



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0043438

(51)⁷ C07K 16/24; A61P 37/00; C12N 5/10; (13) B
C12N 15/13; C12N 15/63; A61K 39/395;
C07K 16/46

(21) 1-2018-05455

(22) 04/07/2017

(86) PCT/RU2017/050056 04/07/2017

(87) WO2018/13017 18/01/2018

(30) 2016128487 29/04/2016 RU

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/07/2019 376A

(73) JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" (RU)

Liter A, bld. 34, Svyazi st. Strelna, Petrodvortsoviy district, St.Petersburg, 198515 (RU)

(72) EKIMOVA, Viktoriia Mikhailovna (RU); KORZHAVIN, Dmitry Valeryevich (RU); CHERNYKH, Yulia Sergeevna (RU); NEMANKIN, Timofey Aleksandrovich (RU); SOLOVYEV, Valery Vladimirovich (RU); VLADIMIROVA, Anna Konstantinovna (RU); BULANKINA, Irina Andreevna (RU); DIDUK, Sergei Vasilyevich (RU); GONCHAROVA, Olga Vladimirovna (RU); EROSHOVA, Anna Vladimirovna (RU); USTIUGOV, Iakov Iurevich (RU); ARTIUKHOVA, Marina Vladimirovna (RU); ULITIN, Andrei Borisovich (RU); IVANOV, Roman Alekseevich (RU); MOROZOV, Dmitry Valentinovich (RU).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI THỤ THỂ PD-1, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2018-05455

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học và bao gồm các kháng thể đơn dòng được phân lập, cụ thể là các kháng thể đơn dòng của người, gắn kết đặc hiệu với PD-1 với ái lực cao. Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và có thể được sử dụng làm chất điều trị trong lĩnh vực ung thư và miễn dịch ung thư, để điều trị các bệnh liên quan đến các rối loạn khác nhau của sự phát triển và sự tăng sinh tế bào. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp tạo ra kháng thể nêu trên và mô tả phương pháp điều trị các bệnh ở người bằng cách sử dụng các kháng thể nêu trên.

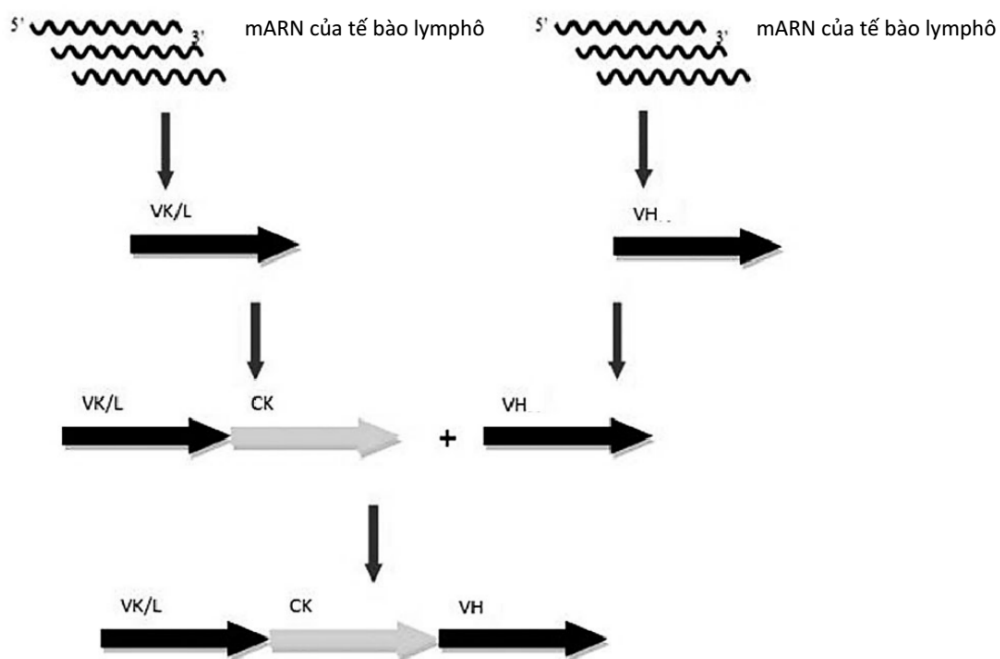


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học và đề cập đến các kháng thể đơn dòng được phân lập, cụ thể là các kháng thể đơn dòng của người gắn kết đặc hiệu với PD-1 với ái lực cao. Các kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người, hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và có thể được sử dụng làm chất điều trị trong lĩnh vực ung thư và miễn dịch-ung thư, và để điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn khác nhau của sự phát triển hoặc sự tế bào của tế bào. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp tạo ra kháng thể nêu trên và mô tả phương pháp điều trị các bệnh ở người bằng kháng thể nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein chết theo chương trình 1 (PD-1) là một thành viên ức chế của họ thụ thể CD28 cũng bao gồm CD28, CTLA-4, ICOS và BTLA. PD-1 được biểu hiện trên các tế bào B hoạt hóa, tế bào T và các tế bào tủy (Agata et al., supra; Okazaki et al. (2002) Curr Opin Immunol 14: 391779-82; Bennet et al. (2003) J Immunol 170: 711-8). Các thành viên ban đầu của họ này, CD28 và ICOS, được phát hiện bằng các chức năng hiệu ứng chức năng đối với sự gia tăng mức độ tăng sinh của tế bào T sau khi bổ sung các kháng thể đơn dòng (Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260). PD-1 được phát hiện bằng cách sàng lọc sự biểu hiện khác biệt trong tế bào chết theo chương trình (Ishida et al. (1992) EMBO J 11:3887-95). Các thành viên khác của họ này, CTLA-4 và BTLA, được phát hiện bằng cách sàng lọc sự biểu hiện khác biệt trong tế bào lymphô T và tế bào TH1 gây độc tế bào tương ứng. Tất cả các thành viên CD28, ICOS và CTLA-4 đều có gốc xystein không được ghép cặp, cho phép chúng homodime hóa. Trái lại, PD-1 được cho là tồn tại dưới dạng monome, không có đặc tính của gốc xystein không được ghép cặp trong các thành viên của họ CD28 khác.

PD-1 là protein xuyên màng loại 55 kDa, là một phân của họ chung gen Ig (Agata et al. (1996) Int Immunol 8:765-72). PD-1 chứa motif ức chế thụ thể miễn dịch

tyrosin (ITIM) ở gần màng và motif chuyển đổi dựa trên tyrosin ở xa màng (ITSM) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E và Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Mặc dù tương tự về mặt cấu trúc với CTLA-4, PD-1 không có motif MYPPY rất quan trọng đối với sự gắn kết B7-1 và B7-2. Đã được phát hiện được rằng PD-1 có hai phối tử, PD-L1 và PD-L2, đã được chứng minh là điều hòa âm tính sự hoạt hóa của tế bào T sau khi gắn kết với PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Cả PD-L1 và PD-L2 đều là thể đồng dạng B7 gắn kết với PD-1, nhưng không gắn kết với các thành viên khác của họ CD28.

Một phối tử PD-1, PD-L1, có nhiều trong các bệnh ung thư khác nhau ở người (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). Sự tương tác giữa PD-1 và PD-L1 dẫn đến sự giảm số lượng tế bào lymphô thâm nhiễm khối u, làm giảm sự tăng sinh qua trung gian thụ thể tế bào T, và lần tránh khỏi sự giám sát miễn dịch của các tế bào ung thư (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Sự ức chế miễn dịch có thể được đảo ngược bằng cách ức chế sự tương tác cục bộ của PD-L1 với PD-1, và tác dụng này là cộng tính khi sự tương tác của PD-L2 với PD-1 bị phong bế (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

PD-1 là thành phần ức chế của họ CD28 và được biểu hiện trên các tế bào B hoạt hóa, tế bào T và tế bào tủy (Agata et al., trên đây; Okazaki et al. (2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) *J Immunol* 170:711-8). Các động vật bị thiếu hụt PD-1 dễ bị phát triển các bệnh tự miễn khác nhau bao gồm bệnh tim tự miễn, và hội chứng tương tự lupút bao gồm bệnh viêm khớp và bệnh viêm thận (Nishimura et al. (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura et al. (2001) *Science* 291:319-22). Ngoài ra, PD-1 đã được phát hiện là đóng vai trò trong bệnh viêm não tự miễn, bệnh lupút ban đỏ toàn thân, bệnh mô ghép chống túc chủ (GVHD), bệnh tiểu đường typ I và bệnh viêm khớp dạng thấp (Salama et al. (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen et al. (2004) *Lupus* 13:510). Trong dòng tế bào B của khối u ở chuột, ITSM của PD-1 đã được chứng minh là cần thiết để phong bế sự phosphoryl hóa tyrosin và dòng Ca^{2+} qua trung gian BCR của các phân tử hiệu ứng xuôi dòng (Okazaki et al. (2001) *PNAS*

98:13866-71).

Ngày nay, có nhiều kháng thể kháng PD-1, như nivolumab (BMS-936558, MDX-1106 hoặc ONO-4538; BMS), pembrolizumab (Merck).

Các giải pháp đã biết bộc lộ các kháng thể đơn dòng kháng PD-1 chứa một số trình tự axit amin theo Công bố đơn quốc tế số WO 2006/121168 (nivolumab, BMS), có một số đặc tính hữu ích, chẳng hạn như có ái lực cao với PD-1 của người, nhưng không có khả năng phản ứng chéo đáng kể với CD28, CTLA-4 hoặc ICOS của người. Ngoài ra, đã chứng minh được rằng các kháng thể này điều biến đáp ứng miễn dịch. Do đó, sáng chế này cũng mô tả phương pháp điều biến đáp ứng miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể kháng PD-1. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự sinh trưởng *in vivo* của các tế bào khối u bằng cách sử dụng các kháng thể kháng PD-1.

Các giải pháp đã biết cũng bộc lộ protein gắn kết PD-1 được phân lập được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO2009/114335 (pembrolizumab, Merck) bao gồm vùng biến đổi thứ nhất và vùng biến đổi thứ hai. Vùng biến đổi thứ nhất là chuỗi nặng chứa các vùng CDR khác nhau và vùng biến đổi thứ hai là chuỗi nhẹ cũng chứa các vùng CDR khác nhau.

Do đó, điều quan trọng là phát triển các kháng thể nhận biết PD-1 và phương pháp sử dụng các chất này. Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với PD-1 và có các đặc điểm có lợi về hoạt tính chức năng, ái lực, tính đặc hiệu và tính ổn định trong các thử nghiệm đánh giá.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng của người gắn kết đặc hiệu với PD-1. Các kháng thể này có thể được sử dụng trong điều trị các bệnh ung thư và bệnh nhiễm khuẩn. Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế được cho là tạo ra sự đáp ứng lâm sàng tốt nhất, so với các phương pháp điều trị bệnh nêu trên, bao gồm cả việc điều trị bằng các kháng thể này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có khả năng gắn kết với thụ thể PD-1 của người và chứa trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 75% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó chứa

trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm các đặc điểm sau:

- trình tự của miền biến đổi chuỗi nặng có mức độ tương đồng ít nhất 75% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và
- trình tự của miền biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng ít nhất 75% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1-3.

Theo một số phương án, mảnh gắn kết cạnh tranh để gắn kết hoặc gắn kết với cùng epitop dưới dạng miền gắn kết chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, mảnh gắn kết có mức độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một phương án của sáng chế, miền gắn kết chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một phương án của sáng chế, miền gắn kết có thể được làm giống với của người.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó khác biệt ở chỗ, kháng thể này liên quan đến các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó có trình tự chuỗi nặng có mức độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó có trình tự chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án, vùng ổn định Fc của kháng thể hoặc mảnh của nó chứa sự đột biến bất kỳ làm giảm hoặc loại bỏ chức năng bất kỳ trong số các chức năng hiệu ứng (ADCC, ADCP hoặc CDC) so với trình tự tự nhiên.

Theo một số phương án, vùng ổn định Fc của kháng thể hoặc mảnh của nó chứa sự đột biến làm gia tăng các thông số dược động học của người hoặc động vật, chẳng hạn như $t_{1/2\beta}$ (giờ) hoặc C_{max} ($\mu\text{g/ml}$).

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ít nhất một trong số các đặc tính sau:

- a) tính ổn định kết tụ: hàm lượng chất kết tụ tăng không quá 5% hàm lượng ban đầu trong dung dịch ở nồng độ cao hơn 10 mg/ml và ở nhiệt độ bảo quản $T = 4^{\circ}\text{C}$

trong thời gian hơn 6 tháng;

b) tính ổn định kết tụ: hàm lượng chất kết tụ tăng không quá 5% hàm lượng ban đầu trong dung dịch ở nồng độ cao hơn 10 mg/ml và với sự tăng nhiệt độ lên 37°C trong thời gian hơn 2 tuần;

c) tính ổn định kết tụ: hàm lượng chất kết tụ tăng không quá 5% hàm lượng ban đầu trong dung dịch ở nồng độ cao hơn 10 mg/ml và với sự tăng nhiệt độ lên 50°C trong thời gian hơn 6 giờ;

d) hằng số phân ly K_D không lớn hơn 10^{-9} (M) khi gắn kết với PD-1 của người;

e) hằng số kết hợp động học kon (1/Ms) bằng ít nhất 10^5 (1/Ms) khi gắn kết với PD-1 của người;

f) hằng số phân ly động học dis (1/s) không quá 10^{-4} (1/s) khi gắn kết với PD-1 của người.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép chứa mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ của kháng thể như đã mô tả trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc miền gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic được phân lập bất kỳ như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa trình tự nucleotit bất kỳ được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào chủ bao gồm bước chuyển nhiễm tế bào gốc thích hợp bằng vector biểu hiện.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể bất kỳ được mô tả trong tài liệu này, bao gồm bước tạo ra tế bào chủ, nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện đủ để tạo ra kháng thể nêu trên hoặc mảnh của nó, sau đó phân lập và tinh chế kháng thể thu được hoặc mảnh có hoạt tính của nó.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của nó như được mô tả ở trên, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm được dùng để điều trị các bệnh ung thư và bệnh nhiễm khuẩn.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp ức chế hoạt tính sinh học của

PD-1 ở đối tượng cần sự ức chế này, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể bất kỳ như được mô tả trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân cần điều trị bao gồm bước sử dụng kháng thể bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên hoặc được phẩm được mô tả trong tài liệu này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ tổng hợp thư viện tổ hợp nguyên thể của người.

Fig.2 thể hiện phagemid để tách dòng của các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (Fig.A) và plasmid biểu hiện để tạo ra Fab (Fig.B).

Fig.3 thể hiện điện di đồ BCD-100 trong điều kiện khử (3A, SDS-PAGE 12%), trong các điều kiện không khử (3B, SDS-PAGE 8%).

Fig.4 thể hiện thử nghiệm enzyme miễn dịch về sự tương tác của BCD-100 với PD1 và các kháng nguyên khác.

Fig.5 thể hiện sự hoạt hóa lại việc truyền tín hiệu NFAT bằng các kháng thể kháng PD1 trong dòng tế bào thông báo Jurkat-NFAT-PD1.

Fig.6 thể hiện tác dụng kích thích sự sản sinh IL-2 bởi kháng thể kháng PD1 trong máu toàn phần của người khi có mặt độc tố đường ruột của tụ cầu khuẩn.

Fig.7 thể hiện kết quả phân tích tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) kháng thể kháng PD1 đối với dòng tế bào Jurkat-PD1.

Fig.8 thể hiện kết quả phân tích sự tương tác của các ứng viên BCD-100 với các thụ thể FcRn và Fcγ trên hệ thống Octet RED 96.

Fig.9 thể hiện kết quả thử nghiệm enzyme miễn dịch đối với sự tương tác của BCD-100 với thụ thể PD1 của các sinh vật khác nhau.

Fig.10 thể hiện kết quả thử nghiệm enzyme miễn dịch đối với sự tương tác của BCD-100 với thụ thể họ CD28.

Fig.11 thể hiện kết quả phân tích sự tương tác của các ứng viên BCD-100 với các thụ thể PD1 của người và khỉ cynomolgus trên hệ thống Octet RED 96.

Fig.12 thể hiện kết quả của ứng suất nhiệt (50°C, 12 giờ) của phân tử BCD-100.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa và phương pháp chung

Nếu không được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực tế hoặc thử nghiệm các phương án của sáng chế, các phương pháp và/hoặc vật liệu làm ví dụ được mô tả dưới đây. Tất cả các tài liệu công bố và tài liệu tham khảo khác được đề cập ở đây được kết hợp để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng. Trong trường hợp có mâu thuẫn, bản mô tả này, bao gồm cả các định nghĩa, sẽ được ưu tiên sử dụng. Mặc dù có nhiều tài liệu công bố các giải pháp đã biết được đề cập ở đây, các tài liệu tham khảo này không tạo thành sự thừa nhận rằng tài liệu bất kỳ trong số các tài liệu này là một phần của kiến thức chung trong lĩnh vực này.

Ngoài ra, trừ khi có yêu cầu theo cách khác do ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít sẽ bao gồm cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ bao gồm cả số ít. Thông thường, sự sắp xếp và phương pháp nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh, di truyền học, hóa học phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, y học và hóa dược, cũng như kỹ thuật lai và hóa học protein và axit nucleic được mô tả ở đây là đã được biết rõ và sử dụng rộng rãi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phản ứng enzym và phương pháp tinh chế được thực hiện theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, như thường được tiến hành trong lĩnh vực này, hoặc như được mô tả ở đây.

Trong toàn bộ bản mô tả này và các phương án, các từ “gồm” và “chứa” hoặc các biến thể của nó như “gồm có” hoặc “việc bao gồm”, “chứa” hoặc “có chứa” sẽ được hiểu là bao gồm cả số nguyên hoặc nhóm các số nguyên đã nêu mà không loại trừ số nguyên hoặc nhóm các số nguyên khác bất kỳ.

Định nghĩa liên quan đến kháng thể

Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "chết theo chương trình 1", "chết tế bào có thể theo chương trình 1", "protein PD-1", "PD-1", "CD279", "PDCD1", "hPD-1" và "hPD-I" có thể thay thế cho nhau và để chỉ các biến thể, thể đồng dạng, thể tương đồng loài bất kỳ của PD-1 và các chất tương tự của chúng chứa ít nhất một epitop phổ biến với PD-1.

Các thuật ngữ "sự đáp ứng miễn dịch", "sự đáp ứng tự miễn" và "sự viêm tự

miễn" để chỉ, ví dụ, tác dụng của các tế bào lymphô, tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào thực bào, bạch cầu hạt và đại phân tử hòa tan được sản sinh bởi các tế bào nêu trên hoặc tế bào gan (bao gồm cả các kháng thể, xytokin và bổ thể được sản sinh do sự tổn thương chọn lọc, sự phá hủy hoặc loại bỏ tác nhân gây bệnh xâm lấn, các tế bào hoặc mô bị nhiễm tác nhân gây bệnh, các tế bào ung thư hoặc trong trường hợp tính tự miễn dịch hoặc tình trạng viêm bệnh lý, các tế bào hoặc mô bình thường từ cơ thể người).

