tương tự như Hu33VL-CDR được ghép): (SEQ ID NO.42)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWWYQQKPGKAPKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK.

> Hu33VL2 (SEQ ID NO.43)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWWYQQKPGKAPKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEI.

> Hu33VL3 (SEQ ID NO.44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWYQQKPGGAVKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEI.

> Hu33VH1 (tương tự như Hu33VH-CDR được ghép): (SEQ ID NO.41)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRADNKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPYGH
GYFDVWGQGTTVTVSS.

> Hu33VH2 (SEQ ID NO.45)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRADNKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYGH
GYFDVWGQGTTVTVSS.

> Hu33VH3 (SEQ ID NO.46)

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA
TISGGGVDTYYQDNVQGRFTISRADNKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYGH
GYFDVWGQGTTVTVSS.

3.3 Sự kết hợp trình tự được nhân tạo hóa của kháng thể của chuột nhất M33

Bảng 10. Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được nhân tạo hóa

VL VH	Hu33VL1	Hu33VL2	Hu33VL3
Hu33VH1	Hu33-1	Hu33-4	Hu33-7
Hu33VH2	Hu33-2	Hu33-5	Hu33-8
Hu33VH3	Hu33-3	Hu33-6	Hu33-9

Lưu ý: trong Bảng, ví dụ, “Hu33-6” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể là Hu33VL2 và vùng biến đổi chuỗi nặng của Hu33VH3, v.v.

Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu33-6) được đề cập trong Bảng trên có thể được liên kết với các vùng không đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể để tạo thành các kháng thể có chiều dài đầy đủ, tương ứng; trừ khi có quy định khác trong sáng chế, khi tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng không đổi chuỗi Kappa được thể hiện trong SEQ ID

NO.73 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nặng là liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P được thể hiện trong ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể và tên trong Bảng là để chỉ sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu33-6) cộng với hậu tố “.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA, cộng với hậu tố “.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P, ví dụ, “Hu32-6.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu33VH3 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như được thể hiện trong SEQ ID NO.72, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu33VL2 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được trình bày trong SEQ ID NO : 73. “Hu33-6.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu33VH3 và vùng hằng số chuỗi nặng IgG4-P như được trình bày trong SEQ ID NO.79, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu33VL2 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

4. Các đột biến của các kháng thể được nhân tạo hóa

4.1 Kháng thể đột biến của kháng thể nhân tạo hóa Hu23

Thông qua mô phỏng trên máy tính, các axit amin tại các vị trí cụ thể của chuỗi nhẹ LCDR1 (SEQ ID NO.11) của kháng thể nhân tạo hóa Hu23 bị đột biến hướng vào vị trí, và các đột biến cụ thể được thể hiện trong Bảng 11:

Bảng 11. Trình tự đột biến của chuỗi nhẹ Hu23 LCDR1

Tên	Trình tự (SEQ ID NO)
Hu23LCDR1(N28Q)	RSSQSLVHSQGNTYLE (SEQ ID NO.47)
Hu23LCDR1(N28L)	RSSQSLVHSLGNTYLE (SEQ ID NO.48)
Hu23LCDR1(N28T)	RSSQSLVHSTGNTYLE (SEQ ID NO.49)
Hu23LCDR1(N28D)	RSSQSLVHSDGNTYLE (SEQ ID NO.50)
Hu23LCDR1(G29A)	RSSQSLVHSNANTYLE (SEQ ID NO.51)
Hu23LCDR1(G29V)	RSSQSLVHSNVNTYLE (SEQ ID NO.52)

Lưu ý: Hu23LCDR1 (N28Q) có nghĩa là trình tự đột biến LCDR1 trong đó N ở vị trí 28 theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể nhân tạo

hóa Hu23 Hu23VL1 hoặc Hu23VL2 bị đột biến thành Q, Hu23LCDR1 (G29A) có nghĩa là trình tự đột biến LCDR1 trong đó G ở vị trí 29 theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể nhân tạo hóa Hu23 Hu23VL1 hoặc Hu23VL2 bị đột biến thành A (CDR được xác định bởi hệ thống đánh số thứ tự Kabat).

Trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân tạo hóa Hu23 sau đột biến LCDR1 như sau:

> Hu23VL1(N28Q) trình tự là:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSQGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.53)

> Hu23VL1(N28L) trình tự là:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSLGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT
KVEIK (SEQ ID NO.54)

> Hu23VL1(N28T) trình tự là:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT
KVEIK (SEQ ID NO.55)

> Hu23VL1(N28D) trình tự là:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.56)

> Hu23VL1(G29A) trình tự là:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.57)

> Hu23VL1(G29V) trình tự là:

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.58)

> Hu23VL2(N28Q) trình tự là:

DGVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSQGNNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.59)

> Hu23VL2(N28L) trình tự là:

DGVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSLGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.60)

> Hu23VL2(N28T) trình tự là:

DGVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.61)

> Hu23VL2(N28D) trình tự là:

DGVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.62)

> Hu23VL2(G29A) trình tự là:

DGVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNANTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.63)

> Hu23VL2(G29V) trình tự là:

DGVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNVNTYLEWYLQKPGQSPQL
LIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKVEIK (SEQ ID NO.64)

Bảng 12. Sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được nhân tạo hóa Hu23

VL \ VH	Hu23VH1	Hu23VH2	Hu23VH3	Hu23VH4
Hu23VL1(N28Q)	Hu23-9	Hu23-21	Hu23-33	Hu23-45
Hu23VL1(N28L)	Hu23-10	Hu23-22	Hu23-34	Hu23-46
Hu23VL1(N28T)	Hu23-11	Hu23-23	Hu23-35	Hu23-47
Hu23VL1(N28D)	Hu23-12	Hu23-24	Hu23-36	Hu23-48
Hu23VL1(G29A)	Hu23-13	Hu23-25	Hu23-37	Hu23-49
Hu23VL1(G29V)	Hu23-14	Hu23-26	Hu23-38	Hu23-50
Hu23VL2(N28Q)	Hu23-15	Hu23-27	Hu23-39	Hu23-51
Hu23VL2(N28L)	Hu23-16	Hu23-28	Hu23-40	Hu23-52
Hu23VL2(N28T)	Hu23-17	Hu23-29	Hu23-41	Hu23-53
Hu23VL2(N28D)	Hu23-18	Hu23-30	Hu23-42	Hu23-54
Hu23VL2(G29A)	Hu23-19	Hu23-31	Hu23-43	Hu23-55
Hu23VL2(G29V)	Hu23-20	Hu23-32	Hu23-44	Hu23-56

Lưu ý: trong Bảng ví dụ, “Hu23-11” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể Hu23VL1 (N28T) và vùng biến đổi chuỗi nặng của Hu23VH1, v.v.

Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu23-11) được đề cập trong Bảng trên có thể được liên kết với các vùng không đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể để tạo thành các kháng thể có chiều dài đầy đủ, tương ứng; trừ khi có quy định khác trong sáng chế, khi tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng không đổi chuỗi Kappa được thể hiện trong SEQ ID NO.73 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nặng là liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P được thể hiện trong ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể và tên trong Bảng là để chỉ sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu23-11) cộng với hậu tố “.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA, cộng với hậu tố “.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P, ví dụ, “Hu23-11.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu23VH1 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như được thể hiện trong SEQ ID NO.72 và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23VL1 (N28T) và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73. “Hu23-11.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu23VH1 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P

như được thể hiện trong SEQ ID NO.79, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23VL1 (N28T) và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

Kết quả thử nghiệm cho thấy sau khi đột biến vị trí, các kháng thể nhân tạo hóa Hu23LCDR1 (N28Q), Hu23LCDR1 (N28L), Hu23LCDR1 (N28T), Hu23LCDR1 (N28D), Hu23LCDR1 (G29A) và Hu23LCDR1 (G29V) đều duy trì khả năng gắn kết với PD- 1 (Bảng 16).

4.2 Kháng thể đột biến của kháng thể nhân tạo hóa Hu32

Loạt kháng thể nhân tạo hóa Hu23 có nguồn gốc từ M23 và loạt kháng thể nhân tạo hóa Hu32 có nguồn gốc từ M32 có nhận dạng trình tự cao bằng phân tích trình tự. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23 và vùng biến đổi chuỗi nặng Hu32 được kết hợp thành các tổ hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mới. Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng các kháng thể được nhân tạo hóa bao gồm các tổ hợp vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mới duy trì khả năng gắn kết với kháng nguyên PD-1 (Bảng 16).