Thuật ngữ "phân tử gắn kết" được sử dụng ở đây bao gồm các kháng thể, globulin miễn dịch và mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Thuật ngữ "kháng thể" (Ab) hoặc "globulin miễn dịch" (Ig) được sử dụng ở đây được dự định để chỉ tetrame bao gồm hai chuỗi nặng (H) (khoảng 50-70 kDa) và hai chuỗi nhẹ (L) (khoảng 25 kDa), được liên kết bằng liên kết cầu disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng ổn định chuỗi nặng (CH). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng ổn định chuỗi nhẹ (CL). Các miền VH và VL có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là "vùng quyết định tính bổ trợ" (complementarity determining region: CDR), xen kẽ giữa các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là "vùng khung" (framework region: FR). Mỗi vùng VH và VL bao gồm ba CDR (H-CDR khi được sử dụng ở đây thể hiện chuỗi nặng CDR và L-CDR khi được sử dụng ở đây thể hiện chuỗi nhẹ CDR) và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Việc phân bố các axit amin cho mỗi vùng có thể được thực hiện theo các định nghĩa của IMGT® (Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27 (1): 55-77 (2003), hoặc các định nghĩa của Kabat, trình tự của các protein quan tâm về mặt miễn dịch (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 and 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol Biol. 196: 901-917 (1987), hoặc Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "kháng thể" và "globulin miễn dịch" có thể thay thế cho nhau.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc "phần kháng nguyên", "mảnh") được dự định để chỉ một hoặc nhiều phần hoặc mảnh của kháng thể vẫn duy trì được khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, PD1). Đã chứng minh được rằng chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể

có thể được thực hiện bằng một số mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" này bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một gồm các miền V_L , V_H , C_L và C_{H1} ; (ii) mảnh $F(ab)_2$, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được liên kết bằng liên kết cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm các miền V_H và C_{H1} ; (iv) mảnh Fv gồm các miền V_L và V_H của nhánh đơn của kháng thể; (v) mảnh kháng thể miền đơn (*dAb), gồm miền V_H ; và (vi) vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) được phân lập có thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Hơn nữa, mặc dù hai miền của mảnh Fv, là V_L và V_H , được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được liên kết bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng nhóm liên kết tổng hợp để cho phép chúng được tạo thành protein chuỗi đơn trong đó các vùng V_L và V_H ghép đôi để tạo thành các phân tử hóa trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv)). Sáng chế này cũng đề xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa vùng V_H và/hoặc V_L . Trong trường hợp là V_H , phân tử cũng có thể chứa một hoặc nhiều vùng CH1, vùng bản lề, CH2 hoặc CH3. Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định bao hàm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Các dạng khác của kháng thể chuỗi đơn, như kháng thể hai mảnh, cũng được bao gồm. Kháng thể hai mảnh là các kháng thể nhỏ hóa trị hai và đặc hiệu kép, trong đó miền V_H và V_L được biểu hiện trên cùng chuỗi polypeptit (VH-VL). Bằng cách sử dụng nhóm liên kết quá ngắn để cho phép ghép đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền này buộc phải ghép đôi với các miền bổ trợ của chuỗi khác và tạo hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Các vùng kháng thể, như các mảnh Fab- và $F(ab')_2$ có thể được tạo ra từ các kháng thể toàn phần bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, như thủy phân các kháng thể toàn phần bằng papain hoặc pepsin. Ngoài ra, các kháng thể, các phần của chúng và các phân tử adhesin miễn dịch có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, ví dụ, như được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp" được dùng để chỉ kháng thể được biểu hiện từ tế bào hoặc dòng tế bào chứa (các) trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, trong đó (các) trình tự nucleotit này không kết hợp với tế bào trong tự nhiên.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể biến thể" được dùng để chỉ kháng thể có trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của kháng thể "bố-mẹ" của nó do sự bổ sung, làm khuyết đoạn và/hoặc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin so

với trình tự của kháng thể bố-mẹ. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể biến thể chứa ít nhất một hoặc nhiều (ví dụ, từ một đến mười hai, ví dụ, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc chín, mười, mười một hoặc mười hai; theo một số phương án, kháng thể biến thể chứa từ một đến khoảng mười) sự bổ sung, làm khuyết đoạn, và/hoặc sự thay thế axit amin so với kháng thể bố-mẹ. Theo một số phương án, sự bổ sung, làm khuyết đoạn và/hoặc sự thay thế được thực hiện trong vùng CDR của kháng thể biến thể. Tính đồng nhất hoặc tính tương đồng đối với trình tự của kháng thể biến thể được xác định ở đây dưới dạng tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự của kháng thể biến thể giống với các gốc của kháng thể bố-mẹ, sau khi dóng thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tỷ lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự tối đa. Kháng thể biến thể vẫn giữ được khả năng gắn kết với cùng kháng nguyên, và tốt hơn là với epitop, mà kháng thể bố-mẹ gắn kết với; và theo một số phương án, ít nhất một đặc tính hoặc hoạt tính sinh học lớn hơn so với đặc tính hoặc hoạt tính sinh học của kháng thể bố-mẹ. Ví dụ, kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, ái lực gắn kết lớn hơn, thời gian bán hủy lâu hơn, nồng độ IC₅₀ thấp hơn hoặc khả năng ức chế hoạt tính sinh học của kháng nguyên tăng lên so với kháng thể bố-mẹ. Kháng thể biến thể được đặc biệt quan tâm ở đây là kháng thể biểu hiện sự gia tăng hoạt tính sinh học ít nhất 2 lần, (tốt hơn là ít nhất 5 lần, 10 lần hoặc 20 lần) so với kháng thể bố-mẹ.

Theo nghĩa rộng, thuật ngữ "kháng thể thể khảm" được dùng để chỉ kháng thể chứa một hoặc nhiều vùng của một kháng thể, và một hoặc nhiều vùng của một hoặc nhiều kháng thể khác, thường là kháng thể của người một phần và kháng thể không phải của người một phần, nghĩa là có nguồn gốc một phần từ động vật không phải người, như chuột, chuột, hoặc ngoại ký sinh trùng tương tự, hoặc họ lạc đà như lạc đà không bướu và lạc đà paca. Các kháng thể thể khảm thường được ưu tiên hơn so với các kháng thể không phải của người để làm giảm nguy cơ đáp ứng miễn dịch kháng kháng thể của người, ví dụ, đáp ứng miễn dịch của người kháng kháng của chuột trong trường hợp kháng thể của chuột. Một ví dụ về kháng thể thể khảm điển hình là kháng thể trong đó các trình tự vùng biến đổi là trình tự của chuỗi, trong khi các trình tự vùng ổn định là của người. Trong trường hợp kháng thể thể khảm, các phần không phải của người có thể bị được biến đổi thêm để làm cho giống với kháng thể của người.

Thuật ngữ "làm cho giống với của người" được dùng để chỉ quá trình mà khi đó kháng thể có nguồn gốc không phải từ người một phần hoặc hoàn toàn, ví dụ, kháng thể của chuột hoặc lạc đà không bướu thu được bằng cách gây miễn dịch cho chuột hoặc lạc đà không bướu tương ứng, bằng kháng nguyên quan tâm hoặc là kháng thể thể khảm trên cơ sở kháng thể của chuột hoặc lạc đà không bướu này, có thể thay thế một số axit amin, cụ thể là trong các vùng khung và miền ổn định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, để tránh hoặc làm giảm đến mức tối thiểu đáp ứng miễn dịch ở người. Các kháng thể tương tác với kháng nguyên đích chủ yếu thông qua các gốc axit amin nằm ở sáu vùng CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Nhằm mục đích này, các trình tự axit amin trong vùng CDR có tính biến đổi nhiều hơn giữa các kháng thể riêng biệt so với các trình tự nằm ngoài vùng CDR. Do các trình tự vùng CDR gây ra phần lớn sự tương tác kháng thể-kháng nguyên, có thể biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp bất chước đặc tính của kháng thể có trong tự nhiên đặc hiệu, hoặc thông thường hơn là của kháng thể đặc hiệu bất kỳ có trình tự axit amin nêu trên, ví dụ, bằng cách tạo cấu trúc vector biểu hiện để biểu hiện các trình tự vùng CDR từ kháng thể đặc hiệu được ghép vào trình tự khung từ kháng thể khác. Kết quả là có thể làm cho kháng thể không phải của người "giống với của người" và, đến mức độ lớn, duy trì tính đặc hiệu gắn kết và ái lực của kháng thể ban đầu. Mặc dù không thể dự đoán chính xác tính sinh miễn dịch và do đó là sự đáp ứng kháng lại kháng thể của người của một kháng thể cụ thể, các kháng thể không phải người thường có tính sinh miễn dịch nhiều hơn so với các kháng thể của người. Các kháng thể thể khảm, trong đó các vùng ổn định ngoại lai (ví dụ như ngoại ký sinh trùng hoặc họ lạc đà) đã được thay thế bằng các trình tự có nguồn gốc từ người, đã được chứng minh là thường có tính sinh miễn dịch nhỏ hơn so với các kháng thể có nguồn gốc ngoại lai hoàn toàn, và có xu hướng sử dụng làm kháng thể điều trị đối với các kháng thể được làm cho giống với của người hoặc của người hoàn toàn. Do đó, các kháng thể thể khảm hoặc các kháng thể khác của nguồn gốc không phải từ người được làm cho giống với của người để làm giảm nguy cơ đáp ứng kháng lại kháng thể của người.

Đối với các kháng thể thể khảm, việc làm cho giống với của người thường bao gồm bước cải biến các vùng khung của trình tự vùng biến đổi. Các gốc axit amin là một phần của vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) sẽ thường không được cải biến nhất do việc làm cho giống với của người, mặc dù trong một số trường hợp, có thể là mong

muốn để cải biến các gốc axit amin riêng biệt của vùng của CDR, ví dụ, để làm khuyết vị trí glycosyl hóa, vị trí loại nhóm amin, vị trí isome hóa aspartat, hoặc các gốc xystein hoặc methionin không mong muốn. Sự glycosyl hóa được liên kết với nguyên tử N được thực hiện nhờ sự gắn chuỗi oligosacarit với gốc asparagin trong trình tự tripeptit Asn-X-Ser hoặc Asn-X-Thr, trong đó X có thể là axit amin bất kỳ ngoại trừ Pro. Sự loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa có thể đạt được bằng cách gây đột biến gốc Asn hoặc Ser/Thr bằng gốc khác, tốt hơn là bằng cách thay thế bảo toàn. Sự loại nhóm amin của các gốc asparagin và glutamin có thể xảy ra phụ thuộc vào các yếu tố như độ pH và sự tiếp xúc bề mặt. Các gốc asparagin đặc biệt mẫn cảm với sự loại nhóm amin, chủ yếu là khi có mặt trong trình tự Asn Gly, và ở mức độ ít hơn trong các trình tự dipeptit khác như Asn-Ala. Trình tự vùng CDR được đề xuất bao gồm vị trí loại nhóm amin này, cụ thể là Asn-Gly, tốt hơn là có thể loại bỏ vị trí này, thường là bằng cách thay thế bảo toàn để làm khuyết một trong số các gốc có liên quan.

Nhiều phương pháp làm cho trình tự kháng thể giống với của người là đã biết trong lĩnh vực này; ví dụ, xem tài liệu: Almagro & Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008). Một phương pháp thường được sử dụng là ghép vùng CDR, ví dụ, khi các kháng thể thể khảm của chuột liên quan đến việc nhận biết các đối tác gen dòng mầm ở người với các gen vùng biến đổi của chuột và ghép các trình tự vùng CDR của chuột vào khung này. Việc ghép vùng CDR có thể dựa trên các định nghĩa vùng CDR theo phương pháp Kabat, mặc dù phiên bản mới nhất (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev.Oncol Hematol.* 64:210 225 (2007)) gợi ý rằng sự định nghĩa theo IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®, www.imgt.org) có thể cải thiện kết quả của việc làm cho giống với của người (xem tài liệu: Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.* 27:55-77 (2003)). Trong một số trường hợp, việc ghép vùng CDR có thể làm giảm tính đặc hiệu và ái lực gắn kết, và do đó là hoạt tính sinh học của kháng thể không phải con người được ghép vùng CDR, so với kháng thể bố-mẹ mà từ đó thu được các vùng CDR. Sự đột biến ngược (đôi khi được gọi là "sự sửa chữa vùng khung" có thể được đưa vào ở các vị trí được chọn của kháng thể được ghép vùng CDR, thường là trong vùng khung, để khôi phục tính đặc hiệu và ái lực gắn kết của kháng thể bố-mẹ). Việc nhận biết các vị trí để có thể đột biến ngược có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thông tin có sẵn trong các tài liệu chuyên ngành và trong các cơ sở dữ liệu của kháng thể. Các gốc axit amin là ứng viên cho sự đột biến ngược

thường là các gốc nằm ở bề mặt của phân tử kháng thể, trong khi các gốc ở bên trong hoặc các gốc có mức độ tiếp xúc với bề mặt thấp sẽ thường không được thay đổi. Kỹ làm cho giống với của người khác với phương pháp ghép vùng CDR và đột biến ngược là tái tạo bề mặt, trong đó các gốc không tiếp xúc với bề mặt không có nguồn gốc từ người được giữ lại, trong khi các gốc ở bề mặt được thay đổi thành các gốc của người.

Trong một số trường hợp, tốt hơn là cũng có thể làm thay đổi một hoặc nhiều gốc axit amin của vùng CDR để cải thiện ái lực gắn kết với epitop đích. Quá trình này được gọi là "sự trưởng thành ái lực" và có thể tùy ý được thực hiện liên quan đến việc làm cho giống với của người, ví dụ, trong các trường hợp mà trong đó việc làm cho kháng thể giống với của người dẫn đến làm giảm tính đặc hiệu hoặc ái lực gắn kết và không thể cải thiện đủ tính đặc hiệu hoặc ái lực gắn kết chỉ bằng cách đột biến ngược. Nhiều phương pháp trưởng thành lực khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, phương pháp gây đột biến bão hòa quét *in vitro* được mô tả trong tài liệu: Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412–417 (1997) và phương pháp trưởng thành lực từng bước *in vitro* được mô tả trong tài liệu: Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037–6042 (1998).

Thuật ngữ "protein được phân lập", "polypeptit được phân lập" hoặc "kháng thể được phân lập" được dùng để chỉ protein, polypeptit hoặc kháng thể mà do nguồn gốc hoặc nguồn dẫn xuất của nó (1) không kết hợp với các thành phần được kết hợp tự nhiên đi kèm với chúng ở trạng thái tự nhiên của nó, (2) không có các protein khác từ cùng loài, (3) được biểu hiện bằng tế bào từ loài khác, hoặc (4) không có trong tự nhiên. Do đó, polypeptit được tổng hợp bằng phương pháp hóa học hoặc được tổng hợp trong hệ thống tế bào khác với tế bào mà nó có nguồn gốc tự nhiên từ đó sẽ được "phân lập" ra khỏi các thành phần được liên quan trong tự nhiên của nó. Protein cũng có thể gần như không chứa các thành phần được kết hợp trong tự nhiên nhờ sự phân lập, bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "mầm" được dùng để chỉ trình tự nucleotit và trình tự axit amin của gen kháng thể và đoạn gen và cách mà chúng được truyền từ bố-mẹ sang thế hệ con thông qua các tế bào mầm. Các trình tự dòng mầm khác với trình tự nucleotit mã hóa các kháng thể trong các tế bào B trưởng thành bị thay đổi do kết quả của sự tái tổ hợp và siêu đột biến trong quá trình trưởng thành của các tế bào

B. Kháng thể "sử dụng" trình tự dòng mầm cụ thể có trình tự nucleotit và trình tự axit amin được dóng thẳng hàng với trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin của dòng mầm, mà nó tương ứng đầy đủ hơn so với trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin của dòng mầm khác bất kỳ.

Thuật ngữ "ái lực" được dùng để chỉ việc xác định sự tương tác giữa kháng nguyên và phân tử gắn kết, ví dụ, kháng thể. Khả năng nội tại để thu hút phân tử gắn kết đối với kháng nguyên thường được thể hiện dưới dạng hằng số cân bằng ái lực gắn kết (KD) của sự tương tác kháng nguyên-phân tử gắn kết cụ thể. Phân tử gắn kết được cho là gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên khi KD < 1mM, tốt hơn là < 100nM. Hằng số ái lực ái lực gắn kết KD có thể được xác định, ví dụ: bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore™) hoặc đo giao thoa theo lớp sinh học, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ thống ProteOn™ XPR36 SPR (Bio-Rad) hoặc Octet™.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "Ka" được dùng để chỉ tốc độ kết hợp của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên đặc hiệu cụ thể, trong khi thuật ngữ "Kd" được dùng để chỉ tốc độ phân ly của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "Kd" được dùng để chỉ hằng số phân ly, thu được từ tỷ lệ của Kd với Ka (nghĩa là Kd/Ka) và được thể hiện dưới dạng nồng độ mol (M). Giá trị Kd của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Phương pháp được ưu tiên để xác định giá trị Kd của kháng thể là phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng hệ thống cảm biến sinh học như hệ thống BIAcore™.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực cao" đối với kháng thể IgG được dùng để chỉ kháng thể có giá trị Kd bằng 10^{-8} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-9} M và còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-10} M đối với kháng nguyên đích. Tuy nhiên, sự gắn kết "ái lực cao" có thể thay đổi đối với các isotyp kháng nguyên khác. Ví dụ, sự gắn kết "ái lực cao" đối với isotyp IgM được dùng để chỉ kháng thể có giá trị KD nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-7} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-8} M, còn tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-9} M.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ " k_{off} " được dùng để chỉ hằng số tốc độ phân ly của sự tương tác kháng nguyên-phân tử gắn kết cụ thể. Hằng số tốc độ phân ly (k_{off} +) có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đo giao thoa theo lớp sinh

học, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ thống Octet™.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ một phần (yếu tố quyết định) của kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với phân tử gắn kết (ví dụ, kháng thể hoặc phân tử liên quan, như phân tử gắn kết đặc hiệu kép). Các yếu tố quyết định epitop thường gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin hoặc hydrat cacbon hoặc mạch bên của đường và thường có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc trưng, cũng như các đặc điểm điện tích đặc trưng. Các epitop có thể là epitop "mạch thẳng" hoặc "cấu dạng". Trong epitop mạch thẳng, tất cả các điểm tương tác giữa protein (ví dụ, kháng nguyên) và phân tử tương tác (như kháng thể) xuất hiện thẳng hàng dọc theo trình tự axit amin bậc một của protein này. Trong epitop cấu dạng, các điểm tương tác xuất hiện ở hai bên các gốc axit amin trên protein được gần cách với nhau trong trình tự axit amin bậc một. Khi epitop mong muốn của kháng nguyên được xác định, có thể tạo ra các kháng thể với epitop này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ngoài ra, sự tạo ra và xác định tính chất của kháng thể hoặc các phân tử gắn kết khác có thể cung cấp thông tin về các epitop mong muốn. Sau đó, từ thông tin này, có thể sàng lọc theo cách cạnh tranh các kháng thể để gắn kết với các epitop giống nhau hoặc tương tự nhau, ví dụ, bằng cách tiến hành các nghiên cứu cạnh tranh để tìm ra các phân tử gắn kết cạnh tranh với nhau để gắn kết với kháng nguyên. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop", ngoài các yếu tố khác, để chỉ mảnh polypeptit, có hoạt tính kháng nguyên và/hoặc sinh miễn dịch ở động vật, tốt hơn là ở các động vật có vú như chuột và người. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop kháng nguyên" là mảnh polypeptit có thể gắn kết đặc hiệu với kháng thể và có thể được phát hiện bằng kỹ thuật đã biết rõ bất kỳ từ các tài liệu đã biết, ví dụ, bằng cách thử nghiệm miễn dịch tiêu chuẩn. Các epitop kháng nguyên không nhất thiết có tính sinh miễn dịch; tuy nhiên, chúng có thể có tính sinh miễn dịch. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop sinh miễn dịch" được định nghĩa là mảnh polypeptit kích thích sự đáp ứng kháng thể ở động vật, khi được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết đến từ các tài liệu chuyên ngành. Thuật ngữ "epitop không có mạch thẳng" hoặc "epitop cấu dạng" bao gồm polypeptit (hoặc axit amin) không liên kế trong protein kháng nguyên gắn kết với kháng thể đặc hiệu epitop.

Có thể xác định xem kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác gắn kết với cùng

epitop hoặc cạnh tranh chéo để gắn kết với phân tử gắn kết PD-1 của sáng chế hay không bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, phương án này cho phép phân tử của sáng chế gắn kết với PD-1 trong các điều kiện bão hòa và sau đó xác định khả năng của kháng thể thử nghiệm gắn kết với kháng nguyên đích nêu trên. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể gắn kết với kháng nguyên đích đồng thời với phân tử gắn kết tham chiếu thì kháng thể thử nghiệm này gắn kết với epitop khác khác với kháng thể gắn kết tham chiếu. Tuy nhiên, nếu kháng thể thử nghiệm không thể gắn kết với kháng nguyên đích đồng thời thì kháng thể thử nghiệm này gắn kết với cùng epitop, epitop chồng lên nhau, hoặc epitop ở gần với epitop đã gắn kết với phân tử gắn kết. Thử nghiệm này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, RIA, BIACORE™, đo giao thoa theo lớp sinh học hoặc phép đo tế bào theo dòng. Để kiểm tra xem phân tử gắn kết của sáng chế có cạnh tranh chéo với phân tử gắn kết khác hay không, có thể sử dụng phương pháp cạnh tranh đã mô tả trên đây theo hai hướng, nghĩa là xác định xem liệu phân tử gắn kết đã biết có phong bế phân tử gắn kết thử nghiệm hay không và ngược lại. Các thử nghiệm cạnh tranh chéo này có thể được thực hiện, ví dụ: bằng cách sử dụng hệ thống IBIS MX96 SPR hoặc Octet™.

Theo phương án, phân tử gắn kết của sáng chế là kháng thể đơn dòng. Khi được sử dụng ở đây, chữ viết tắt “mAb” được dùng để chỉ kháng thể đơn dòng, nghĩa là kháng thể được tổng hợp và phân lập bởi quần thể các tế bào vô tính riêng biệt. Quần thể vô tính có thể là quần thể vô tính của các tế bào bất tử. Theo một số phương án, các tế bào bất tử trong quần thể vô tính là các tế bào lai – khối thể lai - thường được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào lymphô B riêng biệt từ các động vật được gây miễn dịch với các tế bào riêng biệt từ khối u lymphô. Các khối tế bào lai là loại tế bào được tạo cấu trúc và không tồn tại trong tự nhiên.

Lớp (isotyp) và phân lớp của các kháng thể có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Nói chung, lớp và phân lớp của kháng thể có thể được xác định bằng các kháng thể đặc hiệu với lớp và phân lớp nhất định của các kháng thể. Các kháng thể này có bán trên thị trường. Lớp và phân lớp có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp ELISA, kỹ thuật thấm tách Western và các phương pháp khác. Theo phương án khác, lớp và phân lớp này có thể được xác định bằng cách giải trình tự toàn bộ hoặc một phần của các miền ổn định chuỗi nhẹ và/hoặc

chuỗi nặng của kháng thể, so sánh các trình tự axit amin của nó với các trình tự axit amin đã biết của các lớp và phân lớp khác nhau của globulin miễn dịch và xác định lớp và phân lớp của các kháng thể.

Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "hỗn hợp kháng thể đơn dòng" để chỉ chế phẩm của các phân tử kháng thể của một hỗn hợp phân tử duy nhất. Hỗn hợp kháng thể đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu và ái lực gắn kết đơn lẻ đối với epitop kháng nguyên cụ thể.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể của người" được dự định bao gồm các kháng thể chứa vùng biến đổi trong đó cả khung và CDR có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Hơn nữa, nếu kháng thể này chứa vùng ổn định, vùng ổn định này cũng có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch mầm của người.

Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bằng trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, sự đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí hoặc ngẫu nhiên *in vitro* hoặc sự đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể của người" không dự định bao gồm các kháng thể trong đó trình tự vùng CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác, chẳng hạn như chuột, được ghép vào các trình tự vùng khung của người.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng của người" được dùng để chỉ các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết đơn có các vùng biến đổi trong đó cả khung và vùng CDR đều có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Theo phương án, các kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bởi khối tế bào lai bao gồm tế bào B thu được từ động vật chuyển gen không phải người, ví dụ, chuột chuyển gen, có hệ gen chứa gen chuyển chuỗi nặng của người và gen chuyển chuỗi nhẹ của người được dung hợp với tế bào bất tử.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể của người tái tổ hợp" bao gồm tất cả các kháng thể của người được tạo ra, biểu hiện, thiết kế hoặc phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, chẳng hạn như (a) các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) là gen chuyển hoặc chuyển nhiễm sắc thể cho gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó (được mô tả thêm dưới đây), (b) các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể của người, ví

dự, từ thể chuyển nhiễm, (c) các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể của người tổ hợp, tái tổ hợp, và (d) các kháng thể được tạo ra, biểu hiện, thiết kế hoặc phân lập bằng phương pháp bất kỳ liên quan đến việc ghép các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác. Các kháng thể của người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi trong đó các vùng khung và vùng CDR có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, các kháng thể của người tái tổ hợp này có thể được gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi gen chuyển của động vật đối với các trình tự Ig được sử dụng, sự gây đột biến soma) và do đó các trình tự axit amin của vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, trong khi có nguồn gốc từ hoặc liên quan đến các trình tự vùng VH và VL dòng mầm của người, có thể không có trong tự nhiên trong nguồn dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Các cụm từ "kháng thể nhận biết kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu kháng nguyên" được sử dụng thay thế cho nhau với thuật ngữ "kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên".

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biến thể" của kháng thể được dùng để chỉ phân tử có trình tự axit amin khác với trình tự bố-mẹ do việc bổ sung, làm khuyết đoạn và/hoặc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự của kháng thể bố-mẹ. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể biến thể chứa ít nhất một (ví dụ, từ một đến khoảng mười, tốt hơn là 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8) sự bổ sung, làm khuyết đoạn và/hoặc thay thế axit amin trong các vùng CDR của kháng thể bố-mẹ. Sáng chế này xác định tính đồng nhất hoặc tính tương đồng liên quan đến trình tự của một biến thể kháng thể theo tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự kháng thể biến thể giống với các gốc trong kháng thể bố-mẹ sau khi dóng thẳng hàng các trình tự và, nếu cần, cắt ngắn để đạt được trình tự có tỷ lệ phần trăm mức độ giống tối đa. Kháng thể biến thể duy trì khả năng gắn kết với cùng kháng nguyên hoặc tốt hơn là epitop giống như kháng thể bố-mẹ gắn kết với, hoặc tốt hơn là có ít nhất một đặc tính hoặc hoạt tính sinh học lớn hơn kháng thể bố-mẹ. Ví dụ, tốt hơn là kháng thể có ái lực mạnh hơn, thời gian bán hủy dài hơn, nồng độ IC₅₀ thấp hơn hoặc khả năng ức chế hoạt tính sinh học của kháng nguyên tăng lên, so với kháng thể bố-mẹ. Kháng thể biến thể được đặc biệt quan tâm ở đây là kháng thể có hoạt tính sinh học tăng lên ít nhất khoảng 2 lần, tốt hơn là ít nhất khoảng 5 lần, 10 lần hoặc 20 lần so với kháng thể bố-mẹ.

Thuật ngữ "tính đồng nhất" hoặc "tính tương đồng" trong ngữ cảnh trình tự axit nucleic được dùng để chỉ các gốc trong hai trình tự là giống nhau khi được dóng thẳng hàng để tương ứng tối đa. Sự so sánh tính đồng nhất trình tự có thể kéo dài trên chiều dài ít nhất khoảng chín nucleotit, thường là ít nhất khoảng 18 nucleotit, phổ biến hơn là ít nhất khoảng 24 nucleotit, điển hình là ít nhất khoảng 28 nucleotit, điển hình hơn là ít nhất khoảng 32 nucleotit, và tốt hơn là ít nhất khoảng 36, 48 nucleotit hoặc nhiều hơn. Có nhiều thuật toán khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định tính đồng nhất trình tự của nucleotit. Ví dụ, các trình tự polynucleotit có thể được so sánh bằng cách sử dụng thuật toán FASTA, Gap hoặc BESTFIT, là các chương trình trong gói Wisconsin Phiên bản 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA bao gồm, ví dụ, chương trình FASTA2 và FASTA3, cung cấp sự dóng thẳng hàng và tỷ lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự của các vùng trùng lặp tốt nhất giữa các trình tự truy vấn và tìm kiếm (Pearson, *Methods Enzymol* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71-84 (1998)). Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, các thông số mặc định cho chương trình hoặc thuật toán cụ thể được sử dụng. Ví dụ, tỷ lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự giữa các trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán FASTA với các thông số mặc định (kích thước chữ bằng 6 và hệ số NOPAM cho ma trận chấm điểm) hoặc bằng cách sử dụng thuật toán Gap với các thông số mặc định như được cung cấp trong chương trình GCG Phiên bản 6.1.

Thuật ngữ "có tính tương đồng" liên quan đến trình tự polypeptit của kháng thể cần được hiểu là kháng thể có tính đồng nhất trình tự ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn nữa là 90% và tốt nhất là 95% so với trình tự polypeptit. Thuật ngữ liên quan đến trình tự axit nucleic cần được hiểu là trình tự của các nucleotit có tính đồng nhất trình tự ít nhất 85%, tốt hơn là 90%, tốt hơn nữa là 95% và tốt nhất là 97% so với trình tự axit nucleic.

Khi được sử dụng ở đây, kháng thể "bố-mẹ" là kháng thể được mã hóa bằng trình tự axit amin, được sử dụng để thu được biến thể.

Các kháng thể của sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật thiết kế khác nhau, bao gồm sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bao gồm cả việc xáo trộn ADN thu được từ nhiều nguồn khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể được làm cho giống với của người" được dùng để chỉ các kháng thể trong đó các trình tự vùng CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, chẳng hạn như chuột, đã được ghép vào các trình tự khung của người. Các cải biến vùng khung bổ sung có thể được thực hiện trong các trình tự khung cho người như vậy.

Thuật ngữ "kháng thể thể khảm" được dùng để chỉ các kháng thể trong đó các trình tự vùng biến đổi có nguồn gốc từ một loài và các trình tự vùng ổn định có nguồn gốc từ loài khác, chẳng hạn như kháng thể trong đó các trình tự vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể của chuột và các trình tự vùng ổn định có nguồn gốc từ kháng thể của người.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" được dự định để chỉ trường hợp trong đó một thành viên của cặp gắn kết đặc hiệu không gắn kết đáng kể với các phân tử khác với (các) đối tác gắn kết đặc hiệu của nó. Thuật ngữ này cũng có thể áp dụng khi, ví dụ: miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế đặc hiệu với epitop cụ thể được mang bởi nhiều kháng nguyên; trong trường hợp này, kháng thể đặc hiệu chứa miền gắn kết kháng nguyên sẽ có thể gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác nhau mang epitop.

Khi được sử dụng ở đây, kháng thể "gắn kết đặc hiệu với PD-1 của người" được dùng để chỉ kháng thể gắn kết với PD-1 của người với giá trị KD bằng 1×10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-8} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M.

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" hoặc "kháng thể đa đặc hiệu" bao gồm kháng thể có khả năng gắn kết chọn lọc hai hoặc nhiều epitop. Các kháng thể đặc hiệu kép, ví dụ, có thể bao gồm hai phần gắn kết kháng nguyên khác nhau, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với các epitop khác nhau trên các phân tử khác nhau (ví dụ, kháng nguyên) hoặc trên cùng phân tử (ví dụ, trên cùng kháng nguyên). Nếu một kháng thể đặc hiệu kép có thể gắn kết có chọn lọc với hai epitop khác nhau (epitop thứ nhất và epitop thứ hai), ái lực của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất đối với epitop thứ nhất sẽ thường thấp hơn ít nhất một đến hai, hoặc ba, hoặc bốn đơn vị độ lớn so với đơn vị độ lớn của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất của epitop thứ hai và ngược lại. Các epitop được nhận biết bằng kháng thể đặc hiệu kép có thể là các đích giống nhau hoặc khác nhau (ví dụ, trên protein giống nhau hoặc khác

nhau). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách kết hợp các chuỗi nặng nhận biết các epitop khác nhau trên cùng kháng nguyên. Ví dụ, các trình tự nucleic mã hóa các trình tự chuỗi nặng biến đổi nhận biết các epitop khác nhau có thể được dung hợp với các trình tự axit nucleic mã hóa các vùng ổn định của chuỗi nặng khác nhau, và trình tự này có thể được biểu hiện trong tế bào biểu hiện chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Kháng thể đặc hiệu kép điển hình chứa hai chuỗi nặng, mỗi chuỗi bao gồm ba vùng CDR chuỗi nặng theo sau (từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C) là miền CH1, vùng bản lề, miền CH2 và miền CH3, và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch không có tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên nhưng có thể kết hợp với mỗi chuỗi nặng, hoặc có thể kết hợp với mỗi chuỗi nặng và gắn kết một hoặc nhiều epitop được giới hạn bởi các vùng chuỗi nặng gắn kết kháng nguyên hoặc có thể kết hợp với mỗi chuỗi nặng và kích thích sự gắn kết một hoặc cả hai chuỗi nặng với một hoặc cả hai epitop.

Các cụm từ "đặc tính sinh học" hoặc "hoạt tính sinh học", "hoạt tính" hoặc "hoạt tính về mặt sinh học", liên quan đến kháng thể của sáng chế, được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ái lực và tính đặc hiệu của epitop/kháng nguyên, khả năng làm trung hòa hoặc đối kháng hoạt tính của PD-1 *in vivo* hoặc *in vitro*, nồng độ IC50, tính ổn định của kháng thể và đặc tính sinh miễn dịch của kháng thể *in vivo*. Các đặc tính sinh học có thể nhận biết khác của kháng thể bao gồm, ví dụ, khả năng phản ứng chéo, (nghĩa là, với các thể đồng dạng không phải ở người của peptit đích, hoặc với các protein hoặc mô khác nói chung), và khả năng duy trì sự biểu hiện protein ở mức cao trong các tế bào của động vật có vú. Các thuộc tính hoặc đặc điểm nêu trên có thể được quan sát, xác định hoặc đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được công nhận trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm ELISA, ELISA cạnh tranh, sự tương tác kháng thể-kháng nguyên bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng hệ thống BIACORE hoặc KINEXA, hoặc phương pháp đo giao thoa theo lớp sinh học bằng cách sử dụng hệ thống ForteBio, các thử nghiệm làm trung hòa *in vitro* hoặc *in vivo*, không làm giới hạn, gắn kết thụ thể, tạo ra và/hoặc tiết ra xytokin hoặc yếu tố sinh trưởng, tải nạp tín hiệu và nhuộm hóa mô miễn dịch của các lát cắt mô từ nhiều nguồn khác nhau bao gồm cả nguồn từ người, động vật linh trưởng, hoặc nguồn khác bất kỳ.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ức chế" hoặc "làm trung hòa" đối với hoạt

tính của kháng thể theo sáng chế được dự định để chỉ khả năng gần như đối kháng, ngăn chặn, phòng ngừa, hạn chế, làm chậm, làm gián đoạn, loại bỏ, làm ngừng, làm giảm hoặc đảo ngược, ví dụ, sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của yếu tố cần được ức chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hoạt tính sinh học (ví dụ, hoạt tính của PD-1) hoặc đặc tính, bệnh hoặc tình trạng bệnh. Sự ức chế hoặc làm trung hòa hoạt tính của PD-1 dẫn đến sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế với PD-1, tốt hơn là ít nhất khoảng 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc cao hơn.

Phân tử gắn kết PD-1

Sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết có khả năng gắn kết với thụ thể PD-1 của người chứa trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 75% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3.

Theo một số phương án, chuỗi nặng (HC) của kháng thể kháng PD1 có mức độ giống ít nhất 60% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 60%, 70% hoặc 80% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, chuỗi nặng (HC) của kháng thể kháng PD1 có mức độ giống ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo phương án cụ thể, chuỗi HC chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

Theo một số phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD1 chứa trình tự axit amin của vùng CDR1 chuỗi nhẹ (L-CDR1) nêu trong SEQ ID NO: 4, trình tự axit amin của vùng CDR2 chuỗi nhẹ (L-CDR2) nêu trong SEQ ID NO: 5, trình tự axit amin của vùng CDR3 chuỗi nhẹ (L-CDR3) nêu trong SEQ ID NO: 6, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể PD1 chứa các trình tự axit amin vùng L-CDR1, L-CDR2 và L-CDR3 được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD1 chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có mức độ giống ít nhất 60% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 60%, 70%, hoặc 80% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD1 chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có mức độ giống ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án cụ thể, miền VL chứa hoặc gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, chuỗi nhẹ (LC) của kháng thể kháng PD1 có mức độ giống ít nhất 60% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 60%, 70% hoặc 80% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ (LC) của kháng thể PD1 có mức độ giống ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, ví dụ, có mức độ giống ít nhất 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo phương án cụ thể, miền VL chứa hoặc gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10.

Nhóm phân tử gắn kết thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở đây có thể được chuyển sang nhóm hoặc phân nhóm khác. Theo một khía cạnh của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa vùng VL hoặc VH được phân lập bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này sao cho nó không bao gồm các trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi CL hoặc CH. Các phân tử axit nucleic mã hóa vùng VL hoặc VH được liên kết khi hoạt động với trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi CL hoặc CH, tương ứng, từ nhóm phân tử globulin miễn dịch khác. Điều này có thể đạt được bằng cách sử dụng vector hoặc phân tử axit nucleic chứa chuỗi CL hoặc CH, như đã mô tả ở trên. Ví dụ, phân tử gắn kết ban đầu là IgM có thể được chuyển sang nhóm IgG. Hơn nữa, sự chuyển nhóm có thể được sử dụng để chuyển đổi một phân tử IgG thành phân tử khác, ví dụ, từ IgG1 thành IgG2. Phương pháp làm ví dụ để tạo ra phân tử gắn kết của sáng chế với isotyp mong muốn bao gồm bước phân lập phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của phân tử gắn kết và phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của phân tử gắn kết, để thu được miền biến đổi của chuỗi nặng, gắn miền biến đổi của chuỗi nặng này với miền ổn định của chuỗi nặng của isotyp mong muốn, biểu hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đã gắn trong một tế bào, và thu được phân tử gắn kết với isotyp mong muốn.

Phân tử gắn kết theo sáng chế có thể là phân tử IgG, IgM, IgE, IgA hoặc IgD, nhưng thường là isotyp IgG, ví dụ, IgG1, IgG2a hoặc b, IgG3 hoặc IgG4 của phân tử IgG. Theo phương án, phân tử gắn kết là kháng thể IgG1 của phân tử IgG.

Trong một phương án, phân tử gắn kết có thể chứa ít nhất một đột biến trong vùng Fc. Nhiều đột biến Fc khác nhau là đã biết, trong đó các đột biến này tạo ra chức năng hiệu ứng bị thay đổi. Ví dụ, trong nhiều trường hợp, mong muốn là làm giảm

hoặc loại bỏ các chức năng hiệu ứng, ví dụ, trong đó sự tương tác của phối tử-thụ thể là không mong muốn hoặc trong trường hợp các thể liên hợp kháng thể-dược chất. Các vị trí vùng Fc của axit amin, có thể được đột biến theo cách có lợi để làm giảm chức năng hiệu ứng, bao gồm một hoặc nhiều vị trí 228, 233, 234 và 235, trong đó các vị trí axit amin được đánh số theo sơ đồ đánh số Kabat. Theo một số phương án, phân tử gắn kết chứa vùng Fc của ít nhất một đột biến làm giảm ADCC và/hoặc CDC, so với cùng phân tử gắn kết mà không có sự đột biến.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết của sáng chế có thể là một phần của phân tử adhesin miễn dịch lớn hơn được tạo ra bằng cách kết hợp cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị của kháng thể hoặc phần kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit khác. Ví dụ về các phân tử adhesin miễn dịch như vậy bao gồm việc sử dụng vùng nhân streptavidin để tạo ra phân tử scFv dạng tetrame (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) và sử dụng gốc cysteine, peptit đánh dấu và đuôi polyhistidin ở đầu tận cùng C để tạo ra các phân tử scFv hóa trị hai và được biotinyl hóa (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Các ví dụ khác bao gồm một hoặc nhiều vùng CDR từ kháng thể được kết hợp vào phân tử theo cách cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị để tạo ra adhesin miễn dịch gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên quan tâm. Theo các phương án như vậy, vùng CDR có thể được kết hợp dưới dạng một phần của chuỗi polypeptit lớn hơn, có thể được liên kết cộng hóa trị với chuỗi polypeptit khác, hoặc có thể được kết hợp không cộng hóa trị.

Theo phương án khác, kháng thể dung hợp hoặc adhesin miễn dịch có thể được tạo ra để chứa toàn bộ hoặc một phần của phân tử gắn kết theo sáng chế được liên kết với polypeptit khác. Theo một số phương án, chỉ các vùng biến đổi của phân tử gắn kết được liên kết với polypeptit. Theo một số phương án, miền VH của phân tử gắn kết được liên kết với polypeptit thứ nhất, trong khi miền VL của phân tử gắn kết được liên kết với polypeptit thứ hai kết hợp với polypeptit thứ nhất theo cách trong đó các miền VH và VL có thể tương tác với nhau để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên. Theo phương án được ưu tiên khác, miền VH được ngăn cách với miền VL bằng nhóm liên kết sao cho miền VH và VL có thể tương tác với nhau (ví dụ, các kháng thể chuỗi đơn). Sau đó, kháng thể VH-nhóm liên kết-VL được liên kết với polypeptit quan tâm. Hơn nữa, các kháng thể dung hợp có thể được tạo ra trong đó hai (hoặc nhiều) kháng thể chuỗi đơn được liên kết với nhau. Điều này là hữu ích nếu muốn

thiết kế kháng thể có hai hóa trị hoặc đa hóa trị trên chuỗi polypeptit đơn, hoặc nếu muốn thiết kế các kháng thể đa đặc hiệu.

Để thiết kế kháng thể chuỗi đơn (scFv), các mảnh ADN mã hóa vùng VH và VL được liên kết khi hoạt động với mảnh khác mã hóa nhóm liên kết linh hoạt, ví dụ, mã hóa trình tự axit amin (Gly4-Ser)3 sao cho các trình tự vùng VH và VL có thể được biểu hiện dưới dạng protein chuỗi đơn tiếp giáp với các miền VL và VH được liên kết bằng nhóm liên kết linh hoạt. Ví dụ, xem tài liệu: Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); và McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990). Kháng thể chuỗi đơn có thể có hóa trị một, nếu chỉ một miền VH và VL được sử dụng, có hóa trị hai, nếu hai miền VH và VL được sử dụng, hoặc có đa hóa trị, nếu có nhiều hơn hai miền VH và VL được sử dụng.

Phân tử gắn kết của sáng chế có thể được dẫn xuất hóa hoặc liên kết với phân tử khác (ví dụ, peptit hoặc protein khác). Nói chung, các phân tử gắn kết (ví dụ, các kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên của chúng) được dẫn xuất hóa sao cho sự gắn kết PD-1 không bị ảnh hưởng bất lợi do sự dẫn xuất hóa hoặc đánh dấu. Do đó, các phân tử gắn kết của sáng chế có thể bao gồm cả dạng phân tử gắn kết nguyên vẹn và được cải biến được mô tả ở đây. Ví dụ, phân tử gắn kết của sáng chế có thể được liên kết về mặt chức năng (nhờ sự liên hợp hóa học, sự dung hợp di truyền, sự kết hợp không cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử, chẳng hạn như kháng thể khác, tác nhân phát hiện, tác nhân được phẩm, và/hoặc protein hoặc peptit có thể làm trung gian cho sự kết hợp của phân tử gắn kết với phân tử khác (chẳng hạn như vùng nhân streptavidin hoặc đuôi polyhistidin).

Một loại phân tử gắn kết được dẫn xuất hóa được tạo ra bằng cách tạo liên kết ngang của hai hoặc nhiều kháng thể (thuộc loại giống nhau hoặc khác nhau, ví dụ, để thiết kế các kháng thể đặc hiệu kép). Các nhóm liên kết ngang thích hợp bao gồm các nhóm liên kết có hai nhóm chức khác loại, có hai nhóm có khả năng phản ứng khác nhau được ngăn cách bằng nhóm đệm thích hợp (ví dụ: este m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide) hoặc các nhóm liên kết có hai nhóm chức cùng loại (ví dụ, disuccinimidyl suberate).

Phân tử gắn kết của sáng chế cũng có thể được dẫn xuất hóa bằng nhóm hóa học như polyetylen glycol (PEG), nhóm methyl hoặc ethyl, hoặc nhóm hydrat cacbon.

Các nhóm này có thể hữu ích để cải thiện các đặc điểm sinh học của phân tử gắn kết, ví dụ, để làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh.

Phân tử gắn kết của sáng chế cũng có thể được đánh dấu. Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "nguyên tử đánh dấu" hoặc "được đánh dấu" để chỉ sự kết hợp của phân tử khác trong một phân tử gắn kết. Theo một phương án, nguyên tử đánh dấu là gen đánh dấu có thể phát hiện, ví dụ, sự kết hợp của axit amin có hoạt tính phóng xạ hoặc sự gắn các mảnh biotinyl vào polypeptit, và các mảnh này có thể được phát hiện bằng avidin được đánh dấu (ví dụ, streptavidin chứa gen đánh dấu phát huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym có thể được phát hiện bằng kỹ thuật quang học hoặc so màu). Theo phương án khác, nguyên tử đánh dấu hoặc gen đánh dấu có thể là chất điều trị, ví dụ, thể liên hợp được chất hoặc độc tố. Nhiều phương pháp đánh dấu polypeptit và glycoprotein khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng. Ví dụ về các nguyên tử đánh dấu cho polypeptit bao gồm các chất sau đây, ngoài các chất khác: các đồng vị phóng xạ hoặc đồng vị có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), nguyên tử đánh dấu phát huỳnh quang (ví dụ, FITC, rodamin, lanthanit phosphor), các nguyên tử đánh dấu là enzym (ví dụ: peroxidaza của cây củ cải cay, β -galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), các chất đánh dấu phát quang hóa học, nhóm biotinyl, các epitop polypeptit được xác định trước đã được công nhận bởi người báo cáo thứ cấp (ví dụ: các trình tự của cặp khoá kéo leuxin, các vị trí gắn kết cho kháng thể thứ cấp, các miền gắn kết kim loại, đuôi epitop), các chất có từ tính, chẳng hạn như gadolini chelat, các độc tố như độc tố pertussis, taxol, xytochalsin, gramixidin D, ethidi bromua, emetin, mitomycin, etoposid, tenoposid, vincristin, vinblastin, colchixin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dion, mitoxantron, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosteron, glucocorticoid, procain, tetracain, lidocain, propranolol, và puromycin và các chất tương tự hoặc thể đồng dạng của chúng. Theo một số phương án, các nguyên tử đánh dấu được gắn bằng các nhánh của nhóm đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm năng.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết của sáng chế có thể có mặt ở dạng trung tính (bao gồm cả các dạng ion lưỡng tính) hoặc dưới dạng các hợp chất mang điện tích dương hoặc âm. Theo một số phương án, các kháng thể có thể được tạo phức với ion đối để tạo thành muối được dùng.

Thuật ngữ “muối được dụng” được dùng để chỉ phức hợp chứa một hoặc nhiều phân tử gắn kết và một hoặc nhiều ion đối, trong đó các ion đối này có nguồn gốc từ các axit và bazơ vô cơ và hữu cơ được dụng.

Các bazơ vô cơ được dụng bao gồm các ion kim loại bao gồm, ngoài các chất khác, các muối kim loại kiềm thích hợp, các muối kim loại kiềm thổ và các ion sinh lý khác của các kim loại chấp nhận được. Các muối có nguồn gốc từ bazơ vô cơ bao gồm các muối nhôm, amoni, canxi, coban, nickel, molybden, vanadi, mangan, crom, selen, thiếc, đồng, sắt, liti, magie, mangan (III) hoặc mangan (II), kali, rubidi, natri và kẽm, và trong các hóa trị điển hình của chúng.

Các muối cộng axit được dụng của các phân tử gắn kết theo sáng chế có thể được điều chế từ các axit sau đây bao gồm, ngoài các axit khác, axit fomic, axit axetic, axit axetamidobenzoic, axit adipic, axit ascorbic, axit boric, axit propionic, axit benzoic, axit camphoric, axit cacbonic, axit xyclamic, axit dehydrocholic, axit malonic, axit edetic (etylendiamintetraaxetic), axit etylsulfuric, axit fendizoic, axit metaphosphoric, axit succinic, axit glycolic, axit gluconic, axit lactic, axit malic, axit tartaric, axit tanic, axit xitric, axit nitric, axit glucuronic, axit maleic, axit folic, axit fumaric, axit pyruvic, axit aspartic, axit glutamic, axit clohydric, axit bromhydric, axit hydroiodic, lysin, axit isoxitric, axit trifloaxetic, axit pamoic, axit anthranilic, axit mesylic, axit orotic, axit oxalic, axit oxalaxetic, axit oleic, axit stearic, axit salixylic, axit aminosalixylic, silicat, axit p-hydroxybenzoic, axit nicotinic, axit phenylaxetic, axit mandelic, axit embonic, axit sulfonic, axit metansulfonic, axit phosphoric, axit phosphonic, axit etansulfonic, axit etandisulfonic, amoni, axit benzensulfonic, axit pantothenic, axit naphtalensulfonic, axit toluensulfonic, axit 2-hydroxyetansulfonic, axit sulfanilic, axit sulfuric, axit nitric, axit nitơ, este monometyl của axit sulfuric, axit xyclohexylaminosulfonic, axit β -hydroxybutyric, glyxin, glyxylglyxin, cacodylat, diaminohexanoic, camphorsulfonic, thioxyanic, oxoglutaric, pyridoxal 5-phosphat, axit clorophenoxyaxetic, axit undecanoic, axit N-axetyl-L-aspartic, axit galactaric và axit galacturonic.

Các bazơ hữu cơ được dụng bao gồm trimetylamin, dietylamin, N,N-dibenzyletylendiamin, cloprocain, cholin, dibenzylamin, dietanolamin, etylendiamin, meglumin (N-metylglucamin), procain, các amnin mạch vòng, các cation amoni bậc bốn, arginin, betain, cafein, clemizol, 2-ethylaminoetanol, 2-diethylaminoetanol, 2-

dimetylaminooetanol, etandiamin, butylamin, etanolamin, etylendiamin, N-etylmorpholin, N-etylpiperidin, etylglucamin, glucamin, glucosamin, histidin, hydrabamin, imidazol, isopropylamin, metylglucamin, morpholin, piperazin, pyridin, pyridoxin, neodymi, piperidin, nhựa polyamin, procain, purin, theobromin, trietylamin, tripropylamin, trietanolamin, trometamin, metylamin, taurin, cholat, 6-amino-2-metyl-2-heptanol, 2-amino-2-metyl-1,3-propandiol, 2-amino-2-metyl-1-propanol, axit béo mono- và dicacboxylic, axit alkanoic được thế phenyl, axit alkanoic hydroxy, axit thom, axit sulfonic béo và thom, stronti, trixin, hydrazin, phenylxyclohexylamin, axit 2-(N-morpholino) etansulfonic, bis (2-hydroxyetyl) amino-tris (hydroxymetyl) metan, axit N-(2-axetamido)-2-aminoetansulfonic, axit 1,4 piperazindietansulfonic, axit 3-morpholino-2-hydroxypropanesulfonic, 1,3-bis[tris (hydroxymetyl) metylamino] propan, axit 4-morpholinpropanesulfonic, axit 4-(2-hydroxyetyl) piperazin-1-etansulfonic, axit 2-[(2-hydroxy-1,1-bis (hydroxymetyl) etyl) amino] etansulfonic, axit N,N-bis (2-hydroxyetyl)-2-aminoetansulfonic, axit 4-(N-morpholino) butansulfonic, axit 3-(N,N-bis [2-hydroxyetyl] amino)-2-hydroxy propanesulfonic, axit 2-hydroxy-3-[tris (hydroxymetyl) metylamino] -1-propansulfonic, axit 4-(2-hydroxyetyl) piperazin-1- (2-hydroxypropan sulfonic), piperazin-1,4-bis (axit 2-hydroxypropansulfonic) dihydrat, axit 4-(2-hydroxyetyl) -1-piperazinpropansulfonic, N,N-bis (2-hydroxyetyl) glyxin, axit N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(4-butansulfonic), axit N-[tris (hydroxymetyl) metyl] -3-aminopropansulfonic, axit N-tris (hydroxymetyl) metyl-4-aminobutaneulfonic, axit N-(1,1-dimetyl-2-hydroxyetyl) -3-amino-2-hydroxy propansulfonic, axit 2-(xyclohexylamino) etansulfonic, axit 3- (xyclohexylamino) -2-hydroxy-1-propanesulfonic, axit 3- (xyclohexylamino) -1-propanesulfonic, axit N- (2-axetamido) iminodixetic, axit 4 - (xyclohexylamino)-1-butansulfonic, N- [tris (hydroxymetyl) metyl] glyxin, 2-amino-2-(hydroxymetyl) -1,3-propandiol và trometamol.

Phân tử axit nucleic và vector

Sáng chế cũng đề cập đến các phân tử axit nucleic, và trình tự mã hóa các phân tử gắn kết của sáng chế được mô tả ở đây. Theo một số phương án, các phân tử axit nucleic khác nhau mã hóa miền thứ nhất và miền thứ hai của trình tự axit amin của phân tử gắn kết. Theo một số phương án, trong đó miền thứ nhất và/hoặc miền thứ hai chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các axit nucleic khác nhau mã hóa trình tự axit amin

chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo các phương án khác, chính phân tử axit nucleic mã hóa các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic có thể mã hóa tổ hợp bất kỳ của các trình tự axit amin (ví dụ, các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) của miền thứ nhất và thứ hai. Theo phương án cụ thể, phân tử axit nucleic có thể mã hóa trình tự axit amin của miền gắn kết thứ nhất và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của miền gắn kết thứ hai, tùy ý bao gồm trình tự bất kỳ của nhóm liên kết peptit để liên kết chúng.

Sự đề cập đến trình tự nucleotit bao gồm cả phần hỗ trợ của nó, trừ khi có quy định khác. Vì vậy, sự đề cập đến axit nucleic có trình tự cụ thể cần được hiểu là trình tự bao gồm cả sợi hỗ trợ của nó với trình tự hỗ trợ của nó. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polynucleotit" có nghĩa là dạng polyme của một trong hai nucleotit có ít nhất 10 bazơ trong chiều dài, hoặc các ribonucleotit, hoặc deoxyribonucleotit hoặc dạng được cải biến của một trong hai loại nucleotit. Thuật ngữ này bao gồm cả dạng sợi đơn và dạng sợi đôi.

Sáng chế cũng đề cập đến các trình tự nucleotit có mức độ giống ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, hoặc 99% với một hoặc nhiều trình tự nucleotit nêu trên hoặc trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 1-10. Theo một số phương án, các trình tự nucleotit có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 4-9. Thuật ngữ "tỷ lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự" trong ngữ cảnh trình tự axit nucleic được dùng để chỉ các gốc trong hai trình tự giống nhau khi được dóng thẳng hàng để tương ứng tối đa. Sự so sánh tính đồng nhất trình tự có thể kéo dài trên ít nhất khoảng chín nucleotit, thường là ít nhất khoảng 18 nucleotit, phổ biến hơn là ít nhất khoảng 24 nucleotit, điển hình là ít nhất khoảng 28 nucleotit, điển hình hơn là ít nhất khoảng 32 nucleotit, và tốt hơn là ít nhất khoảng 36, 48 nucleotit hoặc nhiều hơn. Có nhiều thuật toán khác nhau đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định tính đồng nhất trình tự của nucleotit. Ví dụ, các trình tự polynucleotit có thể được so sánh bằng cách sử dụng các thuật toán FASTA, Gap hoặc BESTFIT, là các chương trình trong gói Wisconsin Phiên bản 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA bao gồm, ví dụ: các chương trình FASTA2 và FASTA3, cung cấp sự dóng thẳng hàng và tỷ lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự của các vùng

trùng lặp tốt nhất giữa trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266: 227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71-84 (1998); các tài liệu này được kết hợp vào đây để tham khảo). Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, các thông số mặc định cho chương trình hoặc thuật toán cụ thể được sử dụng. Ví dụ, tỷ lệ phần trăm tính đồng nhất trình tự giữa các trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán FASTA với các thông số mặc định (kích thước chữ 6 và hệ số NOPAM cho ma trận chấm điểm) hoặc bằng cách sử dụng thuật toán Gap với các thông số mặc định như được cung cấp trong GCG phiên bản 6.1, tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được chọn từ các trình tự SEQ ID NO:1-10. Phân tử axit nucleic cũng có thể chứa tổ hợp bất kỳ của các trình tự nucleotit nêu trên. Theo một phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:4. Theo phương án khác, phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:4 và 6. Theo phương án khác, phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:4, 6 và 16. Theo phương án khác, phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:7. Theo phương án khác, phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:5.

Trong phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây, các phân tử axit nucleic có thể được phân lập.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector thích hợp để biểu hiện trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được mô tả ở đây. Thuật ngữ "vector" được sử dụng ở đây có nghĩa là phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó đã được liên kết với. Theo một số phương án, vector là plasmit, nghĩa là mảnh ADN sợi kép mạch vòng mà các mảnh ADN bổ sung có thể được gắn với. Theo một số phương án, vector là vector của virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được gắn với hệ gen của virus. Theo một số phương án, các vector có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector của vi khuẩn có vị trí sao chép có nguồn gốc từ vi khuẩn và vector của động vật có vú thể bổ sung). Theo các phương án khác, các vector (ví dụ, các vector không phải của động vật có vú thể bổ sung) có thể được đính gắn vào hệ gen của tế bào chủ khi được đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được

sao chép cùng với gen của vật chủ. Hơn nữa, một số vectơ có khả năng định hướng sự biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết với khi hoạt động. Các vectơ này được gọi ở đây là “vectơ biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là ‘vectơ biểu hiện’).

Sáng chế đề cập đến các vectơ chứa phân tử axit nucleic mã hóa trình tự bất kỳ của các trình tự axit amin của phân tử gắn kết hoặc các phần của chúng (ví dụ, trình tự chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các miền gắn kết thứ nhất và/hoặc thứ hai) như được mô tả ở đây. Sáng chế còn đề cập đến các vectơ chứa phân tử axit nucleic mã hóa các protein dung hợp, các kháng thể biến đổi, các mảnh kháng thể và đoạn dò của chúng.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được phân lập từ nguồn bất kỳ để tạo ra phân tử gắn kết hoặc một phần của nó. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được tổng hợp, chứ không phải được phân lập.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic của sáng chế có thể chứa trình tự nucleotit mã hóa miền VH từ miền thứ nhất hoặc miền thứ hai của phân tử gắn kết theo sáng chế, được liên kết trong khung với trình tự nucleotit mã hóa miền ổn định chuỗi nặng từ nguồn bất kỳ. Tương tự, phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể chứa trình tự nucleotit mã hóa miền VL từ vùng thứ nhất hoặc thứ hai của phân tử gắn kết theo sáng chế, được liên kết trong khung với trình tự nucleotit mã hóa miền ổn định chuỗi nhẹ từ nguồn bất kỳ.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, các phân tử axit nucleic mã hóa miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) và/hoặc chuỗi nhẹ (VL) của miền gắn kết thứ nhất hoặc thứ hai có thể được "biến đổi" trong toàn bộ chiều dài của các gen kháng thể. Theo một phương án, các phân tử axit nucleic mã hóa miền VH hoặc VL được biến đổi thành các gen kháng thể dọc theo toàn bộ chiều dài do sự chèn vào vectơ biểu hiện đã mã hóa miền ổn định chuỗi nặng (CH) hoặc miền ổn định chuỗi nhẹ (CL) tương ứng sao cho đoạn VH được liên kết khi hoạt động với (các) đoạn CH trong vectơ và/hoặc đoạn VL được liên kết khi hoạt động với đoạn CL trong vectơ này. Theo phương án khác, các phân tử axit nucleic mã hóa miền VH và/hoặc VL được biến đổi thành các gen kháng thể trong toàn bộ chiều dài do sự liên kết, ví dụ, gắn, phân tử axit nucleic mã hóa miền VH và/hoặc VL với phân tử axit nucleic mã hóa miền CH và/hoặc CL bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Sau đó, các phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trong toàn bộ chiều dài có thể được biểu

thị từ tế bào mà chúng đã được đưa vào.

Các phân tử axit nucleic có thể được sử dụng để biểu hiện lượng lớn các phân tử gắn kết tái tổ hợp. Các phân tử axit nucleic cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể của người, kháng thể được làm cho giống với của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể chuỗi đơn, adhesin miễn dịch, kháng thể hai mảnh, kháng thể được đột biến và dẫn xuất kháng thể, như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, phân tử axit nucleic của sáng chế được sử dụng làm đoạn dò hoặc đoạn mồi của phản ứng PCR cho trình tự kháng thể đặc hiệu. Ví dụ, axit nucleic có thể được sử dụng làm đoạn dò trong kỹ thuật chẩn đoán hoặc đoạn mồi của phản ứng PCR để khuếch đại các vùng ADN có thể được sử dụng, ví dụ, để phân lập các phân tử axit nucleic bổ sung mã hóa các vùng phân tử gắn kết (ví dụ, các miền biến đổi). Theo một số phương án, các phân tử axit nucleic là các oligonucleotit. Theo một số phương án, các oligonucleotit là từ các miền biến đổi ở mức cao của phân tử gắn kết. Theo một số phương án, oligonucleotit mã hóa tất cả hoặc một phần của một hoặc nhiều vùng CDR của phân tử gắn kết theo sáng chế như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, các phân tử axit nucleic và vector có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử gắn kết được đột biến. Các kháng thể có thể được đột biến trong các miền biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của miền gắn kết thứ nhất và/hoặc thứ hai, ví dụ, để thay đổi đặc tính gắn kết của phân tử gắn kết. Ví dụ, sự đột biến có thể được tạo ra trong một hoặc nhiều vùng CDR để làm tăng hoặc giảm giá trị KD của phân tử gắn kết, để làm tăng hoặc giảm giá trị koff, hoặc để làm thay đổi tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể đối với PD-1. Theo phương án khác, một hoặc nhiều đột biến được tạo ra ở gốc axit amin đã được biết là thay đổi so với dòng mầm trong kháng thể tương ứng với miền gắn kết thứ nhất hoặc thứ hai của phân tử gắn kết theo sáng chế. Sự đột biến như vậy có thể được tạo ra trong vùng CDR hoặc vùng khung của miền biến đổi, hoặc trong miền ổn định. Theo phương án được ưu tiên, các đột biến được tạo ra trong miền biến đổi. Theo phương án khác, một hoặc nhiều đột biến được tạo ra ở gốc axit amin đã được biết là thay đổi so với dòng mầm trong vùng CDR hoặc vùng khung của miền biến đổi của phân tử gắn kết theo sáng chế.

Theo phương án khác, (các) vùng khung được đột biến sao cho (các) vùng khung tạo thành có trình tự axit amin của gen dòng mầm tương ứng. Các đột biến này có thể được tạo ra trong vùng khung hoặc miền ổn định để làm gia tăng thời gian bán

hủy thải của phân tử gắn kết. Ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO 00/09560. Sự đột biến trong vùng khung hoặc miền ổn định cũng có thể được tạo ra để làm thay đổi tính sinh miễn dịch của phân tử gắn kết và/hoặc để tạo ra vị trí liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với phân tử khác. Theo sáng chế, phân tử gắn kết có thể có sự đột biến trong một hoặc nhiều vùng CDR hoặc vùng khung bất kỳ của miền biến đổi hoặc trong miền ổn định.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết của sáng chế được biểu hiện bằng cách chèn ADN mã hóa một phần hoặc toàn bộ trình tự của miền gắn kết thứ nhất hoặc thứ hai (ví dụ, các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong đó miền gắn kết chứa trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng), thu được như đã mô tả trên đây, trong các vector biểu hiện sao cho các gen được liên kết khi hoạt động với các trình tự kiểm soát sự biểu hiện cần thiết, như các trình tự kiểm soát sự phiên mã và dịch mã. Các vector biểu hiện bao gồm các plasmit, retrovirus, adenovirus, virus kết hợp adeno (adeno-associated virus: AAV), các virus ở thực vật như virus bệnh đốm ở cây súp lơ, virus bệnh đốm ở cây thuốc lá, cosmit, YAC, episom có nguồn gốc từ EBV, và dạng tương tự. Các phân tử DNA có thể được gắn vào vector sao cho các trình tự kiểm soát sự phiên mã và dịch mã trong vector này thực hiện chức năng dự định của chúng là điều hòa sự phiên mã và dịch mã của ADN. Vector biểu hiện và các trình tự kiểm soát sự biểu hiện có thể được chọn để tương hợp được với tế bào chứa biểu hiện được sử dụng. Các phân tử ADN mã hóa một phần hoặc toàn bộ các trình tự của miền gắn kết thứ nhất và thứ hai (ví dụ, trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó miền gắn kết chứa trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) có thể được đưa vào các vector riêng biệt. Theo một phương án, tổ hợp bất kỳ của các phân tử ADN nêu trên được đưa vào cùng vector biểu hiện. Các phân tử ADN có thể được đưa vào vector biểu hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, phương pháp gắn các vị trí giới hạn bổ trợ trên mảnh gen của kháng thể và vector, hoặc gắn các đầu bằng nếu không có mặt các vị trí giới hạn).

Vector thích hợp là vector mã hóa các trình tự globulin miễn dịch hoàn toàn về mặt chức năng của vùng CH hoặc CL của người, với thao tác ở vị trí giới hạn thích hợp sao cho trình tự vùng VH hoặc VL bất kỳ có thể được chèn vào và biểu hiện một cách dễ dàng, như đã mô tả trên đây. Các gen mã hóa vùng HC và LC trong vector này có thể chứa các trình tự intron dẫn đến tăng tổng hiệu suất protein kháng thể bằng cách làm ổn định mRNA tương ứng. Các trình tự intron nằm ở vùng rìa của các vị trí

cho ghép nối và nhận ghép nối, để xác định xem sự ghép nối ARN sẽ xảy ra hay không. Vị trí của các trình tự intron có thể ở trong vùng biến đổi hoặc vùng ổn định của các chuỗi kháng thể, hoặc ở cả vùng biến đổi và vùng ổn định khi có nhiều intron được sử dụng. Sự kết thúc quá trình polyadenyl hóa và phiên mã có thể xuất hiện ở vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên phía sau vùng mã hóa. Vector biểu hiện tái tổ hợp cũng có thể mã hóa peptit tín hiệu để tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiết ra của chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen của chuỗi kháng thể có thể được tách dòng vào vector sao cho peptit tín hiệu được liên kết trong khung với đầu tận cùng amino của chuỗi globulin miễn dịch. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu của globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (nghĩa là peptit tín hiệu từ protein không phải của globulin miễn dịch).