Bảng 13. Công thức chung của trình tự đồng thuận vùng biến đổi kháng thể Hu32 và Hu23

Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
HCDR1	DYEX ₁ H, trong đó X ₁ được chọn từ I hoặc M; (SEQ ID NO.65)	LCDR1	RSSQSX ₁₃ VHSX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ TY LE, trong đó, X ₁₃ được chọn từ I hoặc L, X ₁₄ được chọn từ N, Q, L, T hoặc D, X ₁₅ được chọn từ G, A hoặc V, và X ₁₆ được chọn từ N hoặc K; (SEQ ID NO.68)
HCDR2	LX ₂ DPETGGX ₃ VYNQKFKX ₄ , trong đó X ₂ được chọn từ F hoặc I, X ₃ được chọn từ I/T và trong đó X ₄ được chọn từ G hoặc D; (SEQ ID NO.66)	LCDR2	<u>KVSNRFS</u> ; (SEQ ID NO.12)
HCDR3	EX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ YX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ DWYFDV, trong đó X ₅ được chọn từ G hoặc R, X ₆ là F hoặc vắng mặt, X ₇ là S hoặc vắng mặt, X ₈ là Y hoặc vắng mặt, X ₉ là G hoặc vắng mặt, X ₁₀ là S hoặc vắng mặt, X ₁₁ được chọn từ N hoặc T và X ₁₂ được chọn từ R hoặc S; (SEQ ID NO.67)	LCDR3	FQGSHPYX ₁₇ , trong đó X ₁₇ được chọn từ A hoặc T; (SEQ ID NO.69)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASX ₁₈ X ₁₉ TFX ₂₀ DYEX ₁ HWVX ₂₁ QAP GX ₂₂ GLEWX ₂₃ GLX ₂ DPETGGX ₃ VY NQKFKX ₄ X ₂₄ X ₂₅ TX ₂₆ TADKSTSTAY MEX ₂₇ SSLRSEDVAVYYCX ₂₈ REX ₅ X	VL	DX ₂₉ VMTQTPLSLPVTPGE PASISCRSSQSX ₁₃ VHSX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ TYLEWYLOKPGQSP QLLIYKVSNRFSGVDPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAE

6 X ₇ X ₈ YX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ DWYFDVWGQG TTVTVSS, trong đó, X ₁ được chọn từ I hoặc M, X ₂ được chọn từ F hoặc I, X ₃ được chọn từ I/T, X ₄ được chọn từ G hoặc D, X ₅ được chọn từ G hoặc R, X ₆ là F hoặc vắng mặt, X ₇ là S hoặc vắng mặt, X ₈ là Y hoặc vắng mặt, X ₉ là G hoặc vắng mặt, X ₁₀ là S hoặc vắng mặt, X ₁₁ được chọn từ N hoặc T, X ₁₂ được chọn từ R hoặc S, X ₁₈ được chọn từ G hoặc D, X ₁₉ được chọn từ G, F hoặc Y, X ₂₀ được chọn từ S hoặc T, X ₂₁ được chọn từ R hoặc K, X ₂₂ được chọn từ Q hoặc H, X ₂₃ được chọn từ M hoặc I, X ₂₄ được chọn từ R hoặc K, X ₂₅ được chọn từ V, A hoặc T, X ₂₆ được chọn từ R hoặc K, X ₂₇ được chọn từ L hoặc F và X ₂₈ được chọn từ A hoặc T (SEQ ID NO.70)	DVG VYYCFQGSHPYX ₁₇ FGGGTKVEIK, trong đó, X ₁₃ được chọn từ I hoặc L, X ₁₄ được chọn từ N, Q, L, T hoặc D, X ₁₅ được chọn từ G, A hoặc V, X ₁₆ được chọn từ N hoặc K, X ₁₇ được chọn từ A hoặc T và X ₂₉ được chọn từ I, V hoặc G. (SEQ ID NO.71)
---	---

Bảng 14. Sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng Hu32 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23

VL \ VH	Hu32VH1	Hu32VH2	Hu32VH3	Hu32VH4	Hu32VH5	Hu32VH6
Hu23VL1(N28Q)	Hu32a-13	Hu32a-27	Hu32a-41	Hu32a-55	Hu32a-69	Hu32a-83
Hu23VL1(N28L)	Hu32a-14	Hu32a-28	Hu32a-42	Hu32a-56	Hu32a-70	Hu32a-84
Hu23VL1(N28T)	Hu32a-15	Hu32a-29	Hu32a-43	Hu32a-57	Hu32a-71	Hu32a-85
Hu23VL1(N28D)	Hu32a-16	Hu32a-30	Hu32a-44	Hu32a-58	Hu32a-72	Hu32a-86
Hu23VL1(G29A)	Hu32a-17	Hu32a-31	Hu32a-45	Hu32a-59	Hu32a-73	Hu32a-87
Hu23VL1(G29V)	Hu32a-18	Hu32a-32	Hu32a-46	Hu32a-60	Hu32a-74	Hu32a-88
Hu23VL2(N28Q)	Hu32a-19	Hu32a-33	Hu32a-47	Hu32a-61	Hu32a-75	Hu32a-89
Hu23VL2(N28L)	Hu32a-20	Hu32a-34	Hu32a-48	Hu32a-62	Hu32a-76	Hu32a-90
Hu23VL2(N28T)	Hu32a-21	Hu32a-35	Hu32a-49	Hu32a-63	Hu32a-77	Hu32a-91
Hu23VL2(N28D)	Hu32a-22	Hu32a-36	Hu32a-50	Hu32a-64	Hu32a-78	Hu32a-92
Hu23VL2(G29A)	Hu32a-23	Hu32a-37	Hu32a-51	Hu32a-65	Hu32a-79	Hu32a-93
Hu23VL2(G29V)	Hu32a-24	Hu32a-38	Hu32a-52	Hu32a-66	Hu32a-80	Hu32a-94
Hu23VL1	Hu32a-25	Hu32a-39	Hu32a-53	Hu32a-67	Hu32a-81	Hu32a-95
Hu23VL2	Hu32a-26	Hu32a-40	Hu32a-54	Hu32a-68	Hu32a-82	Hu32a-96

Lưu ý: trong Bảng, ví dụ, “Hu32a-85” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể là Hu23VL1 (N28T) và vùng biến đổi chuỗi nặng của Hu32VH6, v.v.

Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu32a-85) được đề cập trong Bảng trên có thể được liên kết với các vùng không đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể để tạo thành các kháng thể có chiều dài đầy đủ, tương ứng; trừ khi có quy định khác trong sáng chế, khi tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng không đổi chuỗi Kappa được thể hiện trong SEQ ID

NO.73 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nặng là liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P được thể hiện trong ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể và tên trong Bảng là để chỉ sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu32a-85) cộng với hậu tố “.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được tạo thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA, cộng với hậu tố “.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P, ví dụ, “Hu32a-85.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu32VH6 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như được thể hiện trong SEQ ID NO.72, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23VL1 (N28T) và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73. “Hu32a-85.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu32VH6 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P như được thể hiện trong SEQ ID NO.79, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu23VL1 (N28T) và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

Bảng 15. Sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng Hu23 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu32

VH \ VL	Hu23VH1	Hu23VH2	Hu23VH3
Hu32VL1	Hu23a-57	Hu23a-59	Hu23a-61
Hu32VL2	Hu23a-58	Hu23a-60	Hu23a-62

Lưu ý: trong Bảng ví dụ, “Hu23a-57” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể có sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể Hu32VL1 và vùng biến đổi chuỗi nặng của Hu23VH1, v.v.

Sự kết hợp của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu23a-57) được đề cập trong Bảng trên có thể được liên kết với các vùng không đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể để tạo thành các kháng thể có chiều dài đầy đủ, tương ứng; trừ khi có quy định khác trong sáng chế, khi tạo thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với vùng không đổi chuỗi Kappa được thể hiện trong SEQ ID NO.73 để tạo thành chuỗi nhẹ của kháng thể, và vùng biến đổi chuỗi nặng là liên kết với

vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P được thể hiện trong ID NO: 79 để tạo thành chuỗi nặng của kháng thể và tên trong Bảng là để chỉ sự kết hợp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể (ví dụ Hu32a-85) cộng với hậu tố “.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách nối với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA, cộng với hậu tố “.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách thắt với vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P, ví dụ, “Hu23a-57.IgG4AA” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nặng Hu23VH1 và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như được thể hiện trong SEQ ID NO.72, và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu32VL1 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73. “Hu23a-57.IgG4P” có nghĩa là kháng thể có chiều dài đầy đủ được hình thành bằng cách liên kết chuỗi nặng, được hình thành bằng cách liên kết Hu23VH1 vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-P như được thể hiện trong SEQ ID NO.79 và chuỗi nhẹ, được hình thành bằng cách liên kết vùng biến đổi chuỗi nhẹ Hu32VL1 và vùng không đổi chuỗi Kappa như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

5. Sàng lọc các kháng thể được nhân tạo hóa

Việc phát hiện ái lực của các kháng thể được nhân tạo hóa khác nhau được thực hiện bởi Biacore (xem Ví dụ thử nghiệm 3 về phương pháp này) và kết quả được thể hiện trong Bảng 16. Kết quả cho thấy rằng các kháng thể được nhân tạo hóa khác nhau duy trì khả năng gắn kết với PD-1 và một số được nhân tạo hóa các kháng thể có ái lực thậm chí về cơ bản gần với ái lực của kháng thể của chuột nhắt của chúng.