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể, sự biểu hiện của vector tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang trình tự điều hòa để kiểm soát sự biểu hiện của gen của chuỗi kháng thể trong tế bào chủ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng việc thiết kế vectơ biểu hiện, bao gồm cả sự chọn lọc các trình tự điều hòa, có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn tế bào chủ cần được biến nạp, mức độ biểu hiện của protein mong muốn, v.v.. Các trình tự kiểm soát được ưu tiên để biểu hiện tế bào chủ ở các động vật có vú bao gồm các thành phần của virus để đảm bảo sự biểu hiện ở mức cao của protein trong tế bào của động vật có vú, như các gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường có nguồn gốc từ LTR của retrovirus, virus cự bào (cytomegalovirus: CMV) (như gen khởi đầu/gen tăng cường của virus CMV), virus SV40 ở khỉ (SV40) (như gen khởi đầu/gen tăng cường của virus SV40), adenovirus (ví dụ, adenovirus của gen khởi đầu muộn chính (AdMLP)), polyomavirus và các gen khởi đầu của động vật có vú mạnh như gen khởi đầu của globulin miễn dịch tự nhiên và gen khởi đầu actin. Phần mô tả thêm các thành phần kiểm soát của virus và các trình tự của chúng, ví dụ, xem tài liệu: các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.168.062, 4.510.245 và 4.968.615. Các phương pháp biểu hiện phân tử gắn kết, như các kháng thể ở thực vật, bao gồm cả phần mô tả các gen khởi đầu và vector, cũng như sự biến nạp của thực vật là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.517.529. Các phương pháp biểu hiện polypeptit trong tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nấm, ví dụ, các tế bào nấm men, cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể và trình tự điều hòa, các vector biểu hiện tái tổ hợp của sáng chế có thể mang các trình tự bổ sung, như các trình tự điều hòa sự sao

chép của vector trong các tế bào chủ (ví dụ, nguồn gốc sao chép) và các gen đánh dấu có thể chọn lọc. Gen đánh dấu có thể chọn lọc tạo điều kiện thuận lợi cho sự chọn lọc các tế bào chủ mà vector đã được đưa vào đó (ví dụ, xem các Bảng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.399.216, 4.634.665 và 5.179.017). Ví dụ, thường là gen đánh dấu có thể chọn lọc tạo ra sự kháng lại các chất điều trị, như G418, hygromycin hoặc methotrexat, đến tế bào chủ mà vector đã được đưa vào. Ví dụ, các gen đánh dấu có thể chọn lọc bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) (để sử dụng trong các tế bào chủ dhfr trong khi chọn lọc/khuếch đại bằng metotrexat), gen neo (đối với sự chọn lọc G418), và gen glutamat synthetaza.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự kiểm soát sự biểu hiện" được dùng để chỉ các trình tự polynucleotit cần thiết để tác động đến sự biểu hiện và xử lý trình tự mã hóa mà chúng được gắn vào. Các trình tự kiểm soát sự biểu hiện bao gồm sự khởi mào, sự kết thúc quá trình phiên mã thích hợp, các trình tự của gen khởi đầu và gen tăng cường; các tín hiệu xử lý ARN hiệu quả như tín hiệu ghép nối và tín hiệu polyadenyl hóa; các trình tự làm ổn định mRNA trong bào chất; các trình tự làm gia tăng hiệu quả dịch mã (nghĩa là trình tự liên ứng Kozak); các trình tự làm gia tăng tính ổn định của protein; và nếu muốn, các trình tự làm gia tăng sự tiết protein. Tính chất của các trình tự kiểm soát này khác nhau tùy thuộc vào sinh vật chủ; ở các sinh vật có nhân nguyên thủy, các trình tự kiểm soát này thường bao gồm gen khởi đầu của vị trí gắn kết ribosom, và các trình tự kết thúc phiên mã; ở các sinh vật có nhân chuẩn, các trình tự kiểm soát này thường bao gồm gen khởi đầu và trình tự kết thúc phiên mã. Thuật ngữ "trình tự kiểm soát" được dự định bao gồm ít nhất là tất cả các thành phần mà sự có mặt của chúng là thiết yếu cho sự biểu hiện và xử lý, và cũng có thể bao gồm các thành phần bổ sung mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, các trình tự đoạn dẫn đầu và trình tự của đối tác dung hợp.

Tế bào chủ và phương pháp tạo ra phân tử gắn kết

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra các phân tử gắn kết của sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra các phân tử gắn kết như được định nghĩa ở đây, bao gồm bước đưa tế bào chủ tái tổ hợp có khả năng biểu hiện phân tử gắn kết, nuôi cấy các tế bào chủ này trong điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện của phân tử gắn kết, và phân lập phân tử gắn kết thu được. Các phân tử gắn kết được tạo ra bằng cách biểu hiện trong các tế bào chủ tái tổ hợp

này được gọi ở đây là “các phân tử gắn kết tái tổ hợp”. Trong trường hợp các phân tử gắn kết là kháng thể, chúng được gọi là “kháng thể tái tổ hợp”. Sáng chế còn đề cập đến thể hệ con của các tế bào từ các tế bào chủ này và các phân tử gắn kết thu được theo cách tương tự.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tế bào chủ tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là “tế bào chủ”) được dùng để chỉ tế bào mà vector biểu hiện tái tổ hợp đã được đưa vào đó. Sáng chế đề cập đến các tế bào chủ có thể bao gồm, ví dụ, vector theo sáng chế đã mô tả trên đây. Sáng chế còn đề cập đến các tế bào chủ chứa, ví dụ, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng hoặc các phần gắn kết kháng nguyên của nó, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ hoặc các phần gắn kết kháng nguyên của nó, hoặc cả hai dạng này, của miền gắn kết thứ nhất và/hoặc miền gắn kết thứ hai của phân tử gắn kết theo sáng chế. Cần hiểu rằng “tế bào chủ tái tổ hợp” và “tế bào chủ” được dự định đề cập đến không chỉ tế bào chủ cụ thể mà còn đề cập đến cả thể hệ con của tế bào này. Do các cải biến có thể xuất hiện trong các thể hệ kế tiếp do sự đột biến hoặc do sự ảnh hưởng của môi trường, nên trên thực tế, thể hệ con này có thể không giống với tế bào bố-mẹ, tuy nhiên, các tế bào như vậy vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ “tế bào chủ” khi được sử dụng ở đây.

Các phân tử axit nucleic mã hóa các phân tử gắn kết của sáng chế và các vector chứa phân tử axit nucleic này có thể được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào chủ của động vật có vú, thực vật, vi khuẩn hoặc nấm men thích hợp. Quá trình biến nạp có thể được thực hiện bằng kỹ thuật đã biết bất kỳ để đưa polynucleotit vào tế bào chủ. Các phương pháp để đưa polynucleotit khác loài vào tế bào của động vật có vú là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm phương pháp chuyển nhiễm qua trung gian dextran, phương pháp kết tủa bằng canxi phosphat, phương pháp chuyển nhiễm qua trung gian polybren, phương pháp dung hợp tế bào trần, phương pháp bao nang (các) polynucleotit trong liposom, và phương pháp vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân. Ngoài ra, các phân tử axit nucleic có thể được đưa vào tế bào của động vật có vú bằng vector của virus. Các phương pháp chuyển nhiễm tế bào là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 và 4.959.455. Các phương pháp biến nạp tế bào thực vật là đã được biết rõ trong lĩnh vực này bao gồm, ví dụ, phương pháp biến nạp qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium*, phương pháp biến nạp bằng cách bắn gen, phương pháp tiêm trực

tiếp, phương pháp gây xung điện và phương pháp biến nạp bằng virut. Các phương pháp biến nạp tế bào vi khuẩn và nấm men cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các dòng tế bào của động vật có vú được sử dụng làm vật chủ để biểu hiện là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm nhiều dòng tế bào bắt tử có sẵn từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (ATCC). Các dòng tế bào này bao gồm, ngoài các dòng tế bào khác, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO), tế bào NSO, tế bào SP2, tế bào HEK-293T, tế bào FreeStyle 293 (Invitrogen), tế bào NIH-3T3, tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng sơ sinh (baby hamster kidney: BHK), tế bào thận khỉ xanh châu Phi (COS), tế bào caxinom tế bào gan của người (ví dụ, Hep G2), tế bào A549, và nhiều dòng tế bào khác. Các dòng tế bào đặc biệt ưu tiên được chọn lọc bằng cách xác định xem các dòng tế bào này có sự biểu hiện ở mức cao hay không. Các dòng tế bào khác có thể được sử dụng là dòng tế bào côn trùng, như các tế bào Sf9 hoặc Sf21. Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các phân tử gắn kết được đưa vào các tế bào chủ của động vật có vú, các phân tử gắn kết này được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện các phân tử gắn kết trong các tế bào chủ hoặc, tốt hơn nữa là sự tiết ra phân tử gắn kết vào môi trường nuôi cấy mà trong đó các tế bào chủ được sinh trưởng. Các phân tử gắn kết có thể được hoàn nguyên từ môi trường nuôi cấy này bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn. Các tế bào chủ thực vật bao gồm, ví dụ: giống *Nicotiana*, *Arabidopsis*, bèo tấm, ngô, lúa mì, khoai tây v.v.. Các tế bào chủ của vi khuẩn bao gồm các loài *E.coli* và *Streptomyces*. Các tế bào chủ của nấm men bao gồm *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*.

Ngoài ra, sự biểu hiện của các phân tử gắn kết theo sáng chế từ các dòng tế bào sản sinh có thể được gia tăng bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết. Ví dụ, hệ thống biểu hiện gen glutamin synthetaza (hệ thống GS) là phương pháp chung để làm gia tăng mức độ biểu hiện trong một số điều kiện nhất định. Hệ thống GS được bàn luận trong toàn bộ hoặc một phần nội dung của các Bằng độc quyền sáng chế châu Âu Số EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 và 0 338 841.

Các phân tử gắn kết có thể được biểu hiện bằng các dòng tế bào khác nhau hoặc trong các động vật chuyển gen sẽ có profin glycosyl hóa khác nhau khi so sánh với nhau. Tuy nhiên, tất cả các phân tử gắn kết được mã hóa bằng các phân tử axit

nucleic được mô tả ở đây, hoặc chứa các trình tự axit amin được đề xuất ở đây là một phần của sáng chế, bất kể mức độ glycosyl hóa của các phân tử gắn kết, và nói chung là bất kể sự có mặt hoặc không có mặt của các cải biến sau dịch mã.

Các phân tử gắn kết có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều phương pháp. Ví dụ, các miền gắn kết PD1 có thể được tạo ra theo cách riêng biệt (ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp protein hóa học, kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp, công nghệ tế bào lai, v.v.) và sau đó được gắn kết về mặt hóa học với nhau, theo cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm liên kết. Các phương tiện để liên hợp hóa học các phân tử (ví dụ, các kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên của chúng) là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các polypeptit thường chứa nhiều nhóm chức, chẳng hạn như axit cacboxylic (COOH) hoặc nhóm amin tự do (-NH₂), có khả năng phản ứng với nhóm chức thích hợp của polypeptit hoặc nhóm liên kết tương ứng. Kháng thể cũng có thể được dẫn xuất hóa để tiếp xúc hoặc gắn các nhóm chức có khả năng phản ứng bổ sung và có thể bao gồm sự gắn kết của phân tử bất kỳ trong số nhiều phân tử của nhóm liên kết như các phân tử có sẵn từ Công ty Pierce Chemical Company, Rockford, 111. Các nhóm liên kết được sử dụng trong các phân tử gắn kết của sáng chế có thể là nhóm liên kết bất kỳ trong số các nhóm liên kết thích hợp đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, sự gắn kết của các miền với PD1 được tạo ra bằng cách biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên của chúng trong các tế bào chủ. Các trình tự mã hóa tổ hợp bất kỳ của các miền gắn kết có thể được liên kết (theo cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm liên kết). Các phân tử axit nucleic thu được mã hóa các miền gắn kết với PD-1 được chèn vào các vector biểu hiện và được đưa vào các tế bào chủ. Các phân tử gắn kết thu được sau đó được biểu hiện, phân lập và tinh chế từ hệ biểu hiện.

Theo một số phương án, các miền gắn kết của phân tử gắn kết có thể được kết hợp với nhau bằng phân tử của nhóm liên kết sáng tạo nhằm bảo vệ chống lại sự thoái biến phân giải protein của phân tử gắn kết. Nhóm liên kết như vậy thường không có vị trí phân cắt phân giải protein.

Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “tế bào”, “tế bào chủ”, “dòng tế bào” và “sự nuôi cấy tế bào”, “dòng tế bào là sinh vật tự sản xuất” được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm tế bào riêng biệt hoặc sự nuôi cấy tế bào là thể nhận polynucleotit được phân lập bất kỳ theo sáng chế hoặc vector tái tổ hợp bất kỳ (các vector tái tổ hợp

bất kỳ) chứa trình tự mã hóa vùng HCVR, LCVR hoặc kháng thể đơn dòng của sáng chế. Các tế bào chủ bao gồm thể hệ con của tế bào chủ đơn, và thể hệ con này có thể không nhất thiết phải giống hoàn toàn (về hình thái học hoặc tính hỗ trợ ADN toàn phần) với tế bào bố-mẹ ban đầu do sự đột biến và/hoặc thay đổi tự nhiên, ngẫu nhiên hoặc cố ý. Tế bào chủ bao gồm các tế bào được biến nạp, tải nạp hoặc gây nhiễm bằng vector tái tổ hợp, hoặc kháng thể đơn dòng biểu hiện polynucleotit theo sáng chế hoặc chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của chúng. Tế bào chủ chứa vector tái tổ hợp của sáng chế (hoặc được kết hợp ổn định vào nhiễm sắc thể của vật chủ hoặc không) có thể được gọi là “tế bào chủ tái tổ hợp”. Các tế bào chủ được ưu tiên để sử dụng trong sáng chế là các tế bào CHO (ví dụ, ATCC CRL-9096), các tế bào NS0, các tế bào SP2/0, các tế bào COS (ATCC, ví dụ, CRL-1650, CRL-1651) và HeLa (ATCC CCL- 2). Các tế bào chủ bổ sung để sử dụng trong sáng chế bao gồm các tế bào thực vật, tế bào nấm men, các tế bào của động vật có vú khác và các tế bào không nhân.

Dược phẩm

Thuật ngữ “dược phẩm” được dùng để chỉ dạng bào chế và/hoặc chế phẩm chứa lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế cùng với các tá dược (chất pha loãng, chất dẫn thuốc, dung môi và các tá dược khác).

Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng ở đây để mô tả thành phần bất kỳ không phải (các) hợp chất của sáng chế. Sự lựa chọn các tá dược phụ thuộc phần lớn vào các yếu tố như kỹ thuật sử dụng cụ thể, hiệu quả của tá dược đối với độ tan và tính ổn định, và tính chất của dạng liều dùng. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tá dược được dụng” bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, các chất nhân kháng khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thụ và các chất tương hợp được về mặt sinh lý tương tự. Ví dụ về các tá dược được dụng nêu trên là nước, nước muối sinh lý, chất đệm phosphate, dextroza, glyxerol, etanol v.v. và các tổ hợp của chúng. Nó thường được ưu tiên bổ sung vào các chất đẳng trương của chế phẩm, ví dụ, các đường, rượu đa chức, chẳng hạn như manitol hoặc sorbitol hoặc natri clorua. Các ví dụ khác của tá dược được dụng là các chất thấm ướt hoặc lượng nhỏ các chất phụ trợ, như chất làm ẩm và chất nhũ hoá, chất bảo quản hoặc chất đệm sẽ làm gia tăng thời gian bảo quản và hiệu quả của kháng thể.

Kháng thể của sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân (xem Ví dụ 17). Các kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng

một mình hoặc kết hợp với chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dùng, theo một hoặc nhiều liều. Các dược phẩm để sử dụng được thiết kế phù hợp với chế độ sử dụng lựa chọn, và các chất pha loãng, chất mang và/hoặc tá dược được dùng, chẳng hạn như các chất phân tán, chất đệm, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất hòa tan, chất đẳng trương, chất ổn định và chất tương tự được sử dụng khi thích hợp (xem Ví dụ 17). Các chế phẩm nêu trên được thiết kế theo các kỹ thuật thông thường như trong tài liệu: Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, tài liệu này cung cấp các kỹ thuật khác nhau để thu được các chế phẩm thường là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng kháng PD-1 của sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển bất lợi hoặc bệnh lý như được mô tả ở đây bằng cách sử dụng các kỹ thuật sử dụng tiêu chuẩn, bao gồm sử dụng qua đường miệng, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, dưới da, phổi, qua chân bì, trong cơ, trong mũi, qua má, miệng, dưới lưỡi, hoặc thuốc đạn.

Tốt hơn là dược phẩm của sáng chế chứa hoặc là “lượng có hiệu quả điều trị” của kháng thể theo sáng chế. Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” được dùng để chỉ lượng có hiệu quả, với liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể có thể thay đổi tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính và cân nặng của đối tượng và khả năng của kháng thể hoặc một phần của nó tạo ra đáp ứng mong muốn ở đối tượng. Lượng có hiệu quả điều trị cũng là lượng mà trong đó tác dụng gây độc hoặc bất lợi bất kỳ của kháng thể được vượt trội so với tác dụng có lợi về mặt điều trị. Thuật ngữ “lượng hiệu quả phòng bệnh” được dùng để chỉ lượng có hiệu quả, với liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn. Do liều phòng bệnh được kê đơn cho các đối tượng trước hoặc ở giai đoạn đầu của bệnh, thường là lượng có hiệu quả phòng bệnh có thể ít hơn lượng có hiệu quả điều trị.

Lượng có hiệu quả điều trị hoặc lượng có hiệu quả phòng bệnh ít nhất là liều có lợi ích điều trị tối thiểu có lợi nhỏ hơn liều có độc tính của chất có hoạt tính. Mặt khác, lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế là lượng làm giảm hoạt tính sinh học của PD-1 ở động vật có vú, tốt hơn là người.

Đường sử dụng của kháng thể theo sáng chế có thể là qua đường miệng, ngoài

đường tiêu hóa, đường hít hoặc khu trú. Tốt hơn là các kháng thể của sáng chế có thể được đưa vào được phẩm chấp nhận được để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ngoài đường tiêu hóa” bao gồm sử dụng qua đường trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, đường trực tràng, âm đạo hoặc trong màng bụng. Việc sử dụng qua đường trong tĩnh mạch, trong màng bụng hoặc dưới da là các đường sử dụng được ưu tiên. Các chất mang được dùng dùng để tiêm là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Như được mô tả trong các hướng dẫn thích hợp, các dược phẩm sẽ vô khuẩn và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản trong đồ chứa, được cung cấp, ví dụ, bằng lọ nhỏ được bịt kín (ampun) hoặc bơm tiêm. Do đó, các dược phẩm có thể được khử khuẩn bằng cách lọc sau khi bào chế dược phẩm, hoặc có thể được tạo thành dạng thích hợp về mặt vi sinh bằng kỹ thuật khác bất kỳ. Chế phẩm điển hình dùng để tiêm truyền qua đường trong tĩnh mạch có thể bao gồm 250-1000 ml chất lỏng như dung dịch Ringer vô khuẩn, nước muối sinh lý, dung dịch dextroza hoặc dung dịch muối của Hank và liều dùng có hiệu quả điều trị (ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 1-100 mg/ml) của dạng cô đặc của kháng thể. Các liều dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào loại bệnh và mức độ nghiêm trọng. Liều này là đã được biết rõ từ tình trạng của lĩnh vực y tế rằng các liều dùng cho bệnh nhân phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm trọng lượng của bệnh nhân, diện tích bề mặt của cơ thể, độ tuổi, hợp chất cụ thể cần được sử dụng, giới tính, khoảng thời gian và đường sử dụng, tình trạng sức khỏe chung và các loại thuốc được sử dụng đồng thời khác. Liều điển hình có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0,001 đến 1000 μ g; tuy nhiên, các liều dùng thấp hơn và cao hơn so với khoảng minh họa này được dự đoán, đặc biệt là với các thông số nêu trên. Chế độ dùng liều qua đường trong màng bụng hàng ngày có thể nằm trong khoảng từ 0,1 μ g/kg đến 100 μ g/kg tổng trọng lượng của cơ thể, tốt hơn là từ 0,3 μ g/kg đến 10 μ g/kg, và tốt hơn nữa là từ 1 μ g/kg đến 1 μ g/kg, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 10 μ g/kg trọng lượng cơ thể mỗi ngày. Quá trình điều trị có thể được theo dõi bằng cách đánh giá tình trạng sức khỏe của bệnh nhân theo định kỳ. Đối với việc sử dụng được lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng của bệnh nhân, việc điều trị được lặp lại cho đến khi đạt được sự đáp ứng mong muốn hoặc sự ức chế các triệu chứng của bệnh. Tuy nhiên, chế độ dùng liều khác không được mô tả ở đây cũng có thể được áp dụng. Liều dùng mong muốn có thể được sử dụng bằng cách một hoặc nhiều liều lớn

hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục kháng thể tùy thuộc vào mức độ phân hủy được động học mà bác sĩ thực hành mong muốn.