Bảng 16. Ái lực của kháng thể được nhân tạo hóa Hu23 với PD-1 của người

Kháng thể	ka (1/mili giây)	kd (1/giây)	K _D (M)
M23	4,57E+04	1,32E-04	2,89E-09
Hu23-1,IgG4AA	3,43E+04	1,10E-04	3,20E-09
Hu23-5,IgG4AA	2,99E+04	1,14E-04	3,82E-09
Hu23-2,IgG4AA	2,74E+04	1,61E-04	5,86E-09
Hu23-6,IgG4AA	2,79E+04	1,55E-04	5,57E-09
Hu23-3,IgG4AA	2,93E+04	1,60E-04	5,46E-09
Hu23-7,IgG4AA	2,77E+04	1,66E-04	5,97E-09
Hu23-4,IgG4AA	4,24E+04	1,44E-04	3,39E-09
Hu23-8,IgG4AA	4,11E+04	1,47E-04	3,56E-09
Hu23-9,IgG4AA	6,16E+04	1,32E-04	2,15E-09

Hu23-10,IgG4AA	5,51E+04	1,53E-04	2,77E-09
Hu23-11,IgG4AA	4,22E+04	1,14E-04	2,71E-09
Hu23-12,IgG4AA	5,45E+04	1,10E-04	2,02E-09
Hu23-13,IgG4AA	4,24E+04	1,22E-04	2,88E-09
Hu23-14,IgG4AA	7,23E+04	1,61E-04	2,22E-09
M32	7,83E+04	4,15E-04	5,3E-09
Hu32a-15,IgG4AA	4,89E+04	2,52E-03	5,14E-08
Hu32a-29,IgG4AA	7,89E+04	6,20E-04	7,86E-09
Hu32a-43,IgG4AA	8,39E+04	6,85E-04	8,16E-09
Hu32a-57,IgG4AA	7,94E+04	6,24E-04	7,85E-09
Hu32a-71,IgG4AA	8,60E+04	3,96E-04	4,61E-09
Hu32a-85,IgG4AA	9,90E+04	3,15E-04	3,18E-09
M33	3,08E+05	2,27E-04	7,37E-10
Hu33-1,IgG4AA	6,61E+04	1,28E-03	1,93E-08
Hu33-4,IgG4AA	8,11E+04	2,55E-03	3,14E-08
Hu33-7,IgG4AA	7,69E+04	2,60E-03	3,38E-08
Hu33-2,IgG4AA	1,35E+05	1,43E-04	1,06E-09
Hu33-5,IgG4AA	1,46E+05	1,35E-04	9,26E-10
Hu33-8,IgG4AA	1,53E+05	1,62E-04	1,06E-09
Hu33-3,IgG4AA	1,25E+05	1,36E-04	1,09E-09
Hu33-6,IgG4AA	1,30E+05	1,40E-04	1,08E-09
Hu33-9,IgG4AA	1,40E+05	1,53E-04	1,09E-09

Ví dụ 3. Cấu tạo và biểu hiện của kháng thể nhân tạo hóa PD-1

Mỗi đoạn gen VH/VK của kháng thể đã được nhân tạo hóa được xây dựng bằng các đoạn mồi được thiết kế thông qua PCR, và sau đó được sử dụng để tạo ra kháng thể có chiều dài đầy đủ biểu hiện vector VH-CH1-Fc-pHr/VK-CL-pHr bằng cách tái tổ hợp tương đồng với vector biểu hiện pHr (với peptit tín hiệu và đoạn gen vùng không đổi (CH1-Fc/CL)). IgG4-P đại diện cho đột biến S228P (tương ứng với vị trí 108 của SEQ ID NO.72 hoặc SEQ ID NO.79) và IgG4-AA đại diện cho F234A (tương ứng với vị trí 114 của trình tự SEQ ID NO.72 hoặc SEQ ID NO.79), L235A (tương ứng với vị trí 115 của SEQ ID NO.72 hoặc SEQ ID NO.79) và S228P (tương ứng với vị trí 108 của SEQ ID NO.72 hoặc SEQ ID NO.79). Định dạng kháng thể IgG4-AA và IgG4-P có thể thu được bằng các đột biến điểm đơn giản ở định dạng kháng thể IgG4.

Trình tự của vùng không đổi chuỗi nặng IgG4-AA như sau (SEQ ID NO.72):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGK.

Trình tự của vùng không đổi chuỗi nhẹ kháng thể (chuỗi Kapp) là như sau (SEQ ID NO.73):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC.

Trình tự kháng thể có chiều dài đầy đủ dạng IgG4AA được xây dựng được minh
họa như sau:

Hu23-11.IgG4AA kháng thể chuỗi nặng (SEQ ID NO.74):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWM
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERFSY
YGSTSDWYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSKEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK.

Hu23-11.IgG4AA chuỗi nhẹ (SEQ ID NO.75):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC.

Hu32a-85.IgG4AA chuỗi nặng (SEQ ID NO.76):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASDFTFTDYEIHWVKQAPGHGLEWIG
LFDPETGGIVYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCTREGYNR
DWYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT

KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLK.

Hu32a-85.IgG4AA chuỗi nhẹ (tương tự như Hu23-11.IgG4AA chuỗi nhẹ, SEQ ID NO.75):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC.

Hu33-6.IgG4AA chuỗi nặng (SEQ ID NO.77):

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA
TISGGGVDTYYYQDNVQGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYGH
GYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLGLK.

Hu33-6.IgG4AA chuỗi nhẹ (SEQ ID NO.78):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Trình tự của IgG4-P vùng không đổi chuỗi nặng là như sau (SEQ ID NO.79):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC

PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGK.

Trình tự của các kháng thể có chiều dài đầy đủ dạng IgG4-P được tạo thành được ví dụ như sau:

Hu23-11.IgG4P kháng thể chuỗi nặng (SEQ ID NO.80):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWM
GLIDPETGGTVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERFSY
YGSTSDWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK.

Hu23-11.IgG4P chuỗi nhẹ (tương tự như Hu23-11.IgG4AA chuỗi nhẹ, SEQ ID NO.75):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVADNLQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC.

Hu32a-85.IgG4P chuỗi nặng (SEQ ID NO.81):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASDFTFTDYEIHWVKQAPGHGLEWIG
LFDPETGGIVYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCTREGYNR
DWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNT
KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ

EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLK.

Hu32a-85.IgG4P chuỗi nhẹ (tương tự như Hu23-11.IgG4AA chuỗi nhẹ, SEQ ID NO.75):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC.

Hu33-6.IgG4P chuỗi nặng (SEQ ID NO.82):

KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA
TISGGGVDTYYYQDNVQGRFTISRADNKNLSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYGH
GYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLGLK.

Hu33-6.IgG4P chuỗi nhẹ (tương tự như Hu33-6.IgG4AA chuỗi nhẹ, SEQ ID NO.78):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYYT
SSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Ví dụ thử nghiệm

Ví dụ thử nghiệm 1. Thử nghiệm ELISA về kháng thể kháng PD-1 gắn kết với
phối tử PD-1 và phong bế gắn kết *in vitro*

PD-L1 trên bề mặt tế bào khối u gắn kết với PD-1 trên bề mặt tế bào T, do đó ức chế sự tăng sinh của tế bào T. Kháng thể PD-1 có thể phong bế con đường tín hiệu PD-L1/PD-1 bằng cách gắn kết với PD-1, do đó kích thích tăng sinh tế bào T. Thử nghiệm phong bế gắn kết PD-1/PD-L1 được sử dụng để phát hiện hoạt tính phong bế của các kháng thể kháng PD-1 trên con đường tín hiệu.

Trong thử nghiệm này, sau khi phủ protein PD-1-His (Cat. # 10377H08H, Sino Biological) trên các đĩa 96 giếng, các kháng thể kháng PD-1 sẽ được kiểm tra (bao gồm các kháng thể: Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA, kháng thể đối chứng dương tính: H005-1 (xem kháng thể H005-1 trong WO2015085847)) được bổ sung vào riêng biệt và hỗn hợp phản ứng được ủ; sau đó, kháng thể IgG (H + L) của dê đánh dấu HRP (Cat. # 109-035-003, Jackson ImmunoResearch) được bổ sung vào và ủ. Sau khi rửa các đĩa, lượng liên kết của IgG kháng người (H + L) của dê được đánh dấu HRP được phát hiện và các giá trị EC_{50} của liên kết của kháng thể kháng PD-1 với phối tử PD-1 được tính toán.

Trong thử nghiệm này, sau khi phủ protein PD-1 được dung hợp với Fc ở vùng ngoại bào (PD-1-Fc, xem SEQ ID NO.1 đối với trình tự) trên các đĩa 96 giếng, các kháng thể kháng PD-1 sẽ được kiểm tra (bao gồm các kháng thể: Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA, kháng thể đối chứng dương tính: H005-1 (xem kháng thể H005-1 trong WO2015085847)) được bổ sung riêng biệt và được ủ; sau đó, PD-L1/PD-L2 đánh dấu biotin được bổ sung vào và ủ. Sau khi rửa các đĩa, lượng liên kết của PD-L1/PD-L2 được đánh dấu biotin được phát hiện và các giá trị IC_{50} của kháng thể kháng PD-1 để phong bế sự gắn kết của phối tử với PD-L1/PD-L2 được tính toán.

Dung dịch đệm CB pH 9,6 (1,59 g Na_2CO_3 và 2,93 g $NaHCO_3$ hòa tan trong 1 L nước cất) được sử dụng để pha loãng PD-1-Fc thành 1 μ g/mL, được bổ sung vào đĩa 96 giếng với thể tích 100 μ L/giếng và để ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ-20 giờ. Đệm PBS được hút từ các đĩa 96 giếng, và các đĩa được rửa bằng đệm PBST (pH 7,4 PBS chứa 0,05% tween 20) một lần. 120 μ L/giếng PBST/1% sữa được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để phong bế. Dung dịch phong bế đã được loại bỏ và các đĩa được rửa bằng đệm PBST một lần. 90 μ L kháng thể kháng PD-1 cần thử nghiệm được pha loãng đến nồng độ thích hợp với chất pha loãng mẫu (pH 7,4 PBS chứa 5% BSA, 0,05% Tween20) được bổ sung vào và ủ sơ bộ ở 4°C trong 1 giờ. Nồng độ 10 lần của hàm lượng biotin

PD-L1/PD-L2 (Beijing Sino Biological Co., Ltd.) (10 µg/mL) được bổ sung vào với thể tích 10 µl/giếng, lắc và trộn đều trên máy lắc, và sau đó ủ ở 37°C trong 1 giờ. Hệ thống phản ứng được loại bỏ và các đĩa được rửa bằng PBST 6 lần. 100 µl/giếng Streptavidin-Peroxidase Polymer 1:400 pha loãng với đệm PBST được bổ sung vào và ủ với lắc ở nhiệt độ phòng trong 50 phút. Các đĩa được rửa bằng PBST 6 lần. 100 µl/giếng TMB được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5-10 phút. 100µL/giếng H₂SO₄ 1M được bổ sung vào để dừng phản ứng. Các giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được đọc bằng cách sử dụng bộ đọc vi đĩa và các giá trị IC₅₀ của kháng thể kháng PD-1 để phong bế liên kết của phối tử với PD-L1/PD-L2 đã được tính toán. Dữ liệu được thể hiện chi tiết trong Bảng 17 dưới đây.