Các đặc tính giả định nêu trên của kháng thể phụ thuộc đáng kể vào quyết định của bác sĩ. Hiệu quả dự định là yếu tố quan trọng để lựa chọn liều và chế độ dùng liều thích hợp. Các yếu tố được xem xét ở đây bao gồm bệnh nhất định cần được điều trị, động vật có vú nhất định được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân nhất định, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí sử dụng kháng thể, loại kháng thể cụ thể, đường sử dụng, chế độ sử dụng và các yếu tố khác đã được biết rõ trong lĩnh vực y học.

Các chất điều trị của sáng chế có thể được đông lạnh hoặc đông khô nhanh và được hoàn nguyên trong chất mang vô khuẩn thích hợp trước khi sử dụng. Việc sấy khô ở nhiệt độ thấp và hoàn nguyên có thể làm giảm hoạt tính của kháng thể. Liều dùng có thể được điều chỉnh để bù đắp tổn thất này. Nói chung, dược phẩm có giá trị độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8 là được ưu tiên.

Ứng dụng trong điều trị của phân tử gắn kết của sáng chế .

Theo một khía cạnh, phân tử gắn kết của sáng chế hữu ích trong việc điều trị các rối loạn có liên quan đến hoạt tính của PD1.

Các thuật ngữ “điều trị”, “việc điều trị” và “sự điều trị” để chỉ phương pháp làm giảm bớt hoặc làm mất rối loạn sinh học và/hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng đi kèm của nó. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “làm giảm bớt” bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh có nghĩa là làm giảm mức độ nặng và/hoặc tần suất xuất hiện các triệu chứng của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh. Ngoài ra, sự đề cập ở đây đến “việc điều trị” bao gồm sự đề cập đến việc điều trị chữa khỏi, làm giảm tạm thời và phòng bệnh.

Theo một khía cạnh, đối tượng là động vật có vú, tốt hơn nếu đối tượng là người. Đối tượng nêu trên có thể là nam hoặc nữ, ở độ tuổi bất kỳ.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” được dùng để chỉ lượng chất điều trị được sử dụng để sẽ làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn được điều trị đến mức độ nhất định.

Các phân tử gắn kết của sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chế phẩm hoặc kháng thể khác (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng). Do đó, các dược phẩm, phương pháp và cách sử dụng theo sáng chế cũng bao gồm các phương án kết hợp (sử dụng đồng thời) với các chất có hoạt tính khác, như dược mô tả

dưới đây.

Khi được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “sử dụng đồng thời”, “được sử dụng đồng thời” và “kết hợp với”, liên quan đến các phân tử gắn kết và một hoặc nhiều chất điều trị khác, được cho là có nghĩa là, để chỉ hoặc bao gồm các đặc điểm sau đây:

việc sử dụng đồng thời tổ hợp như vậy của phân tử gắn kết theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế cùng nhau thành một dạng liều dùng duy nhất, để giải phóng các thành phần này gần như đồng thời vào bệnh nhân nêu trên,

việc sử dụng gần như đồng thời tổ hợp như vậy của phân tử gắn kết theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng rẽ với nhau thành các dạng liều dùng riêng biệt mà được sử dụng gần như đồng thời bởi bệnh nhân nêu trên, khi đó các thành phần nêu trên được giải phóng gần như đồng thời vào bệnh nhân này,

việc sử dụng lần lượt tổ hợp như vậy của phân tử gắn kết theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần này được bào chế riêng rẽ với nhau thành các dạng liều dùng riêng biệt mà được sử dụng liên nhau bởi bệnh nhân nêu trên với khoảng thời gian đáng kể giữa mỗi lần sử dụng, trong đó các thành phần nêu trên được giải phóng ở các thời điểm khác nhau đáng kể vào bệnh nhân này; và

việc sử dụng lần lượt tổ hợp như vậy của phân tử gắn kết theo sáng chế và chất điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, khi các thành phần đó được bào chế cùng nhau thành dạng liều dùng đơn để giải phóng các thành phần này theo cách có kiểm soát, theo đó chúng giải phóng đồng thời, liên tục, hoặc cùng nhau ở các thời điểm giống nhau và/hoặc khác nhau cho bệnh nhân nêu trên, ở đó mỗi phần có thể được sử dụng theo đường giống nhau hoặc khác nhau.

Các phân tử gắn kết của sáng chế có thể được sử dụng mà không cần điều trị liều thêm, nghĩa là dưới dạng liều pháp độc lập. Hơn nữa, việc điều trị bằng các phân tử gắn kết của sáng chế có thể bao gồm ít nhất một phương pháp điều trị trị liệu bổ sung (liệu pháp kết hợp). Theo một số phương án, phân tử gắn kết có thể được sử dụng cùng nhau hoặc được bào chế với thuốc/chế phẩm khác để điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm.

Các dược phẩm chứa phân tử gắn kết theo sáng chế và ít nhất một chất khác (ví dụ, chất ức chế miễn dịch hoặc chất kháng viêm) có thể được sử dụng dưới dạng liều

pháp kết hợp để sử dụng đồng thời, độc lập hoặc liên tục trong việc điều trị rối loạn viêm và rối loạn tự miễn.

Điều này có nghĩa là các phân tử gắn kết theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị như đã mô tả trên đây, có thể được sử dụng trong điều trị như đã mô tả trên đây, và/hoặc có thể được sử dụng trong sản xuất thuốc để điều trị như đã mô tả trên đây.

Liều dùng và đường sử dụng

Phương pháp bất kỳ để sử dụng các peptit, protein hoặc kháng thể được chấp nhận trong lĩnh vực này đều có thể được sử dụng theo cách thích hợp đối với phân tử gắn kết của sáng chế.

Các dược phẩm của sáng chế thường thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sử dụng ngoài đường tiêu hóa” dược phẩm bao gồm bất kỳ sử dụng bất kỳ dược đặc trưng bởi lỗ thủng vật lý của mô đối tượng và sử dụng dược phẩm thông qua lỗ thủng trong mô này, do đó thường dẫn đến việc sử dụng trực tiếp vào dòng máu, vào cơ, hoặc vào cơ quan nội tạng. Vì vậy, việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ngoài các cách khác, việc sử dụng dược phẩm bằng cách tiêm dược phẩm này, bằng cách sử dụng dược phẩm này thông qua vết rạch khi phẫu thuật, bằng cách sử dụng dược phẩm này thông qua vết thương không phải do phẫu thuật để thâm nhập mô, và phương pháp tương tự. Cụ thể, việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa có nghĩa là bao gồm, ngoài các đường khác, việc tiêm hoặc tiêm truyền dưới da, trong màng bụng, trong cơ, trong xương ức, trong tĩnh mạch, trong động mạch, nội tủy mạc, trong tâm thất, trong niệu đạo, trong sọ, tiêm hoặc trong bao hoạt dịch; và kỹ thuật tiêm truyền thẩm tách thận. Việc cung cấp qua đường trong khối u, ví dụ, việc tiêm trong khối u cũng có thể hữu ích. Việc tiêm truyền theo vùng cũng được đề xuất. Các phương án được ưu tiên bao gồm đường sử dụng trong tĩnh mạch và dưới da.

Dạng liều dùng của dược phẩm thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa thường chứa thành phần hoạt tính kết hợp với chất mang dược dụng, chẳng hạn như nước vô khuẩn hoặc nước muối đẳng trương vô khuẩn. Các dạng liều dùng này có thể được bào chế, đóng gói, hoặc bán ở dạng thích hợp cho việc sử dụng liều lớn hoặc để sử dụng liên tục. Dạng bào chế dùng để tiêm có thể được bào chế, bao gói hoặc bán ở dạng liều dùng thông thường, ví dụ, trong ampun hoặc trong các đồ chứa đa liều có

chứa chất bảo quản. Các dạng bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm, ngoài các dạng khác, huyền phù, dung dịch, nhũ tương trong dầu hoặc dung dịch chất nền, bột nhão, và dạng tương tự. Các dạng liều dùng này có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần bổ sung, ngoài các thành phần khác, chất tạo huyền phù, chất ổn định hoặc chất phân tán. Theo phương án, chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa chứa thành phần hoạt tính được cung cấp ở dạng khô (dạng bột hoặc dạng hạt) để hoàn nguyên với chất nền thích hợp (ví dụ, nước vô khuẩn không chứa chất gây sốt) trước khi sử dụng chế phẩm đã hoàn nguyên ngoài đường tiêu hóa. Các dạng liều dùng ngoài đường tiêu hóa cũng bao gồm các dung dịch nước có thể chứa các tá dược như muối, hydrat cacbon và chất đệm (tốt hơn là có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9), nhưng đối với một số ứng dụng, chúng có thể được bào chế theo cách thích hợp hơn dưới dạng dung dịch không chứa nước vô khuẩn hoặc dạng khô được sử dụng kết hợp với chất nền thích hợp như nước vô khuẩn không chứa chất gây sốt. Các dạng làm ví dụ để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dung dịch hoặc huyền phù trong dung dịch nước vô khuẩn, ví dụ, dung dịch propylen glycol hoặc dextroza trong nước. Các dạng liều dùng như vậy có thể được đệm, nếu cần. Các dạng liều dùng thích hợp khác để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể bao gồm các dạng chứa thành phần hoạt tính ở vi tinh thể, hoặc trong chế phẩm liposom. Các dạng liều dùng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được bào chế để có chế độ giải phóng tức thì và/hoặc được cải biến. Các dạng liều dùng có sự giải phóng được cải biến bao gồm sự giải phóng được làm chậm, duy trì, theo nhịp, được kiểm soát, hướng đích và theo chương trình.

Ví dụ, theo một khía cạnh, các dung dịch tiêm vô khuẩn có thể được bào chế bằng cách kết hợp ít nhất một phân tử gắn kết với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một thành phần hoặc dạng kết hợp của các thành phần đã liệt kê trên đây, nếu cần, sau đó khử khuẩn bằng cách lọc. Các hệ phân tán thường được bào chế bằng cách kết hợp hợp chất có hoạt tính vào dung môi vô khuẩn chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác từ các thành phần đã liệt kê trên đây. Trong trường hợp bột vô khuẩn để bào chế dung dịch tiêm vô khuẩn, phương pháp bào chế là sấy khô ở nhiệt độ thấp (đông khô nhanh) để tạo ra bột của thành phần hoạt tính cùng với thành phần mong muốn bổ sung nào bất kỳ từ dung dịch đã lọc vô khuẩn trước đó của nó. Độ chảy thích hợp của dung dịch có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ như lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt cần thiết trong

trường hợp hệ phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Sự hấp thu kéo dài của các chế phẩm dạng tiêm có thể được tạo ra bằng cách kết hợp chế phẩm chất làm chậm hấp thu vào chế phẩm này, ví dụ, monostearat và gelatin, và/hoặc bằng cách sử dụng lớp phủ có sự giải phóng được cải biến (ví dụ, lớp phủ giải phóng chậm).

Các phân tử gắn kết của sáng chế cũng có thể được sử dụng qua đường trong mũi hoặc bằng cách hít, thường ở dạng bột khô (một mình, ở dạng hỗn hợp, hoặc ở dạng các hạt chứa các thành phần đã trộn lẫn, ví dụ, được trộn với tá dược được dùng thích hợp) từ ống hít bột khô, chẳng hạn như đồ chứa khí dung được gia áp, máy bơm, dụng cụ phun, dụng cụ phun mù (tốt hơn là dụng cụ phun mù sử dụng đặc tính điện động lực học để tạo ra sương mù), hoặc máy khí dung, trong đó chất đẩy thích hợp được sử dụng hoặc không được sử dụng, hoặc dưới dạng thuốc nhỏ mũi.

Đồ chứa được gia áp, bơm, dụng cụ phun, dụng cụ phun mù, hoặc máy khí dung thường chứa dung dịch hoặc huyền phù của phân tử gắn kết của sáng chế bao gồm, ví dụ, chất thích hợp để phân tán, hoàn nguyên hoặc giải phóng kéo dài của chất có hoạt tính, chất đẩy làm dung môi.

Trước khi sử dụng dưới dạng bột khô hoặc huyền phù, chế phẩm thuốc thường được micron hóa thành kích thước thích hợp để phân phối bằng cách hít (thường là nhỏ hơn 5 micron). Điều này có thể đạt được bằng kỹ thuật nghiền thích hợp bất kỳ, chẳng hạn như phương pháp nghiền dùng tia phun dạng xoắn, phương pháp nghiền dùng tia phun kiểu tầng sôi, phương pháp xử lý chất lỏng siêu tới hạn để tạo ra các hạt nano, làm đồng nhất ở áp suất cao, hoặc sấy phun.

Viên nang, vỉ và hộp để sử dụng trong dụng cụ hít hoặc dụng cụ bơm có thể được bào chế để chứa hỗn hợp dạng bột của hợp chất theo sáng chế, chất nền dạng bột thích hợp và dụng cụ điều chỉnh hiệu suất.

Dạng bào chế là dung dịch thích hợp để sử dụng trong dụng cụ phun mù bằng cách sử dụng đặc tính điện động lực học để tạo ra sương mù có thể chứa liều dùng thích hợp của phân tử gắn kết theo sáng chế cho mỗi lần đẩy và thể tích đẩy có thể thay đổi, ví dụ, từ 1μl đến 100μl.

Các chất tạo hương vị thích hợp, như menthol và levomenthol, hoặc chất tạo ngọt, chẳng hạn như sacarin hoặc natri sacarin, có thể được bổ sung vào các dạng liều dùng này của sáng chế dùng để sử dụng bằng cách hít/quá đường trong mũi.

Dạng liều dùng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được bào chế để có sự

giải phóng tức thì và/hoặc được cải biến. Các dạng bào chế có sự giải phóng được cải biến bao gồm sự giải phóng được làm chậm, duy trì, theo nhịp, được kiểm soát, hướng đích và theo lập trình.

Trong trường hợp dụng cụ khí và khí dung chứa bột khô, đơn vị liều được xác định bằng phương tiện là van cung cấp lượng theo định lượng. Các đơn vị liều theo sáng chế thường được sắp xếp để sử dụng liều theo định lượng hoặc “đẩy” phân tử gắn kết của sáng chế. Tổng liều dùng hàng ngày sẽ thường được sử dụng theo một liều hoặc, thường xuyên hơn, dưới dạng các liều chia nhỏ trong cả ngày.

Các phân tử gắn kết của sáng chế cũng có thể được bào chế dưới dạng liều dùng để sử dụng qua đường miệng. Việc sử dụng qua đường miệng có thể bao gồm việc nuốt, sao cho hợp chất đi vào đường dạ dày-ruột, và/hoặc sử dụng qua đường trong má, lưỡi hoặc dưới lưỡi mà nhờ đó hợp chất đi vào dòng máu trực tiếp từ miệng.

Các dạng liều thích hợp để sử dụng qua đường miệng bao gồm các hệ dạng rắn, nửa rắn và lỏng như viên nén; viên nang mềm hoặc cứng chứa nhiều hạt nano hoặc hạt nano, chất lỏng hoặc bột; viên ngậm (kể cả chất lỏng bên trong); viên nhai; gel; dạng liều phân tán nhanh; màng; viên trứng; dạng xịt; và các miếng dán ở má/niêm mạc.

Các dạng liều là chất lỏng bao gồm các huyền phù, dung dịch, sirô và cốm ngọt. Các dạng liều này có thể được sử dụng dưới dạng tá dược trong viên nang cứng hoặc mềm (ví dụ, được làm từ gelatin hoặc hydroxypropylmetylxenluloza) và thường chứa chất mang, ví dụ, nước, etanol, polyetylen glycol, propylen glycol, metyloxenluloza, hoặc dầu thích hợp, và một hoặc nhiều chất nhũ hóa và/hoặc các tạo huyền phù. Các liều là chất lỏng cũng có thể được bào chế bằng cách hoàn nguyên chất rắn, ví dụ, từ gói.

Các phân tử gắn kết của sáng chế sẽ được sử dụng với lượng có hiệu quả trong việc điều trị tình trạng bệnh cần điều trị, nghĩa là với liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, và việc các phân tử gắn kết được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều kỹ thuật điều trị kháng bệnh tự miễn hoặc kháng viêm bổ sung hay không.

Chế độ dùng liều có thể được điều chỉnh để tạo ra mức độ đáp ứng tối ưu. Ví dụ, một liều lớn có thể được sử dụng, vài liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời

gian hoặc liều dùng này có thể được giảm đi hoặc tăng lên tương ứng như được chỉ định theo các tình huống điều trị. Đặc biệt có lợi nếu bào chế được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa theo dạng liều dùng đơn vị để dễ sử dụng và tính đồng đều của liều lượng. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, dạng liều dùng đơn vị được dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều dùng đơn vị cho các bệnh nhân/đối tượng cần được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hợp chất có hoạt tính được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dùng mong muốn. Tiêu chuẩn kỹ thuật của các dạng liều dùng đơn vị theo sáng chế thường được quyết định theo và phụ thuộc trực tiếp vào (a) các đặc tính đặc biệt của chất hóa trị liệu và tác dụng phòng bệnh hoặc điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực bào chế hợp chất có hoạt tính dùng để điều trị có tính mãn cảm ở các đối tượng.

Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, dựa vào phần mô tả được đưa ra ở đây, các liều dùng và chế độ dùng liều được điều chỉnh theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực điều trị. Điều này có nghĩa là liều được dung nạp tối đa có thể được thiết lập dễ dàng, và lượng hữu hiệu tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn cho bệnh nhân cũng có thể được xác định, do các yêu cầu tạm thời đối với việc sử dụng mỗi chất có thể tạo ra hiệu quả điều trị có thể nhận thấy cho bệnh nhân. Do đó, trong khi liều dùng và chế độ sử dụng nhất định được ví dụ ở đây, các ví dụ này không làm giới hạn các liều dùng và chế độ sử dụng có thể được cung cấp cho bệnh nhân trong khi thực hành các phương án của sáng chế.

Cần lưu ý rằng các giá trị liều dùng có thể thay đổi theo loại và mức độ nặng của tình trạng cần được làm thuyên giảm, và có thể bao gồm một hoặc nhiều liều. Ngoài ra, cần hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ dùng liều cụ thể cần được điều chỉnh theo thời gian tùy theo nhu cầu của đối tượng và sự đánh giá của chuyên gia y tế về việc sử dụng hoặc theo dõi việc sử dụng được phẩm, và các khoảng liều dùng được đưa ra trong bản mô tả này chỉ là ví dụ và không dự định làm giới hạn phạm vi hoặc sự thực hành được phẩm theo sáng chế. Ngoài ra, chế độ dùng liều với các được phẩm theo sáng chế này có thể dựa trên nhiều yếu tố khác nhau bao gồm loại bệnh, độ tuổi, trọng lượng, giới tính, tình trạng sức khỏe bệnh nhân, mức độ nặng của bệnh, đường sử dụng và phân tử gắn kết cụ thể được sử dụng. Do đó, chế độ dùng liều này có thể thay đổi trong khoảng rộng, nhưng có thể được xác định theo cách thông

thường bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, các liều dùng có thể được điều chỉnh dựa trên các thông số dược động học hoặc dược lực học, các thông số này có thể bao gồm các hiệu quả lâm sàng như tác dụng gây độc và/hoặc giá trị trong phòng thí nghiệm. Do đó, sáng chế bao gồm cả sự tăng liều dùng ở bệnh nhân như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp xác định liều dùng và chế độ thích hợp là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ dựa vào các ý tưởng được bộc lộ ở đây.

Ví dụ về các phương pháp sử dụng thích hợp đã đề xuất trên đây.

Chắc chắn là liều dùng thích hợp của phân tử gắn kết theo sáng chế sẽ nằm trong khoảng 0,1 đến 100 mg/kg, bao gồm cả khoảng từ 0,5 đến 50 mg/kg, ví dụ, khoảng từ 1 đến 20 mg/kg. Phân tử gắn kết có thể được sử dụng, ví dụ, với liều ít nhất bằng 0,25 mg/kg, ví dụ như ít nhất bằng 0,5 mg/kg, gồm cả liều dùng ít nhất bằng 1 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 1,5 mg/kg, ví dụ như ít nhất bằng 2 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 3 mg/kg, bao gồm cả ít nhất bằng 4 mg/kg, ví dụ, ít nhất bằng 5 mg/kg; và ví dụ, đến mức tối đa bằng 50 mg/kg, bao gồm cả đến mức tối đa bằng 30 mg/kg, ví dụ, đến mức tối đa bằng 20 mg/kg, gồm cả đến mức tối đa bằng 15 mg/kg. Việc sử dụng này sẽ thường được lặp lại trong các khoảng thời gian thích hợp, như mỗi tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần hoặc bốn tuần một lần, và miễn là trong khoảng thời gian được cho là thích hợp bởi bác sĩ điều trị mà trong một số trường hợp, có thể tăng hoặc giảm liều dùng, nếu cần.

Lượng có hiệu quả để điều trị rối loạn tự miễn hoặc rối loạn viêm có thể xác định theo khả năng làm ổn định của nó đối với sự tiến triển của bệnh và/hoặc để cải thiện các triệu chứng ở bệnh nhân, và tốt hơn là để đảo ngược các biểu hiện của bệnh. Khả năng của phân tử gắn kết theo sáng chế để ức chế rối loạn tự miễn và rối loạn viêm có thể được đánh giá trong các thử nghiệm *in vitro*, ví dụ, như được mô tả trong các ví dụ đã cho, cũng như trong các mô hình động vật thích hợp để dự đoán hiệu quả trong các rối loạn này. Chế độ dùng liều thích hợp được chọn để tạo ra sự đáp ứng điều trị tối ưu trong trường hợp nhất định, ví dụ, sử dụng một liều lớn hoặc tiêm truyền liên tục với khả năng điều chỉnh liều theo chỉ định của ứng trường hợp khẩn cấp.