Bảng 17. ELISA của các kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế để gắn kết với PD-1 và để phong bế sự gắn kết của phối tử với PD-L1/PD-L2

Kháng thể	Gắn kết kháng nguyên		phong bế gắn kết PD-1 và PD-L1/PD-L2	
	hu PD-1-his OD giá trị MAX	hu PD-1-his EC50 (ng/mL)	Hu PD-1-Fc/ PD- L1 IC50 (ng/mL)	Hu PD-1-Fc/ PD-L2 IC50(ng/mL)
Hu23-11,IgG4AA	1,46	237,3	92,35	245,1
Hu32a-85,IgG4AA	1,265	135,9	78,63	205,9
Hu33-6.IgG4AA	1,706	205,6	103,5	207,2
H005-1	1,21	113,1	109,6	225,3

Các kháng thể kháng PD-1 được lấy làm ví dụ Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA theo sáng chế đều có thể phong bế hiệu quả gắn kết của PD-1 với PD-L1/PD-L2, và hoạt tính phong bế của chúng tương tự như hoạt tính của kháng thể kiểm soát dương tính.

Ví dụ thử nghiệm 2. Thử nghiệm phong bế phối tử của các kháng thể mẫu

Tác dụng phong bế của kháng thể đối với sự gắn kết của PD-1 và PD-L1 được nghiên cứu. Quá trình thử nghiệm được mô tả ngắn gọn như sau:

Tế bào CHOK1/PD-L1 (Promega) được tiêu hóa, cho vào đĩa 96 giếng ở 100 µL/giếng và đặt trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ để ủ trong 24 giờ. Đối chứng và mẫu được pha loãng đến nồng độ mong muốn bằng cách sử dụng PBS. Tế bào Jurkat/PD-1 (tế bào Jurkat được chuyển nạp ổn định với PD-1) được đếm và được gieo theo tỷ lệ nhất định (90 µL/giếng) vào đĩa nuôi cấy tế bào có tế bào CHOK1/PD-L1 và 10 µL/kháng thể được pha loãng (kháng thể: Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA, kháng

thể đối chứng dương tính: H005-1, đối chứng âm tính: protein IgG4, nồng độ pha loãng gradien kháng thể: 0,3 mg/mL, 3 mg/mL, 30 mg/mL) được bổ sung vào và đặt trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ để ủ trong 5 giờ. Các đĩa nuôi cấy tế bào được lấy ra và đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, 50 µl Bio-Glo™ Reagent được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút trước khi đọc đĩa. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig.1.

Kết quả cho thấy rằng các kháng thể kháng PD-1 được lấy làm ví dụ Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA trong sáng chế có thể phong bế hiệu quả sự liên kết của PD-1 và PD-L1

Ví dụ thử nghiệm 3. Thử nghiệm ái lực với kháng thể BIAcore của các kháng thể làm mẫu

IgG được bắt giữ ái lực bằng cách sử dụng chip cảm biến sinh học Protein A (Cat. # 29127556, GE). Kháng nguyên PD-1 của người (Cat. # 10377H08H, Sino Biological) và kháng nguyên Cyno PD-1 (mua từ Sino Biological) chảy khắp bề mặt của chip và các đường cong gắn kết và phân ly thu được bằng cách phát hiện thời gian thực của PD-1 tín hiệu phản ứng PD-1 của kháng thể và kháng nguyên bằng thiết bị Biacore T200. Sau khi hoàn thành quá trình phân ly của mỗi chu kỳ thử nghiệm, chip cảm biến sinh học được rửa và tái chế bằng dung dịch đệm 10 mM Glycine-HCl pH 1,5. Hệ thống đệm thử nghiệm là dung dịch đệm 1 × HBS-EP (Cat # BR-1001-88, GE). Sau thử nghiệm, phần mềm Đánh giá GE Biacore T200 phiên bản 3.0 được sử dụng để khớp dữ liệu với mô hình Langmuir (1: 1) và giá trị ái lực thu được. Kết quả được thể hiện trong Bảng 18.

Bảng 18. Ái lực của kháng thể kháng PD-1 với PD1 của người và PD-1 của khỉ

Kháng thể	Kháng nguyên	ka (1/mili giây)	kd (1/giây)	K _D (M)
Hu23-11,IgG4AA	hPD-1-His	6,06E+04	1,13E-04	1,86E-09
	Cyno PD-1	4,79E+04	1,26E-04	2,62E-09
Hu32a-85,IgG4AA	hPD-1-His	8,56E+04	2,78E-04	3,25E-09
	Cyno PD-1	1,16E+05	4,75E-04	4,11E-09
Hu33-6.IgG4AA	hPD-1-His	1,24E+05	1,14E-04	9,18E-10
	Cyno PD-1	2,51E+05	2,41E-04	9,60E-10

Kết quả cho thấy các kháng thể kháng PD-1 được lấy làm ví dụ Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA theo sáng chế đều có thể gắn kết với PD-1 của khỉ và PD-1 của người.

Ví dụ thử nghiệm 4. Ảnh hưởng của kháng thể đối với sự bài tiết IFN γ của tế bào trong thử nghiệm hoạt hóa tế bào lympho PBMC-T

Để nghiên cứu ảnh hưởng của kháng thể kháng PD-1 lên chức năng của tế bào lympho T nguyên phát ở người, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người đã được thu thập và tinh sạch, kích thích bằng lao tố (tuberculin: TB) trong 5 ngày, và mức độ tiết của cytokine IFN γ được phát hiện. Quá trình thử nghiệm được mô tả ngắn gọn như sau:

PBMC được lấy từ máu tươi bằng cách sử dụng Ficoll-Hypaque (17-5442-02, GE) để ly tâm gradien mật độ (Stem Cell Technologies), được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (SH30809.01, GE) được bổ sung 10% (thể tích) FBS (10099-141, Gibco) ở 37°C và 5% CO $_2$.

PBMC mới được phân lập và tinh khiết được điều chỉnh đến mật độ 2×10^6 tế bào/mL với môi trường RPMI 1640. 40 μ L lao tố (97-8800, Synbiotics) được bổ sung vào 20 mL huyền phù tế bào và được nuôi cấy trong tủ ấm 37°C, 5% CO $_2$ trong 5 ngày. Vào ngày thứ 5, các tế bào nuôi cấy nói trên được thu thập bằng cách ly tâm, được tiếp tục trong môi trường RPMI 1640 mới, được điều chỉnh đến mật độ $1,1 \times 10^6$ tế bào/mL và được gieo vào các đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng ở 90 μ L mỗi giếng. Đồng thời, các mẫu kháng thể được bổ sung vào (bao gồm các kháng thể theo sáng chế: Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA, kháng thể đối chứng dương tính H005-1 và protein IgG4 đối chứng âm tính, gradien kháng thể nồng độ pha loãng 0,3 mg/mL, 3 mg/mL và 30 mg/mL) gradien pha loãng với PBS (B320, Shanghai BasalMedia Technologies Co., Ltd.), 10 μ L/giếng. Các đĩa nuôi cấy tế bào được đặt trong tủ ấm 37°C, 5% CO $_2$ để ủ trong 3 ngày. Các đĩa nuôi cấy tế bào được đưa ra ngoài và phân nổi phía trên tế bào được thu thập bằng cách ly tâm (4000 vòng/phút, 10 phút). Mức IFN- γ được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp ELISA (bộ kit phát hiện IFN- γ ở người (EHC102g.96, Neobioscience)). Hướng dẫn của chất phản ứng được tham khảo cho các hoạt tính cụ thể.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig.2. Kết quả cho thấy rằng các kháng thể kháng PD-1 Hu23-11.IgG4AA, Hu32a-85.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA theo sáng chế đều có thể kích hoạt hiệu quả bài tiết IFN- γ .