Hỗn hợp và sử dụng để chẩn đoán

Các phân tử gắn kết của sáng chế cũng được sử dụng trong các quy trình chẩn đoán (ví dụ, *in vitro*, *ex vivo*). Ví dụ, chúng có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định nồng độ PD-1 trong các mẫu thu được từ bệnh nhân (ví dụ, mẫu mô hoặc mẫu dịch cơ thể, như dịch tiết do viêm, máu, huyết thanh, dịch ruột, nước bọt hoặc nước tiểu). Các phương pháp thích hợp để phát hiện và xác định bao gồm các thử nghiệm miễn dịch, như đếm tế bào theo dòng, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), thử nghiệm phát quang hóa học, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, và thử nghiệm mô miễn dịch.

Vật phẩm

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa các chất hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa các rối loạn và tình trạng đã mô tả trên đây.

Vật phẩm bao gồm đồ chứa có dược phẩm kháng thể và nhãn dán, và có thể tờ hướng dẫn sử dụng. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, lọ nhỏ, ampun, bơm tiêm và ống phân tích. Các đồ chứa có thể được làm bằng nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc vật liệu polyme. Đồ chứa này chứa dược phẩm của sáng chế có hiệu quả điều trị bệnh hoặc rối loạn do PD-1 làm trung gian gây ra và có thể có đường tiếp cận vô khuẩn (ví dụ, đồ chứa có thể là túi chứa dung dịch truyền qua đường trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút có thể xuyên qua bởi kim tiêm dưới da). Kháng thể kháng-PD-1 của sáng chế là hoạt chất của dược phẩm. Nhãn dán ở trên đồ chứa hoặc tờ hướng dẫn sử dụng được gắn vào đó chỉ dẫn rằng dược phẩm này dùng để điều trị bệnh mong muốn. Vật phẩm có thể còn bao gồm đồ chứa thứ hai chứa chất đệm dược dụng như nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Ngoài ra, nó còn có thể bao gồm các vật liệu khác mong muốn từ lập trường thương mại và người tiêu dùng, gồm các chất đệm, chất pha loãng, dụng cụ lọc, kim tiêm, bơm tiêm và tờ hướng dẫn sử dụng khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1

Thiết kế thư viện-Fab kháng thể của người nguyên thể MeganLib™

ARN toàn phần của các tế bào lymphô B từ các mẫu máu của hơn một nghìn người cho riêng biệt được phân lập sử dụng Mini Kit RNeasy theo quy trình được khuyến cáo (QIAGEN). Thử nghiệm nồng độ ARN được thực hiện bằng cách sử dụng kit Nanovue (Chăm sóc sức khỏe GE); chất lượng của ARN phân lập được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 1,5%.

Phản ứng phiên mã ngược được tiến hành bằng cách sử dụng kit MMLV RT (Evrogen) theo quy trình được khuyến cáo với enzym phiên mã ngược MMuLV và các hexame oligonucleotid ngẫu nhiên làm đoạn mồi.

Các sản phẩm phiên mã ngược được sử dụng làm cơ chất trong phản ứng chuỗi polymeraza hai-giai đoạn để thu được các gen của miền biến đổi nằm cạnh các vị trí giới hạn; phản ứng này được thực hiện bằng cách sử dụng kit oligonucleotit và quy trình theo tài liệu [J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30].

Chế phẩm ADN thu được VL-CK-VH (Fig.1) được xử lý bằng các enzym endonucleaza giới hạn NheI/Eco91I và được gắn vào phagemit pH5 ban đầu (Fig.2A). Các sản phẩm gắn được biến nạp vào các tế bào khả biến điện tử SS320 được chuẩn bị theo quy trình [Methods Enzymol. 2000;328: 333-63.]. Kho thư viện biểu hiện thể thực khuẩn-Fab tổ hợp MeganLibTM có 10^{11} thể biến nạp. Các chế phẩm của thư viện thể thực khuẩn Fab được điều chế theo quy trình đã được mô tả trước đây [J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3): 581-97].

Ví dụ 2

Chọn lọc các thư viện-fab của kháng thể thể thực khuẩn

Các kháng thể-thể thực khuẩn Fab kháng-PD-1 đặc hiệu được phân lập từ thư viện biểu hiện-thể thực khuẩn Fab của thư viện tổ hợp MeganLibTM. Việc chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng PD-1 của người tái tổ hợp, với sự sàng lọc trong các điều kiện như đã mô tả trước đây (J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30; Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):309-14; J Mol Biol.1991 Dec 5;222(3): 581-97). Để thực hiện quy trình chọn lọc bằng phương pháp sàng lọc, PD-1 của người trong chất đệm cacbonat 50mM (độ pH = 9,5) được hấp phụ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trên bề mặt các ống HighSorb (Nunc). Ngoài ra, các ống được rửa bằng PBS (độ pH = 7,4) và sau đó được phong bế bằng dung dịch chứa PBS (độ pH = 7,4) – sữa có không béo (0,5% trọng lượng/thể tích) trong 1 giờ. Sau đó, 2-4ml dung dịch thể thực khuẩn (10^{13} hạt thể thực khuẩn/ml) trong PBS (độ pH 7,4) – sữa không có chất béo (0,5% trọng lượng/thể

tích) được chuyển đến ống chứa kháng nguyên, và hệ thống này được ủ trong 1 giờ trong khi khuấy. Các thể thực khuẩn không gắn kết được loại bỏ bằng loạt chu trình rửa bằng PBS (độ pH = 7,4) - Tween 20 (0,1% theo thể tích). Số chu trình rửa được tăng lên từ vòng đầu tiên đến vòng thứ ba – 20-30-40 lần, tương ứng. Các hạt thể thực khuẩn vẫn gắn kết được rửa giải bằng dung dịch Gly-HCl 100 mM (độ pH = 2,5) trong 15 phút trong khi khuấy, và sau đó được làm trung hòa bằng TRIS 1M-HCl (độ pH = 7,6). Vi khuẩn *E.coli* TG1 được gây nhiễm bằng các thể thực khuẩn thu được; ngoài ra, các thể thực khuẩn được phân lập và sử dụng trong chu trình chọn lọc tiếp theo. Sau vòng thứ hai và thứ ba của quá trình chọn lọc, ADN (các phagemit) được phân lập và các gen của vùng biến đổi của kháng thể được tách dòng vào các vector biểu hiện (Fig.2B) để tạo ra Fab trong các tế bào *E.coli*.

Ví dụ 3

Phân tích sự đặc hiệu gắn kết của Fab với PD-1 của người

Thử nghiệm ELISA được sử dụng để xác định sự gắn kết của các mảnh-Fab thử nghiệm với PD-1 của người. Fab có trình tự công bố Nivolumab (Bristol-Myers Squibb) được sử dụng làm đối chứng dương. Để phân tích sự gắn kết đặc hiệu, các lỗ của đĩa ELISA (môi trường gắn kết từ công ty Greiner bio one) được phủ 50µl PD1-H6F (0,5 µg/ml trong 1× chất đệm cacbonat phủ, độ pH = 9,5), được đóng kín và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Tất cả các giai đoạn khác được tiến hành theo quy trình ELISA tiêu chuẩn với thiết bị được tự động hóa có hiệu năng cao dựa trên các hệ thống robot như Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) và Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). Sự gắn kết không đặc hiệu được phong bế bằng cách bổ sung chất đệm phong bế BB (200µl sữa không có chất béo 0,5% trong PBS). Các đĩa được ủ trên thiết bị lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng PBS-Tween, mỗi tế bào được phủ bằng 50µl dịch nổi bề mặt tế bào chứa Fab thử nghiệm được trộn với thể tích tương đương của BB. Các đĩa được ủ trên thiết bị lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng; ngoài ra, mỗi lỗ của đĩa được rửa 3 lần bằng chất đệm PBS-Tween. Sau khi rửa, mỗi lỗ được phủ (50 µl/lỗ) bằng kháng thể thứ cấp liên hợp với HRP kháng Fab của người (Pierce-ThermoScientific) trong PBS-Tween (1:5000). Các đĩa được chuyển đến thiết bị lắc quay (50 phút ở nhiệt độ trong phòng) và sau đó được rửa 3 lần bằng chất đệm PBS-Tween như đã mô tả trên đây. Tín hiệu so màu thu được bằng cách bổ sung TMB (50µl/lỗ) cho đến khi bão hòa (trung bình là 3-5 phút); sự hiện

màu khác được phong bế bằng cách thêm dung dịch làm ngừng (30 μ l/lỗ, axit sulfuric 10%). Cường độ hấp phụ được xác định ở bước sóng 450nm sử dụng đầu đọc đĩa Tecan-Sunrise thích hợp (Tecan). Sự gắn kết của kháng thể tỷ lệ thuận với tín hiệu được tạo ra.

Ví dụ 4

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh phong bế sự tương tác của phối tử PDL1 và thụ thể PD-1

Kỹ thuật ELISA cạnh tranh được sử dụng để kiểm tra khả năng đối kháng của Fab đặc hiệu kháng-PD-1 chọn lọc trước đây. Fab có trình tự Nivolumab công bố (Bristol-Myers Squibb) được sử dụng làm đối chứng của chất đối kháng dương. Các lỗ của đĩa ELISA (môi trường gắn kết, Greiner bio one) được phủ bằng thụ thể PD1-H6F 50 μ l/lỗ (dung dịch 1 μ g/ml trong chất đệm cacbonat phủ 1X, độ pH = 9,5) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Tất cả các công đoạn khác được thực hiện theo quy trình ELISA tiêu chuẩn với thiết bị được tự động hóa có hiệu năng cao dựa trên các hệ thống robot như Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) và Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). Sự gắn kết không đặc hiệu được phong bế bằng cách bổ sung chất đệm phong bế BB (200 μ l sữa không có chất béo 0,5% trong PBS). Các đĩa được ủ trên thiết bị lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Sau khi đĩa chứa thụ thể PD1 được rửa bằng dung dịch BB, nó được phủ bằng dịch nổi bề mặt tế bào chứa Fab thử nghiệm, ủ với tốc độ lắc 500 vòng/phút trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, nó được trộn với 50 μ l PDL1-Fc ở nồng độ cuối bằng 1 μ g/ml, và ủ trong 45 phút trong cùng điều kiện, ngoài ra, mỗi lỗ của đĩa được rửa 3 lần bằng chất đệm PBS-Tween. Hơn nữa, kháng thể thứ cấp liên hợp HRP của dê kháng IgG (Fc) của người (Sigma) được bổ sung với lượng 50 μ l/lỗ trong PBS-Tween (1:5000). Các đĩa được ủ trên thiết bị lắc quay trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng và được rửa 5 lần bằng PBS-Tween, như được đề cập trên đây. Tín hiệu so màu thu được bằng cách cho thêm TMB (50 μ l/lỗ) cho đến khi bão hòa (trung bình là 3-5 phút); sự làm hiện màu thêm bị phong bế bằng cách bổ sung dung dịch làm ngừng (30 μ l/lỗ, axit sulfuric 10%). Cường độ hấp phụ được xác định ở bước sóng 450nm bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa Tecan-Sunrise thích hợp (Tecan). Sự gắn kết Fab tỷ lệ nghịch với tín hiệu màu được tạo ra.

Ví dụ 5

Sàng lọc koff cạnh tranh đối với các ứng viên Fab của người kháng-PD1

Việc Sàng lọc koff được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống Pall Forte Bio Octet Red 96. Các thiết bị cảm biến sinh học kháng-FABCH1 được tái hydrat hóa trong 30 phút trong chất đệm xử lý chứa PBS 10mM (độ pH = 7,2-7,4), Tween-20 0,1% và BSA 0,1%. Chất đệm xử lý 10x được bổ sung vào các mẫu thử nghiệm của dịch nổi bề mặt *E.coli* đến nồng độ cuối 1x. Sau đó, các thiết bị cảm biến sinh học kháng-FABCH1 được nhúng vào dịch nổi bề mặt *E.coli* chứa các mảnh-Fab của các kháng thể ứng viên và ủ trong 12 giờ ở nhiệt độ 4°C. Tiếp đó, các thiết bị cảm biến được chuyển dung dịch các lỗ chứa dung dịch chất phân tích (PD-1, 30 µg/ml) để thu được sự kết hợp kháng thể-kháng nguyên (300 giây). Sau đó, các thiết bị cảm biến được chuyển lại vào các lỗ chứa chất đệm xử lý để phân ly thêm (300 giây). Các thiết bị cảm biến đã sử dụng được tái sinh sau mỗi thí nghiệm: chúng được cho vào chất đệm tái sinh ba lần (Gly-HCl, độ pH = 1,7) và sau đó có thể được sử dụng trong các thử nghiệm khác. Các đường cong thu được được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu Octet (phiên bản 7.0) theo quy trình tiêu chuẩn với mô hình tương tác là 1:1.

Ví dụ 6

Tạo ra các kháng thể và kháng nguyên tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy tế bào của động vật có vú dạng huyền phù

Các kháng thể và kháng nguyên được tạo ra trong dòng tế bào thiết lập thu được từ các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO-K1) theo các quy trình đã công bố [Biotechnol Bioeng. 2005 Sep 20; 91(6):670-677, Liao Metal., 2004; Biotechnol Lett. 2006 Jun;28(11):843-848; Biotechnol Bioeng. 2003 Nov 5;84(3):332-342]. Các tế bào chủ yếu biểu hiện gen của protein EBNA1 (kháng nguyên nhân Epstein-Barrvirus 1) được sử dụng. Sự nuôi cấy huyền phù được tiến hành trong các bình nón trên máy rung theo quỹ đạo bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh từ công ty Life Technologies Corporation và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với biểu hiện tạm thời, các tế bào ở nồng độ 2×10^6 /ml được chuyển nhiễm bằng polyetylenimin tuyến tính (PEI MAX, Polysciences). Tỷ lệ ADN/PEI là 1:3-1:10. Trong 5-7 ngày sau khi chuyển nhiễm, dịch nuôi cấy tế bào được ly tâm với tốc độ 2000 g trong 20 phút và được lọc qua bộ lọc cỡ 0,22µm. Các protein đích được phân lập ra khỏi dịch nuôi cấy bằng phương pháp HPLC ái lực.

Protein PD-1 tái tổ hợp chứa 6 axit amin His ở vùng đầu tận cùng C được phân lập và tinh chế ra khỏi dịch nuôi cấy trên nhựa nạp-Ni Profinity IMAC (Bio-Rad). Trước quá trình tinh chế, NiCl_2 được bổ sung vào dịch nuôi cấy đến nồng độ 1mM. Sau đó, 5ml Profinity IMAC nạp-Ni được bổ sung vào dịch nuôi cấy và trộn trên thiết bị lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Chất hấp phụ được chuyển tới các cột Polypropylen Thermo scientific và được rửa bằng 5 thể tích cột PBS để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng nguyên đã gắn kết được rửa giải bằng imidazol 0,3M (độ pH = 8) và NaCl 150mM. Sau đó, protein được thẩm tách vào PBS (độ pH = 7,4) bằng kỹ thuật SnakeSkin Dialysis Tubing, được lọc (cỡ 0,22 μm), chuyển vào các ống và bảo quản ở nhiệt độ -70°C .

Các protein PD1-Fc và PDL1-Fc tái tổ hợp được phân lập và tinh chế ra khỏi môi trường nuôi cấy tế bào trên cột Protein A của phương pháp HPLC ái lực. Dịch nuôi cấy trong suốt được cho qua cột HiTrap rProtein A Sepharose FF 5ml (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng nước muối đệm phosphat (PBS, độ pH = 7,4). Sau đó, cột được rửa bằng 5 thể tích PBS để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng nguyên đã gắn kết được rửa giải bằng chất đệm glyxin 0,1M (độ pH = 8). Các đỉnh rửa giải protein chính được thu thập và chuyển về độ pH trung tính bằng chất đệm-Tris 1M (độ pH = 8). Tất cả các giai đoạn được tiến hành dưới tốc độ dòng 110 cm/giờ. Sau đó, protein được thẩm tách vào PBS (độ pH 7,4) bằng kỹ thuật SnakeSkin Dialysis Tubing, được lọc (0,22 μm), chuyển vào các ống và bảo quản ở nhiệt độ -70°C .

Các kháng thể IgG1 được tinh chế trên cột Hi Trap rProteinA FF 1ml (GE Healthcare) theo quy trình tự đã nêu trên đây đối với kháng nguyên PD1-Fc. Độ tinh khiết của protein thu được được đánh giá bằng phương pháp SDS-PAGE (Fig.3A và 3B).

Ví dụ 7

Tái hoạt hóa sự truyền tín hiệu NFAT bằng các kháng thể kháng-PDI trong dòng tế bào thông báo Jurkat-NFAT-PD1

Việc thiết kế Jurkat dòng tế bào-T của người có nguồn gốc Jurkat được thực hiện bằng cách đưa hai cấu trúc di truyền vào hệ gen theo nó. Một cấu trúc mã hóa gen thụ thể PD1 của người. Cấu trúc thứ hai mã hóa gen luc2P luxiferaza dưới sự kiểm soát của yếu tố di truyền nhạy NFAT. Kết quả thu được dòng tế bào thông báo

Jurkat-PD1-NFAT-Luc2, biểu hiện thụ thể PD1 trên màng bề mặt và chứa khởi gen khởi đầu phụ thuộc NFAT định hướng sự phiên mã của gen luc2P luxiferaza. Sự tổng hợp enzym luxiferaza trong các tế bào của dòng này tỷ lệ thuận với mức độ hoạt tính của NFAT, điều này lại phản ánh tổng mức độ hoạt hoá tế bào.

Sự tương tác của PDL1 với PD1 ức chế sự truyền tín hiệu từ các thụ thể TCR đến gen khởi đầu NFAT. Khi kháng thể kháng PD1 không ràng buộc sự tương tác PDL1-PD1, sự tái hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu trong tế bào xuất hiện.

Đĩa dùng cho thử nghiệm được chuẩn bị một ngày trước khi tổng hợp như sau: dung dịch chứa các kháng thể kháng-CD3 trong PBS (1 $\mu\text{g/ml}$ với 5 $\mu\text{g/ml}$ PDL1-Fc) được đưa vào đĩa đục có 96-lỗ làm bằng chất dẻo đục. Dung dịch chứa các kháng thể kháng-CD3 không chứa PDL1 được sử dụng làm đối chứng dương của sự hoạt hoá. Sau đó, nó được để qua đêm ở nhiệt độ $+4^{\circ}\text{C}$.

Sau đó, các kháng thể thử nghiệm được pha loãng từ 11 $\mu\text{g/ml}$ trong môi trường sinh trưởng tế bào, bằng cách sử dụng tỷ lệ pha loãng ba lần, để thích hợp với đường cong mười điểm, các tế bào với hệ pha loãng của kháng thể được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó các tế bào cùng với các kháng thể được đưa vào đĩa đã chuẩn bị. Dung dịch chứa các kháng thể kháng-CD28 trong môi trường sinh trưởng được cho thêm vào tất cả các lỗ đến nồng độ cuối bằng 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Sau đó, các lỗ được để yên trong tủ áp chứa CO_2 trong 6 giờ.

Cơ chất luxiferaza từ hệ thống thử nghiệm Bio-Glo Luciferase (Promega) đã được chuẩn bị theo quy trình rã đông từ nhiệt độ -70°C và được thêm vào với tỷ lệ của các tế bào V/cơ chất V. Cường độ phát quang được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Fluoroscan Ascent (Fig.5). Các kháng thể kháng-PD1 tái hoạt hóa mức độ phát quang trong dòng tế bào thông báo Jurkat-PD1-NFAT, và do đó gắn kết với thụ thể và ức chế sự tương tác PDL1/PD. BCD-100 cho kết quả tốt nhất, liều hữu hiệu (ED_{50}) bằng 114,6 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Ví dụ 8

Kích thích sự sản sinh IL-2 bằng các kháng thể kháng-PD1 trong máu toàn của người với sự có mặt của độc tố ở ruột *staphylococcal*

Các siêu kháng nguyên, như độc tố tế bào SEB (độc tố ở ruột *staphylococcal*), hoạt hoá các tế bào T bằng cách gắn kết MHC nhóm II trên các tế bào trình diện kháng nguyên với yếu tố $\text{V}\beta$ của thụ thể TCR, dẫn đến sự sản sinh các xytokin, bao

gồm cả yếu tố sinh trưởng tự tiết IL2.

Thử nghiệm này dựa trên phần mô tả sản phẩm (MK-3475; kháng thể đơn dòng kháng PD-1) ở các bệnh nhân có khối u dạng rắn tiến triển (Clin Cancer Res Published OnlineFirst May 14, 2015).

Tóm lại, máu toàn phần được ủ với SEB hoặc với SEB cùng với các kháng thể kháng-PD1, sau đó nồng độ của IL-2 được xác định.

Máu toàn phần từ người cho đã heparin hoá được pha loãng theo tỷ lệ 1:5 lần trong môi trường sinh trưởng (RPMI với huyết thanh bào thai bò 10%). SEB được cho thêm vào máu đã pha loãng đến nồng độ cuối bằng 1 µg/ml. Các kháng thể kháng-PD1 được pha loãng trong môi trường sinh trưởng từ 50 µg/ml với số gia là 3, tổng cộng tám lần pha loãng. Dung dịch chứa máu và SEB trong môi trường sinh trưởng (theo thể tích) được thêm vào các kháng thể đã pha loãng. Các đĩa được ủ trong 3 ngày trong tủ áp chứa CO₂ ở nhiệt độ 37°C. Ngoài ra, nồng độ IL-2 được xác định trong các mẫu đã chọn lọc bằng kỹ thuật ELISA (Fig.6), theo kit có bán trên thị trường (kit Human IL-2 Quantikine ELISA từ công ty R & D Systems). BCD-100 cho kết quả tốt nhất do có hoạt tính chức năng lớn hơn so với các kháng thể đối chứng.