Ví dụ thử nghiệm 5. Ảnh hưởng của kháng thể kháng PD-1 trên mô hình bệnh ung thư đại tràng MC38 ở chuột nhắt PD-1 chuyển gen

Tế bào MC38 được cấy ở 5×10^5 tế bào/chuột nhắt/100 μ l vào 90 hPD-1 TG chuột nhắt (Biocytogen) dưới da ở xương sườn bên phải. Sau 10 ngày, những con vật có khối u quá lớn hoặc quá nhỏ được loại trừ. Dựa trên thể tích khối u trung bình khoảng 120 mm³, các chuột nhắt được chia ngẫu nhiên thành: nhóm dẫn chất đối chứng trống (PBS), đối chứng dương H005-1 3 mpk, Hu32a-85.IgG4AA 1 mpk, Hu32a-85.IgG4AA 3 mpk, Hu23-11.IgG4AA 1 mpk, Hu23-11.IgG4AA 3 mpk và Hu33-6.IgG4AA 3 mpk, tổng cộng có 7 nhóm, mỗi nhóm 8 con. Kháng thể của mỗi nhóm được tiêm vào màng bụng ba lần một tuần bắt đầu từ Ngày thứ 0. Sau tuần đầu tiên sử dụng thuốc, các khối u đã được ức chế đáng kể. Trong tuần thứ hai và thứ ba, tần suất sử dụng thuốc được điều chỉnh thành một lần một tuần cho tổng số 5 lần sử dụng. Khối lượng khối u và trọng lượng động vật được theo dõi hai lần một tuần và dữ liệu được ghi lại. Khi thể tích khối u vượt quá 2000 mm³ hoặc hầu hết các khối u bị loét hoặc trọng lượng cơ thể giảm đi 20%, thì các động vật mang khối u được lấy máu làm điểm cuối của thử nghiệm.

$$\text{Thể tích khối u (TV)} = 1/2 \times L_{\text{chiều dài}} \times L_{\text{chiều rộng}}^2$$

$$\text{Tốc độ phát triển khối u (T/C\%)} = (T-T_0)/(C-C_0) \times 100\%$$

$$\text{Tỷ lệ ức chế phát triển khối u (TGI\%)} = 1 - T/C \%$$

Trong đó T và T₀ đại diện cho thể tích khối u khi kết thúc thử nghiệm và bắt đầu thử nghiệm trong nhóm sử dụng kháng thể, và C và C₀ đại diện cho thể tích khối u khi kết thúc thử nghiệm và bắt đầu thử nghiệm trong nhóm kiểm soát trống, tương ứng.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 19 và Fig.3. Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng so với mẫu trắng đối chứng, các kháng thể theo sáng chế đều có thể ức chế đáng kể sự phát triển của các khối u khác loại MC38 ở chuột nhắt. Trong số đó, nhóm Hu32a-85.IgG4AA-3 mpk có tỷ lệ ức chế khối u cao nhất, và tỷ lệ ức chế khối u là 77,64% ở lần đo cuối cùng. Khi tần suất sử dụng thuốc là ba lần một tuần trong 3 lần sử dụng, trong phép đo vào ngày thứ bảy, kết quả cho thấy rằng tỷ lệ ức chế khối u của các kháng thể theo sáng chế đều tốt hơn đáng kể so với tỷ lệ của kháng thể đối chứng dương tính H005-1; sau đó, tần suất sử dụng thuốc được giảm xuống còn một lần một tuần, sau hai lần sử dụng (Ngày 21), sự khác biệt về hiệu quả của các kháng thể theo sáng chế tăng

dần và biểu hiện phụ thuộc vào liều lượng, trong đó có Hu32a-85. IgG4AA tốt hơn đáng kể so với cùng liều H005-1 ($p < 0,05$). Ngoài ra, các chuột nhất mang khối u có thể dung nạp tốt tất cả các kháng thể kháng PD-1, với trọng lượng cơ thể tăng đều đặn trong toàn bộ quá trình sử dụng và không xảy ra hiện tượng sụt cân rõ ràng do thuốc và các triệu chứng khác.

Bảng 19. Ảnh hưởng của kháng thể kháng PD-1 lên tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u của bệnh ung thư đại tràng chuột nhất MC38 (mm^3)

Số ngày sau khi sử dụng lần đầu tiên	H005-1	Hu32a-85, IgG4AA		Hu23-11, IgG4AA		Hu33-6, IgG4AA
	3mpk	1mpk	3mpk	1mpk	3mpk	3mpk
21	46,82%	67,12%	77,64%	45,12%	75,32%	59,31%

Ví dụ thử nghiệm 6. Ảnh hưởng của kháng thể kháng PD-1 trên mô hình bệnh ung thư đại tràng MC38 ở chuột nhất PD-1 chuyển gen

Chuột nhất PD-1 chuyển gen được mua từ ISIS INNOVATION LIMITED, University Office, Wellington Square, Oxford OX1 2JD, England, và được lai tạo tại Cepharm Biosciences, Inc. để thu được thế hệ chuột nhất thứ năm. Tế bào MC38 được cấy ở 5×10^5 tế bào/100 μl /con vào chuột nhất chuyển gen hPD-1 (nửa con cái và nửa con đực) dưới da ở sau xương sườn bên phải. Khi thể tích khối u trung bình của chuột nhất đạt từ 80-100 mm^3 , những động vật có trọng lượng cơ thể quá lớn hoặc quá nhỏ hoặc khối u sẽ bị loại trừ. Theo thể tích khối u, các chuột nhất mang khối u được chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm (mỗi nhóm 8 con): nhóm kiểm soát hIgG âm tính 30 mpk, H005-1 10 mpk, H005-1 30 mpk, Hu33-6.IgG4AA 10 mpk và Hu33-6.IgG4AA 30 mpk. Ngày phân nhóm và sử dụng được đặt thành Ngày 0. Sau khi phân nhóm, mỗi loại thuốc được sử dụng trong phúc mạc trong khoảng thời gian 22 ngày, hai ngày một lần, tổng cộng 11 lần. Thể tích khối u được đo 2 lần một tuần, đo trọng lượng cơ thể và ghi lại dữ liệu. Trọng lượng cơ thể động vật và thể tích khối u của mỗi nhóm đều được thể hiện dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Mean $\pm$ SEM), và phần mềm Graphpad Prism 5 và Excel được sử dụng để vẽ đồ thị và kiểm tra student t được sử dụng để phân tích thống kê.

$$\text{Thể tích khối u (TV)} = 0.5236 \times L_{\text{chiều dài}} \times L_{\text{chiều rộng}}^2$$

$$\text{Tốc độ phát triển khối u T/C\%} = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$$

$$\text{Tỷ lệ ức chế phát triển khối u \%TGI} = 1 - T/C \%$$

Trong đó T và T0 đại diện cho thể tích khối u khi kết thúc thử nghiệm và bắt đầu thử nghiệm trong nhóm sử dụng kháng thể, và C và C0 đại diện cho thể tích khối u khi kết thúc thử nghiệm và bắt đầu thử nghiệm trong nhóm kiểm soát trống, tương ứng.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 20 và Fig.4. Kết quả thử nghiệm cho thấy rằng so với nhóm đối chứng, các kháng thể theo sáng chế có thể ức chế đáng kể sự phát triển của khối u ghép khác loại của bệnh ung thư đại tràng chuột nhắt MC38. Trong số đó, nhóm Hu33-6.IgG4AA-30 mpk có tỷ lệ ức chế khối u cao nhất và tỷ lệ ức chế khối u là 80,4% ở Ngày 20. Ở nhóm sử dụng liều thấp (10 mpk), hiệu quả của Hu33-6.IgG4AA -10 mpk tốt hơn so với điều khiển tích cực H005-1-10 mpk

Bảng 20. Ảnh hưởng của kháng thể kháng PD-1 lên thể tích khối u của bệnh ung thư đại tràng chuột nhắt MC38

Số ngày sau khi sử dụng lần đầu tiên	Nhóm đối chứng hIgG	Nhóm H005-1 10 mpk	Nhóm H005-1 30 mpk	Nhóm Hu33-6.IgG4AA 10 mpk	Nhóm Hu33-6.IgG4AA 30 mpk
0	96,2	96,1	95,3	94,7	94,5
20	1797,2	794,0	434,9	550,1	352,8
23		1034,2	534,1	632,4	387,6

Lưu ý: đơn vị đo thể tích khối u trung bình của mỗi nhóm trong Bảng là: mm³.

Ví dụ thử nghiệm 7. Thử nghiệm được động học của kháng thể kháng PD-1 ở khi đuôi dài

Khí đuôi dài được sử dụng trong thử nghiệm là 6 khí đực, từ 2-5 tuổi, nặng 2-5kg, được mua từ Guangdong Frontier Biotechnology Co., Ltd., license number: SCXK (Guangdong) 2015-0037, số giấy chứng nhận động vật: 44613900000219.

Môi trường nhà ở: nhiệt độ phòng được kiểm soát ở 18° C-26°C, độ ẩm tương đối là 40% -70% và ánh sáng luân phiên sáng và tối trong 12 giờ. Chuột nhắt được phép tiếp cận miễn phí thức ăn và nước uống, ngoại trừ trường hợp bắt buộc phải nhịn ăn.

Các con vật được cân trước khi cho uống, và trọng lượng cơ thể từ 2,81 đến 3,52 kg. Việc sử dụng thuốc được thực hiện bằng cách sử dụng một bơm tiêm để truyền tĩnh mạch dưới da ở chi trước hoặc chi sau. Liều của mỗi nhóm là 1 mg/kg (1 mpk), được tiêm tĩnh mạch duy nhất với tốc độ 0,1 mL/kg/phút trong thời gian sử dụng thuốc khoảng 30 phút. Trước khi sử dụng và 5 phút, 0,25 giờ, 0,5 giờ (ngay sau khi sử dụng xong), 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 13 ngày,

14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi bắt đầu truyền tĩnh mạch, máu toàn phần của con vật được thu thập tại các tĩnh mạch chi sau và huyết thanh được tách ra. Trong số đó, khoảng 2 mL máu toàn phần được thu thập trước khi tiêm và 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi bắt đầu truyền tĩnh mạch, và khoảng 1 mL máu toàn phần được thu thập tại các thời điểm lấy mẫu máu còn lại. Nồng độ thuốc trong huyết thanh được phát hiện bằng ELISA và phân tích PK được thực hiện. Kết quả được thể hiện trong Bảng 21.

Bảng 21. Dược động học của kháng thể kháng PD1 được nhân tạo hóa ở khi đuôi dài

	Hu23-11.IgG4AA	Hu33-6.IgG4AA
$t_{1/2}$ (ngày)	5,5±0,7	4,6±1,3
C _{max} (µg/mL)	23,75±2,29	21,47±2,13
AUC (giờ*µg/mL)	2775±241	2319±518
CL (mL/ngày/kg)	8,7±0,7	10,7±2,3
V _z (mL/kg)	69±3,6	67,9±3,4

Kết quả cho thấy Hu23-11.IgG4AA và Hu33-6.IgG4AA có hoạt tính dược động học tốt.

Mặc dù để hiểu rõ ràng, sáng chế nói trên đã được mô tả chi tiết với sự hỗ trợ của các số liệu và ví dụ, các mô tả và ví dụ không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Phần mô tả của tất cả các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn trong tài liệu này được tổng hợp đầy đủ và rõ ràng để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13, và LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.47, SEQ ID NO.48, SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.50, SEQ ID NO.51 hoặc SEQ ID NO.52.

2. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương ứng như được thể hiện trong SEQ ID NO.49, SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13.

3. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể của chuột nhất hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, kháng thể thể khảm hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc kháng thể nhân tạo hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

4. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể kháng PD-1 này là kháng thể nhân tạo, kháng thể nhân tạo này chứa vùng khung có nguồn gốc từ kháng thể của người hoặc biến thể vùng khung của nó, trong đó biến thể vùng khung này có nhiều nhất 11 đột biến ngược axit amin trong mỗi vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể của người.

5. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này được chọn từ:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.4, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.5;

(ii) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31 hoặc SEQ ID NO.32, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29;

(iii) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.53, SEQ ID NO.54, SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56, SEQ ID NO.57 hoặc SEQ ID NO.58.

6. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, tổ hợp của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này được chọn từ:

(i) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.4, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.5;

(ii) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31 hoặc SEQ ID NO.32, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29;

(iii) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.53, SEQ ID NO.54, SEQ ID NO.55, SEQ ID NO.56, SEQ ID NO.57 hoặc SEQ ID NO.58.

7. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.55.

8. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.55.

9. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn chứa vùng hằng định kháng thể.

10. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 9, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng của vùng hằng định kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người, vùng hằng định chuỗi nhẹ của vùng hằng định kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm các vùng hằng định chuỗi κ và λ của kháng thể của người.

11. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.72 hoặc SEQ ID NO.79, và vùng hằng định chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.73.

12. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng PD-1 này chứa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.75 và chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.74 hoặc SEQ ID NO.80.

13. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 12, trong đó kháng thể kháng PD-1 này chứa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO.74 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO.75.

14. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, kháng thể chuỗi đơn (scFv), vùng V được dime hóa (kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch) và vùng V được làm ổn định liên kết disulfua (dsFv).

15. Kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đa đặc hiệu hoặc protein dung hợp kháng thể.

16. Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu điều trị bệnh của kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, chất đệm hoặc tá dược được dụng.

17. Axit nucleic mã hóa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

18. Tế bào vật chủ chứa axit nucleic theo điểm 17.

19. Kit chứa kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

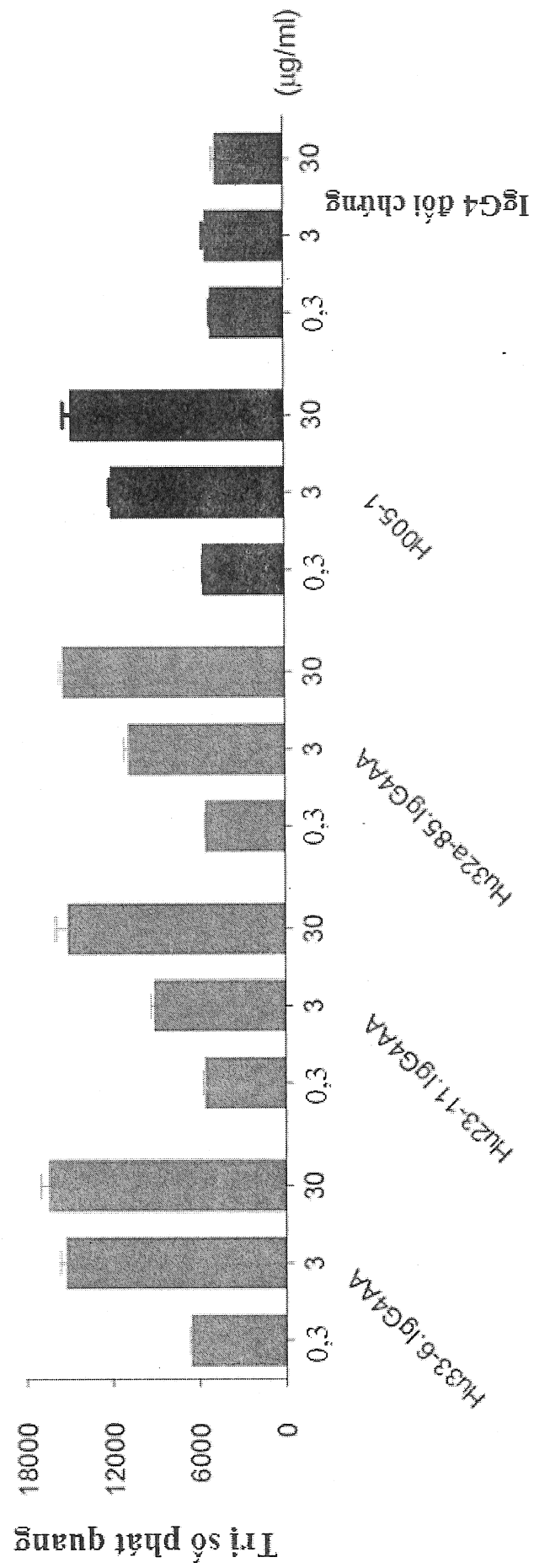


Fig.1

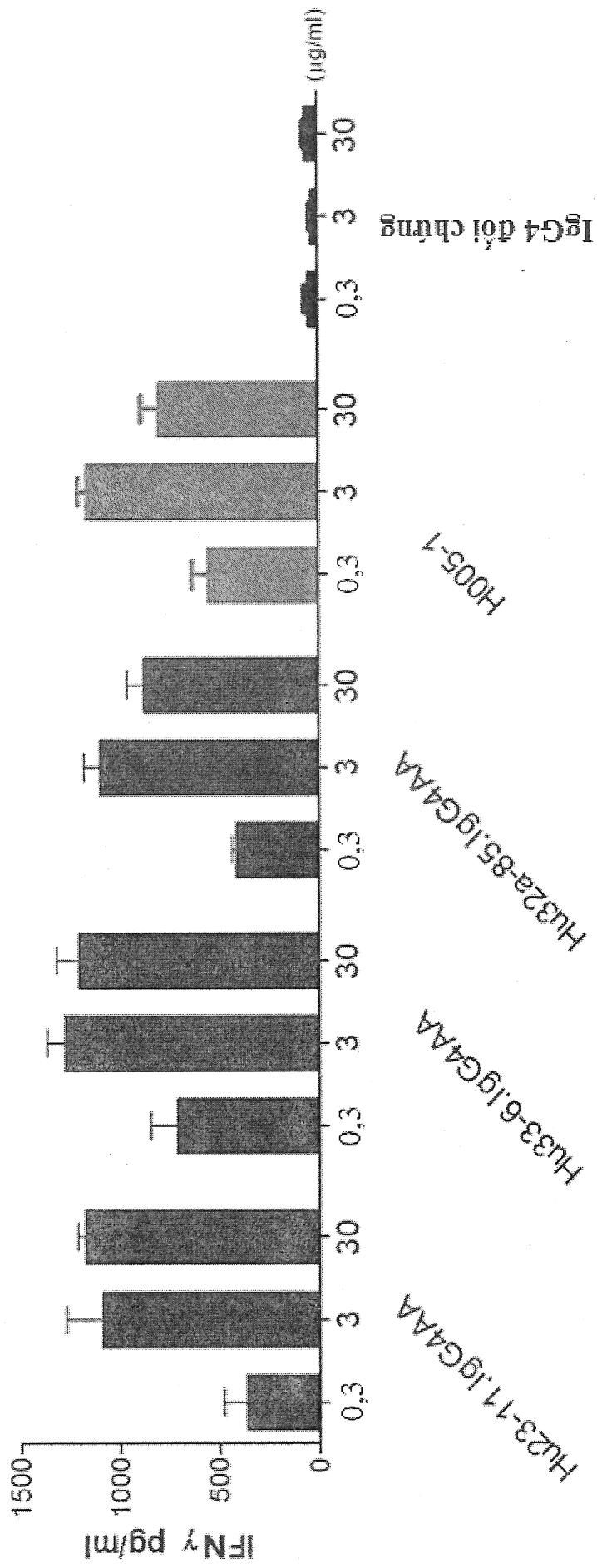


Fig.2

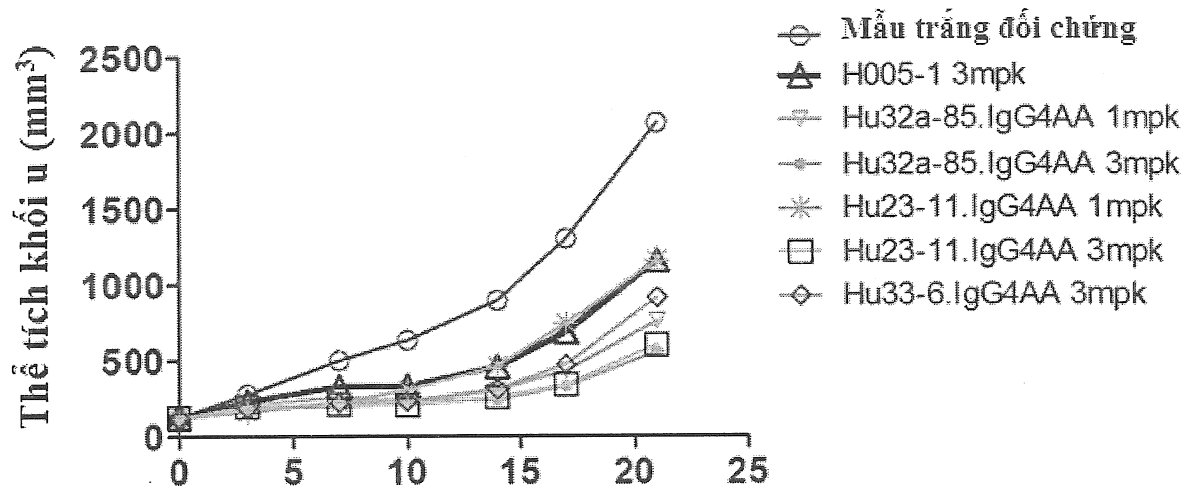


Fig.3

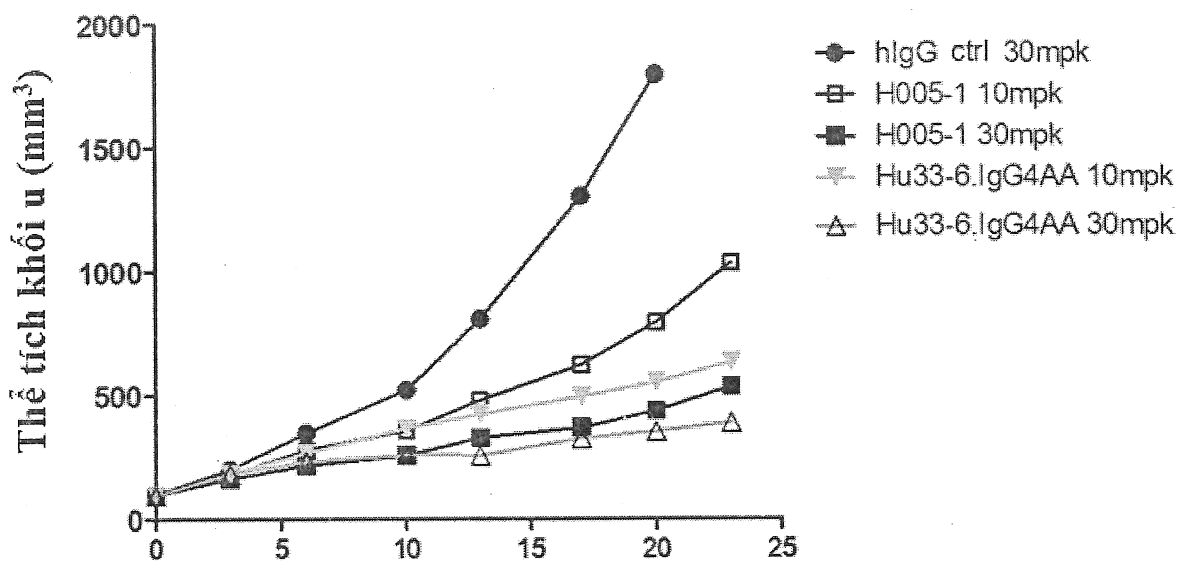


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.
 SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> 2019
 <160> 82
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miễn
 <223> Trình tự PD-1-IgG1Fc của người
 <400> 1
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn
 20 25 30
 Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn
 35 40 45
 Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
 50 55 60
 Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
 65 70 75 80
 Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val
 85 90 95
 Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
 100 105 110
 Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala
 115 120 125
 Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
 130 135 140
 Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
 165 170 175
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 180 185 190
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 195 200 205
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 210 215 220
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 225 230 235 240
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 245 250 255
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 260 265 270
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 275 280 285
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 290 295 300
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 305 310 315 320
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 325 330 335
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 340 345 350
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 355 360 365
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 370 375 380
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 385 390 395 400
 Lys
 <210> 2
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miễn
 <223> Trình tự PD-1-his của người
 <400> 2
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn

```

      20      25      30
Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn
      35      40      45
Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
      50      55      60
Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
      65      70      75      80
Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val
      85      90      95
Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
      100      105      110
Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala
      115      120      125
Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
      130      135      140
Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg
      145      150      155      160
Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Gly Ser Ser Asp Tyr Lys Asp
      165      170      175
Asp Asp Asp Lys His His His His His His
      180      185

<210> 3
<211> 288
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự kháng nguyên PD-1 để chuyển nạp tế bào
<400> 3
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1      5      10      15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
      20      25      30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
      35      40      45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
      50      55      60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
      65      70      75      80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
      85      90      95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
      100      105      110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
      115      120      125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
      130      135      140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
      145      150      155      160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
      165      170      175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
      180      185      190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
      195      200      205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
      210      215      220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
      225      230      235      240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
      245      250      255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
      260      265      270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
      275      280      285

<210> 4
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng M23
<400> 4
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Ile His Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45

```

Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Thr Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ M23
 <400> 5
 Asp Gly Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp His Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng M32
 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ M32
 <400> 7
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

```

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR1 M23
<400> 8
Asp Tyr Glu Met His
1 5
<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR2 M23
<400> 9
Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp
<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR3 M23
<400> 10
Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15
<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự LCDR1 M23
<400> 11
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự LCDR2 M23/M32
<400> 12
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự LCDR3 M23
<400> 13
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5
<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR1 M32
<400> 14
Asp Tyr Glu Ile His
1 5
<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR2 M32
<400> 15

```

```

Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1           5           10           15
Gly
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự HCDR3 M32
<400> 16
Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1           5           10
<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự LCDR1 M32
<400> 17
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1           5           10           15
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự LCDR3 M32
<400> 18
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Ala
1           5
<210> 19
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng M33
<400> 19
Lys Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35           40           45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val
50           55           60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85           90           95
Ala Ser Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr
100          105          110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ M33
<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65           70           75           80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100          105

```

```

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR1 M33
<400> 21
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR2 M33
<400> 22
Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val Gln
1 5 10 15
Gly
<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự HCDR3 M33
<400> 23
Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val
1 5
<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự LCDR1 M33
<400> 24
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe Leu Asn
1 5 10
<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự LCDR2 M33
<400> 25
Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5
<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự LCDR3 M33
<400> 26
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự ghép Hu23VH1/Hu23VH-CDR
<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala 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 Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
      100        105        110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115        120        125
<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự ghép Hu23VL1/Hu23VL-CDR
<400> 28
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100     105     110
<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2
<400> 29
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100     105     110
<210> 30
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VH2
<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
      20      25      30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala 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 Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
      100     105     110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115     120     125
<210> 31
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

```

```

<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VH3
<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 32
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VH4
<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự ghép Hu32VH1/Hu32VH-CDR
<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Glu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala 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 Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự ghép Hu32VL1/Hu32VL-CDR
<400> 34
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

```

```

      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105      110
<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu32VL2
<400> 35
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105      110
<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu32VH2
<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20      25      30
Glu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120
<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu32VH3
<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20      25      30
Glu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100      105      110

```

```

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115                      120
<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu32VH4
<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
    20      25      30
Glu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
    35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
    50      55      60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
    100     105     110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115                      120
<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu32VH5
<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
    20      25      30
Glu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
    35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
    50      55      60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
    100     105     110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115                      120
<210> 40
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu32VH6
<400> 40
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
    20      25      30
Glu Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
    35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
    50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
    100     105     110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    115                      120
<210> 41
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

```

```

<221> Miền
<223> Trình tự ghép Hu33VH1/Hu33VH-CDR
<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val
50          55          60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự ghép Hu33VL1/Hu33VL-CDR
<400> 42
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105
<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu33VL2
<400> 43
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105
<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu33VL3
<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 45
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự Hu33VH2
 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự Hu33VH3
 <400> 46
 Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự Hu23LCDR1(N33Q)
 <400> 47
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Miền
 <223> Trình tự Hu23LCDR1(N33L)
 <400> 48
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Leu Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

```

<221> Miền
<223> Trình tự Hu23LCDR1(N33T)
<400> 49
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1          5          10          15
<210> 50
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23LCDR1(N33D)
<400> 50
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1          5          10          15
<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23LCDR1(G34A)
<400> 51
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Glu
1          5          10          15
<210> 52
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23LCDR1(G34V)
<400> 52
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu
1          5          10          15
<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL1(N33Q)
<400> 53
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20          25          30
Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85          90          95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105         110
<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL1(N33L)
<400> 54
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20          25          30
Leu Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85          90          95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105         110

```

```

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự Hu23VL1(N33T)
<400> 55
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20     25     30
Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50     55     60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85     90     95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100    105    110

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự Hu23VL1(N33D)
<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20     25     30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50     55     60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85     90     95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100    105    110

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự Hu23VL1(G34A)
<400> 57
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20     25     30
Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50     55     60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85     90     95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100    105    110

<210> 58
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự Hu23VL1(G34V)
<400> 58
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20     25     30
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

```

```

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

<210> 59
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2 (N33Q)
<400> 59
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1              5              10              15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20              25              30
Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
  50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
  65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85              90              95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100              105              110

<210> 60
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2 (N33L)
<400> 60
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1              5              10              15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20              25              30
Leu Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
  50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
  65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85              90              95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100              105              110

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2 (N33T)
<400> 61
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1              5              10              15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20              25              30
Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
  50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
  65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85              90              95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100              105              110

<210> 62
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2(N33D)
<400> 62
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2(G34A)
<400> 63
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30
Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

<210> 64
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự Hu23VL2(G34V)
<400> 64
Asp Gly Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30
Asn Val Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự công thức chung HCDRI kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miền
<222>(4)..(4)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Met
<400> 65
Asp Tyr Glu Xaa His
1          5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT

```

```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự công thức chung HCDR1 kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miễn
<222>(2)..(2)
<223> Xaa được chọn từ Phe hoặc Ile
<220>
<221> Miễn
<222>(9)..(9)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Thr
<220>
<221> Miễn
<222>(17)..(17)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc Asp
<400> 66
Leu Xaa Asp Pro Glu Thr-Gly Gly Xaa Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Xaa
<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự công thức chung HCDR3 kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miễn
<222>(2)..(2)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc Arg
<220>
<221> Miễn
<222>(3)..(3)
<223> Xaa được chọn từ Phe hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miễn
<222>(4)..(4)
<223> Xaa được chọn từ Ser hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miễn
<222>(5)..(5)
<223> Xaa được chọn từ Tyr hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miễn
<222>(7)..(7)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miễn
<222>(8)..(8)
<223> Xaa được chọn từ Ser hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miễn
<222>(9)..(9)
<223> Xaa được chọn từ Asn hoặc Thr
<220>
<221> Miễn
<222>(10)..(10)
<223> Xaa được chọn từ Arg hoặc Ser
<400> 67
Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15
<210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự công thức chung LCDR1 kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miễn
<222>(6)..(6)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Leu
<220>
<221> Miễn
<222>(10)..(10)
<223> Xaa được chọn từ Asn, Gln, Leu, Thr hoặc Asp
<220>
<221> Miễn

```

```

<222>(11)..(11)
<223> Xaa được chọn từ Gly, Ala hoặc Val
<220>
<221> Miễn
<222>(12)..(12)
<223> Xaa được chọn từ Asn hoặc Lys
<400> 68
Arg Ser Ser Gln Ser Xaa Val His Ser Xaa Xaa Xaa Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự công thức chung LCDR3 kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miễn
<222>(9)..(9)
<223> Xaa được chọn từ Ala hoặc Thr
<400> 69
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Xaa
1 5
<210> 70
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự công thức chung vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miễn
<222>(26)..(26)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc Asp
<220>
<221> Miễn
<222>(27)..(27)
<223> Xaa được chọn từ Gly, Phe hoặc Tyr
<220>
<221> Miễn
<222>(30)..(30)
<223> Xaa được chọn từ Ser hoặc Thr
<220>
<221> Miễn
<222>(34)..(34)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Met
<220>
<221> Miễn
<222>(38)..(38)
<223> Xaa được chọn từ Arg hoặc Lys
<220>
<221> Miễn
<222>(43)..(43)
<223> Xaa được chọn từ Gln hoặc His
<220>
<221> Miễn
<222>(48)..(48)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Met
<220>
<221> Miễn
<222>(51)..(51)
<223> Xaa được chọn từ Phe hoặc Ile
<220>
<221> Miễn
<222>(58)..(58)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Thr
<220>
<221> Miễn
<222>(66)..(66)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc Asp
<220>
<221> Miễn
<222>(67)..(67)
<223> Xaa được chọn từ Arg hoặc Lys
<220>
<221> Miễn
<222>(68)..(68)
<223> Xaa được chọn từ Val, Ala hoặc Thr
<220>

```

```

<221> Miền
<222>(70)..(70)
<223> Xaa được chọn từ Arg hoặc Lys
<220>
<221> Miền
<222>(83)..(83)
<223> Xaa được chọn từ Leu hoặc Phe
<220>
<221> Miền
<222>(97)..(97)
<223> Xaa được chọn từ Ala hoặc Thr
<220>
<221> Miền
<222>(100)..(100)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc Arg
<220>
<221> Miền
<222>(101)..(101)
<223> Xaa được chọn từ Phe hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miền
<222>(102)..(102)
<223> Xaa được chọn từ Ser hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miền
<222>(103)..(103)
<223> Xaa được chọn từ Tyr hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miền
<222>(105)..(105)
<223> Xaa được chọn từ Gly hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miền
<222>(106)..(106)
<223> Xaa được chọn từ Ser hoặc vắng mặt
<220>
<221> Miền
<222>(107)..(107)
<223> Xaa được chọn từ Asn hoặc Thr
<220>
<221> Miền
<222>(108)..(108)
<223> Xaa được chọn từ Arg hoặc Ser
<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Xaa Xaa Thr Phe Xaa Asp Tyr
20 25 30
Glu Xaa His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45
Gly Leu Xaa Asp Pro Glu Thr Gly Gly Xaa Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Xaa Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Xaa Arg Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Trp Tyr Phe
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự công thức chung vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể Hu32 và Hu23
<220>
<221> Miền
<222>(2)..(2)
<223> Xaa được chọn từ Ile, Val hoặc Gly
<220>
<221> Miền
<222>(29)..(29)
<223> Xaa được chọn từ Ile hoặc Leu
<220>
<221> Miền
<222>(33)..(33)
<223> Xaa được chọn từ Asn, Gln, Leu, Thr hoặc Asp

```

```

<220>
<221> Miễn
<222>(34)..(34)
<223> Xaa được chọn từ Gly, Ala hoặc Val
<220>
<221> Miễn
<222>(35)..(35)
<223> Xaa được chọn từ Asn hoặc Lys
<220>
<221> Miễn
<222>(102)..(102)
<223> Xaa được chọn từ Ala hoặc Thr
<400> 71
Asp Xaa Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Xaa Val His Ser
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Tyr Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72
<211> 327
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự vùng hằng định chuỗi nặng IgG4-AA
<400> 72
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 73
<211> 107

```

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự vùng hằng định chuỗi nhẹ kháng thể kappa
<400> 73
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1          5          10          15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20          25          30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35          40          45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50          55          60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65          70          75          80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85          90          95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100          105

<210> 74
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự chuỗi nặng kháng thể Hu23-11.IgG4AA
<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
          20          25          30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50          55          60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala 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 Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
          100          105          110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
          115          120          125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
          130          135          140
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145          150          155          160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
          165          170          175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
          180          185          190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
          195          200          205
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210          215          220
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225          230          235          240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          245          250          255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
          260          265          270
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
          275          280          285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
          290          295          300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305          310          315          320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
          325          330          335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
          340          345          350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
          355          360          365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
          370          375          380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385          390          395          400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

```

```

      405      410      415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
      420      425      430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
      435      440      445
Ser Leu Gly Lys
      450
<210> 75
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự chuỗi nhẹ Hu23-11.IgG4AA/Hu32a-85.IgG4AA/Hu23-11.IgG4P/Hu32a-85.IgG4P
<400> 75
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20      25      30
Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105      110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      115      120      125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      130      135      140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145      150      155      160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      165      170      175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      180      185      190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      195      200      205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210      215
<210> 76
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự chuỗi nặng Hu32a-85.IgG4AA
<400> 76
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Glu Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
      115      120      125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
      130      135      140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145      150      155      160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      165      170      175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
      180      185      190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
      195      200      205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
      210      215      220

```

```

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225      230      235      240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
      245      250      255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
      260      265      270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
      275      280      285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
      290      295      300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305      310      315      320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
      325      330      335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      340      345      350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
      355      360      365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      370      375      380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385      390      395      400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
      405      410      415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      420      425      430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      435      440      445
<210> 77
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự chuỗi nặng Hu33-6.IgG4AA
<400> 77
Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val
      50      55      60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ser Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
      115      120      125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
      130      135      140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145      150      155      160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
      165      170      175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
      180      185      190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
      195      200      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
      210      215      220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225      230      235      240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245      250      255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
      260      265      270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275      280      285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290      295      300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305      310      315      320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325      330      335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

```

```

      340      345      350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      355      360      365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      370      375      380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385      390      395      400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405      410      415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420      425      430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      435      440      445
<210> 78
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự chuỗi nhẹ Hu33-6.IgG4AA/Hu33-6.IgG4P
<400> 78
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Phe
      20      25      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
      85      90      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210
<210> 79
<211> 327
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự vùng hằng định chuỗi nặng IgG4-P
<400> 79
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1      5      10      15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65      70      75      80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
      100      105      110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
      115      120      125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
      130      135      140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145      150      155      160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
      165      170      175

```

```

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 80
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miễn
<223> Trình tự chuỗi nặng kháng thể Hu23-11. IgG4P
<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala 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 Glu Arg Phe Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Trp Tyr Phe
100 105 110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
195 200 205
Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
225 230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
290 295 300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

```

```

      405      410      415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
      420      425      430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
      435      440      445
Ser Leu Gly Lys
      450
<210> 81
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự chuỗi nặng Hu32a-85. IgG4P
<400> 81
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Glu Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Leu Phe Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Thr Arg Glu Gly Tyr Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115      120      125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130      135      140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145      150      155      160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165      170      175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180      185      190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195      200      205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210      215      220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225      230      235      240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245      250      255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260      265      270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275      280      285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290      295      300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305      310      315      320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325      330      335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340      345      350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355      360      365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370      375      380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385      390      395      400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405      410      415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420      425      430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435      440      445
<210> 82
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Miền
<223> Trình tự chuỗi nặng Hu33-6. IgG4P
<400> 82

```

```

Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20      25      30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Val Asp Thr Tyr Tyr Gln Asp Asn Val
50      55      60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Ser Pro Tyr Gly His Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100     105     110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115     120     125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130     135     140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145     150     155     160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165     170     175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180     185     190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195     200     205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210     215     220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225     230     235     240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245     250     255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260     265     270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275     280     285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290     295     300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305     310     315     320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325     330     335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340     345     350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355     360     365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370     375     380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385     390     395     400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405     410     415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420     425     430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435     440     445

```