Ví dụ 9

Phân tích tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) của các kháng thể kháng-PD1 trên dòng tế bào Jurkat-PD1

Nuôi cấy tế bào Jurkat-PD1 sinh trưởng nhằm để sử dụng trong thử nghiệm định lượng được thu thập từ các lọ và được ly tâm trong 5 phút ở 200 g. Chất nổi trên bề mặt được tháo cạn và được rửa một lần nữa trong dịch nổi bề mặt được tháo cạn và rửa một lần nữa trong môi trường đối với thử nghiệm định lượng.

Hạt tế bào được để lơ lửng trong 5ml môi trường trường đối với thử nghiệm định lượng; khả năng tồn tại và số lượng tế bào được xác định. Huyền phù tế bào được điều chế để gieo các đĩa nuôi cấy 96-lỗ trắng ở 3×10^5 tế bào/ml.

Các dung dịch loãng của mẫu thử nghiệm được thêm vào các lỗ của đĩa 96-lỗ. Huyền phù tế bào Jurkat-PD1 được thêm vào các lỗ bao gồm các mẫu thí nghiệm, và đĩa được ủ trong 15-30 phút trong máy ủ CO₂.

Huyền phù tế bào PBMCs ở nồng độ $7,5 \times 10^6$ tế bào/ml được điều chế và thêm vào các lỗ chứa các mẫu thí nghiệm. Đĩa được ủ ở 37°C trong máy ủ CO₂ trong 4 giờ.

Chất đệm xét nghiệm và chất đệm AAF-Glo™ từ kit CytoTox-Glotm

Cytotoxicity Assay được trộn lẫn và thêm vào mỗi lỗ bao gồm các mẫu thí nghiệm. Đĩa được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Cường độ phát quang được đo lường sử dụng Fluoroscan Ascent FL (Fig.7). Nguyên lý của phương pháp dựa trên sự xác định tính hoạt hóa của các proteaza nội bào, tín hiệu phát quang thu được tỷ lệ với số lượng các tế bào tiêu biến. Các kháng thể kháng-PD1 không có tính kháng độc tế bào trung gian kháng thể độc lập có thể nhận thấy.

Ví dụ 10

Phân tích enzym miễn dịch của sự tương tác giữa các kháng thể kháng-PD1 với PD1 và các kháng nguyên khác

ELISA được sử dụng để đo lường ái lực tương đối của các kháng thể với PD1 và các kháng nguyên khác. Các lỗ đĩa ELISA (gắn kết trung bình từ đĩa lỗ sinh học Greiner) được sử dụng để đo lường gắn kết. Các lỗ đĩa ELISA được phủ bằng 50 μ l của PD1-Fc, IL6R-Fc, CD38-Fc, HER3-Fc, IGFR-Fc, CD3-Fc, IL23-Fc (1 μ g/ml đối với PD1 và 5 μ g/ml đối với các kháng nguyên khác trong 1 $\times$ chất đệm cacbon bao phủ), đóng kín và ủ qua đêm ở 4°C. Tất cả các bước về sau được tiến hành theo nguyên tắc ELISA tiêu chuẩn. Gắn kết không đặc hiệu bị phong bế bằng cách thêm chất đệm phong bế BB (200 μ l 0,5% sữa không béo trong PBS). Các đĩa được ủ trên máy lắc trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng PBS-Tween, 50 μ l mỗi lỗ kháng thể thử nghiệm được thêm vào ở nồng độ 5 μ g/ml trong PBS-Tween. Các đĩa một lần nữa được ủ, trong khi được lắc, trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau khi mỗi lỗ đĩa được rửa ba lần với chất đệm PBS-Twin. Sau khi rửa, mỗi lỗ được phủ (50 μ l/lỗ) với kháng thể thứ cấp Fab HRP-tiếp hợp kháng người (Nhiệt-Xuyên Khoa) trong PBS-Tween (1:5000). Các đĩa được chuyển tới máy lắc quay (50 phút ở nhiệt độ trong phòng) và sau đó được rửa ba lần với chất đệm PBS-Tween như được mô tả theo sáng chế. Tín hiệu đo màu thu được bằng cách thêm TMB (50 μ l/lỗ) đến khi bão hòa (trung bình 3-5 phút); bên cạnh đó sự phát triển màu bị phong bế bằng cách thêm dung dịch nghi (30 μ l/lỗ, 10% axit sulfuric). Chất hấp phụ được đo lường ở 450 nm sử dụng máy đọc đĩa Tecan-Sunrise phù hợp (Tecan). Gắn kết kháng thể tỷ lệ với tín hiệu được sản xuất (Fig.4). Kháng thể kháng-PD1 gắn kết đặc hiệu với PD1 và không gắn kết với các kháng nguyên khác trong vấn đề.

Ví dụ 11

Phân tích enzym miễn dịch của sự tương tác giữa các kháng thể kháng-PD1 với

các thụ thể PD1 của các sinh vật khác nhau

ELISA được sử dụng để đo lường ái lực tương đối của các kháng thể với các thụ thể PD1 của các sinh vật khác nhau. Các lỗ đĩa ELISA (gắn kết trung bình từ đĩa lỗ sinh học Greiner) được sử dụng để đo lường gắn kết. Các lỗ đĩa ELISA được phủ 50 μ l PD1-Fc của người và khỉ Java, PD1 của chuột nhắt, chuột lớn, chó, thỏ, chuột bạch (0,5 μ g/ml trong 1 $\times$ chất đệm cacbon bao phủ, pH 9,5), đóng kín và ủ qua đêm ở 4°C. Tất cả các bước về sau được tiến hành theo nguyên tắc ELISA tiêu chuẩn. Kháng thể kháng-PD1 gắn kết đặc hiệu với PD1 người và khỉ cynomolgus và không gắn kết với các thụ thể thử nghiệm khác (Fig.9).

Ví dụ 12

Phân tích enzym miễn dịch của sự tương tác giữa các kháng thể kháng-PD1 với các thụ thể họ CD28

ELISA được sử dụng để đo lường ái lực tương đối của các kháng thể với các thụ thể họ CD28. Các lỗ đĩa ELISA (gắn kết trung bình từ Đĩa lỗ sinh học Greiner) được sử dụng để đo lường gắn kết. Các lỗ đĩa ELISA được phủ 50 μ l PD1-Fc người, CD28, CTLA-4 và ICOS-Fc (0,5 μ g/ml trong 1 $\times$ chất đệm cacbon bao phủ, pH 9,5), đóng kín và ủ qua đêm ở 4°C. Tất cả các bước về sau được tiến hành theo nguyên tắc ELISA tiêu chuẩn. Kháng thể kháng-PD1 chỉ gắn kết với PD1 và không gắn kết với các chi họ CD28 khác (Fig.10).

Ví dụ 13

Phân tích sự tương tác giữa các kháng thể kháng-PD1 với các thụ thể PD1 người và khỉ cynomolgus trên thiết bị Octet RED 96

Các hằng số ái lực của gắn kết kháng thể với PD1 người và khỉ cynomolgus được điều tra trên OctetRed 96 (ForteBio). Các kháng thể BCD100 được cố định không đặc hiệu trên bề mặt của các đầu nhạy thế hệ thứ hai phản ứng amin (ForteBio, Pall) theo nguyên tắc tiêu chuẩn trong sách hướng dẫn của nhà xuất đề cập đến điều chế và cố định của các đầu nhạy AR2G. Phân tích được tiến hành ở 30°C sử dụng PBS bao gồm 0,1% Tween-20 và 0,1% BSA làm chất đệm hoạt động. PD-1 của người và khỉ cynomolgus được chuẩn độ với chất đệm hoạt động từ nồng độ 126 nM đến 2 nM với gia số là 2.

Các đường cong gắn kết, sau khi loại trừ tín hiệu tham chiếu, được phân tích sử dụng phần mềm Phân tích Dữ liệu Octet (Phiên bản 7,0) theo trình tự tiêu chuẩn và sử

dụng mô hình phản ứng 1. Kháng thể kháng-PD1 gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên PD-1 của người và khỉ cynomolgus (Fig.11).

Ví dụ 14

Phân tích sự tương tác giữa các kháng thể kháng-PD1 với các thụ thể FcRn và Fcγ bằng cách sử dụng thiết bị Octet RED 96

Các thiết bị cảm biến sinh học Forte bio Octet RED96 và streptavidin (SA) được sử dụng để phân tích tương tác của các kháng thể với FcγRIIIaV, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIa, FcRn.

Trong quá trình thí nghiệm, các thụ thể biotin đánh dấu được cố định định hướng trên bề mặt của các đầu nhạy phủ-streptavidin. Các kháng thể được pha loãng hàng loạt từ nồng độ 500 µg/ml với gia số là 2 x 7 điểm và đặt trong các lỗ trong đĩa 96-lỗ. Giai đoạn quần hợp sau đó được tiến hành bằng cách nhận chìm các đầu nhạy trong các dung dịch của các kháng thể ở những nồng độ đa dạng, hơn nữa, giai đoạn phân ly được tiến hành bằng cách nhận chìm các đầu nhạy trong chất đệm hoạt động.

Chất đệm hoạt động PH7,4 được sử dụng để phân tích ái lực kháng thể với FcγRIIIaV, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIa, và chất đệm hoạt động PH6,0 được sử dụng để phân tích ái lực với FcRn.

Các đường cong thu được, sau khi loại trừ tín hiệu tham chiếu, được phân tích bằng SteadyState sử dụng mô hình phản ứng 2:1 (phối tử bất đồng nhất) theo trình tự tiêu chuẩn. Kết quả được thể hiện trên Fig.8. Phân tích ái lực với các thụ thể Fcγ cho thấy các chức năng chấp hành của IgG1 đã điều chỉnh giảm và xấp xỉ so với IgG4. Dựa trên phân tích ái lực với thụ thể FcRn, người ta có thể giả định rằng động học được lý của kháng thể kháng-PD1 giống với kháng thể Nivolumab.

Ví dụ 15

Xác định tính ổn định kết tụ của kháng thể kháng-PD1 khi chịu ứng suất nhiệt

9 mg/ml chế phẩm kháng thể BCD100 trong chất đệm được làm nóng trong 12 giờ ở nhiệt độ 50°C. Sự kết tụ sau khi ứng suất nhiệt được xác định bằng sắc ký lọc bằng gel hiệu suất cao. Sắc ký được thực hiện trên hệ thống HPLC (Agilent) trên cột Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, 7,8 mm x 30 cm, loại số 08541 với tiền cột Tosoh TSKgel Guard SWXL, 6,0 mm x 4,0 cm, với đường kính hạt 7 µm, loại no. 08543. Sự rửa giải hấp được thực hiện trong chế độ đồng quyền, pha di động: 50 mM NaFb, 0,3

M NaCl, pH 7,0 ở tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Sự nhận diện được thực hiện ở các bước sóng 214 và 280 nm. Các mẫu các kháng thể được pha loãng với chất đệm FSB, pH 7,5, tới nồng độ ~1 mg/ml. Thể tích tiêm là 10 microlit. Tiêu chuẩn lọc bằng gel hỗn hợp hiệu chuẩn (Bio-Rad), loại no. 151- 1901, đã được sắc ký trước. Fig.12 thể hiện các sắc ký đồ kết hợp: đỏ— nguyên vẹn, xanh – sau 12 giờ ủ ở 50°C. Kháng thể kháng-PD-1 vẫn ổn định dưới ứng suất nhiệt (khác biệt trong thành phần kết tụ trong dung dịch trước/sau khi ứng suất nhiệt nhỏ hơn 5%).

Ví dụ 16

Thiết kế dòng tế bào ổn định, sản xuất và tinh chế kháng thể kháng-PD1

Dòng tế bào ổn định sản xuất Kháng thể đơn dòng BCD-100 thu được bằng cách gây nhiễm với sự mở lỗ bằng điện sử dụng Hệ thống Chuyển đổi Neon (Công nghệ Đồi sống) dòng tế bào CHO-S huyền phù gốc với các cấu trúc vector bao gồm tỷ lệ ánh sáng tối ưu và các chuỗi kháng thể nặng. Các chuỗi thể hệ dòng cấp cao (trên 1 g/l) thu được sử dụng nền tảng robot ClonePix (Các Thiết bị Phân tử) và các giai đoạn chọc lọc vùng mini sơ bộ sử dụng các chất kháng sinh trong các dạng nuôi cấy khác nhau. Năng suất của các dòng chọn lọc được phân tích bằng hệ thống tự động robot Biomek FX (Beckman Coulter), và năng suất được phân tích bằng hệ thống phân tích Octet RED96 (Khoa học đời sống Pall). DOE để chọn môi trường cơ bản và sơ đồ nuôi cấy được tiến hành sử dụng hệ thống tự động robot Biomek FX (Beckman Coulter). Sản phẩm được nuôi cấy trong môi trường không huyết thanh và chất cấp dưỡng chứa các protein không có nguồn gốc từ động vật.

Dịch nuôi cấy được lọc qua máy lọc sâu Zeta Plus Maximizer 60M02» (3M). Tinh chế sơ bộ kháng thể được thực hiện trên chất hấp phụ ái lực Protein A. Protein đích được rửa giải hấp đặc hiệu với chất đệm glyxin pH 3,3-3,8 dưới các điều kiện axit. Nước giải hấp thu được được phơi sáng tới độ pH axit trong 30-60 phút để bất hoạt virus, và sau đó trung hòa với 1M Tris-OH dung dịch tới pH 6,8-7,2. Sự tinh chế sắc ký cuối cùng để loại bỏ DNA dư thừa, các protein tế bào sản xuất, phối tử của chất hấp phụ ái lực được giải phóng, các chất kết tụ và các đoạn kháng thể được thực hiện sử dụng chất hấp phụ CaptoAdhere (Chăm sóc sức khỏe Khoa học đời sống GE) ở chế độ chảy qua. Do đó, dung dịch protein được chảy qua chất hấp phụ đã điều chế pH 6,8-7,2, dưới suất dẫn thấp (<2 miligây/cm²). Protein tinh chế sau đó được xử lý để loại bỏ virus sử dụng bộ Viresolve PRO filter (Millipore), tập trung và lọc điaba

khối chất đậm cuối cùng chứa chất đậm histidin (pH 6,0-6,5), Tween 80 và trehaloza. Nồng độ là 50 mg/ml và cao hơn.

Ví dụ 17

Bào chế được phẩm chứa chứa kháng thể kháng-PD-1 của sáng chế

Nồng độ kháng thể đến PD1 (BCD-100) – 25 mg/ml, natri axetat t/g – 0,436 mg, mannitol – 50 mg, Kolliphor (poloxame) P188 – 0,2 mg, axit axetic bằng pH 5,15 Osm 300 ± 20 mOsm cho đến pH 5,0.

Ví dụ 18

Nghiên cứu khả năng phản ứng chéo của kháng thể kháng-PD1 trong các mô của người được đông lạnh bình thường

Nghiên cứu phản ứng chéo chế phẩm kháng-PD1 được thực hiện trên các mô người đông lạnh bình thường (vật liệu khám nghiệm tử thi). 33 mô người sau đây được sử dụng trong phân tích: tuyến yên, võng mạc, dạ dày, tế bào máu ngoại vi, vỏ não, da, phổi, hạch bạch huyết, tử cung, amidan, tiểu não, tuyến vú, bàng quang, niệu quản, tuyến thượng thận, dây thần kinh ngoại biên, tuyến mang tai, gan, tụy, cơ vân, thận, tuyến tiền liệt, lá lách, tim, tủy sống, ruột già, ruột non, ống dẫn trứng, tuyến giáp và tuyến cận giáp, nội mô mạch máu, tinh hoàn, buồng trứng. Huyền phù đông lạnh của các tế bào Jurkat-PD1 bao gồm kháng nguyên màng PD1 được sử dụng làm điều khiển tích cực.

Các khối mô đông lạnh sản xuất từ các mảnh mô nội tạng đã được nhúng trong môi trường đông lạnh và làm đầy mô Tissue-Tec (Sacura), được đông lạnh trong hơi nitơ lỏng và bảo quản ở -70°C . Huyền phù kết tủa của các tế bào Jurkat-PD1 biểu hiện PD1 được sử dụng làm điều khiển tích cực, 1×10^6 tế bào/ml được khuấy đục lại trong 1 ml môi trường đông lạnh và làm đầy mô Tissue-Tec (Sacura), huyền phù đã thu được đông lạnh trong hơi nitơ lỏng, và bảo quản ở -70°C .

Các phần 5 μm được điều chế trên máy điều lạnh Thermo HM525U. Ngoài ra, các phần được cố định với axeton lạnh trong 10 phút, hong khô trong không khí ở nhiệt độ trong phòng trong 2-24 giờ. Các phần đã cố định được bảo quản trong bóng tối ở -70°C .

Chế phẩm kháng-PD1 (JSC Biokad, Nga) được đánh dấu FITC sử dụng FluoReporter FITC Bộ ghi nhãn Protein (Invitrogen) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Peroxidaza nội sinh bị phong bế. Các phần được rửa hai lần với PBS (0,05%

Tween 20), peroxidaza nội sinh bị phong bế sử dụng Khối Hydrogen Peroxit (Nhiệt) trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, và rửa thêm hai lần với PBS.

Sự nhuộm màu không đặc hiệu bị phong bế trước quá trình nhuộm như sau: các phần được xử lý với Khối Protein Không huyết thanh (Dako) trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các kháng thể sơ cấp được sử dụng không qua rửa.

Các phần được phủ với kháng thể sơ cấp ở nồng độ hoạt động 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (kháng thể kháng-PD1 được đánh dấu FITC, kháng thể lớp IgG1 người ở nồng độ 0,2 $\mu\text{g/ml}$) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và sau đó rửa hai lần với PBS trong 5 phút mỗi lần.

Dung dịch kháng thể kháng-FITC đơn dòng ở chuột được liên hợp với peroxidaza (pha loãng hoạt động 1/1000) được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, và sau đó rửa hai lần với PBS trong 5 phút mỗi lần. Các phần được xử lý với Dung dịch nhuộm màu DAB trong 10 phút, và sau đó rửa hai lần với nước khử ion.

Các nhân được nhuộm màu sáng với hematoxylin trong 10 phút, và sau đó rửa hai lần với nước khử ion. Các phần được xử lý với 1% HCl dung dịch trong 1 giây, và sau đó rửa ba lần với nước khử ion. Các nhân được nhuộm màu với dung dịch cacbonat liti bão hòa (xanh) trong 45 giây. Sau khi được nhuộm màu, các phần được rửa hai lần với nước khử ion, khử nước trong các dung dịch cồn với nồng độ cồn tăng dần (70%, 80%, 96%), được làm sạch trong thể phẩm xylene, được nhúng vào trong môi trường dựng, và sau đó được phủ bằng ClearVue (Nhiệt).

Đo độ tế bào bán định lượng nhuộm tích cực được thực hiện. Chụp hình chế phẩm được thực hiện sử dụng kính hiển vi sáng Leica DM 6000B, và các hình ảnh kỹ thuật số được truyền đến màn hình máy tính qua máy quay hình Leica DFC 420 và ghi lại trên đĩa cứng sử dụng gồm Leica Application Suite (phiên bản 2.5.0.R1). Để chụp hình, ống kính 40x được sử dụng, với mức tiêu chuẩn đã điều chỉnh đặc hiệu (cài đặt kỹ thuật số) của sự rọi sáng chế phẩm micro. Cường độ nhuộm trong ảnh tỷ lệ với nồng độ liên quan của chất nền được đánh dấu, trong trường hợp này là kháng-PD1. Ngoài việc đánh giá trực quan về nhuộm tế bào miễn dịch của các loại và cấu trúc tế bào, phần mềm phân tích hình ảnh kỹ thuật số ImageJ được sử dụng để đo lường mức độ nhuộm miễn dịch trong một khu vực được chọn. Dựa trên cường độ nhuộm và tổng số cấu trúc màu, việc đánh giá được thực hiện bằng thang điểm 0-3. Nhuộm miễn dịch cuối cùng được đánh giá có tính đến cường độ nhuộm của mô được phủ với các kháng

thể lớp kiểm soát.

Ví dụ 19

Đánh giá hiệu quả trong *in vivo* của kháng thể kháng-PD1

Hiệu quả được đánh giá bởi chuột nhắt PBMC nhân hóa (The Jackson Laboratory) được tiêm dưới da với dòng tế bào u ác tính ở người A2058. Mỗi động vật trong nhóm được nhận $2,5 \times 10^6$ tế bào u. Các tế bào được trộn lẫn với Matrigel® (1:1) trước khi tiêm. Hỗn hợp đã thu được tiêm dưới da. Hiệu quả được đánh giá sử dụng ba liều lượng chế phẩm BCD-100, chế phẩm tham chiếu Keytruda® (đối chứng dương) và chế phẩm globulin miễn dịch ở người thường để tiêm tĩnh mạch (kiểm soát tiêu cực) (Bảng 1).

Bảng 1. Sơ đồ đánh giá hiệu quả

Nhóm	Số lượng động vật	Chế phẩm	Các ngày	Phương pháp sử dụng	Liều, mg/kg
1	6 (đ)	BCD-100	7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 và 31	i.p. (trong màng bụng)	5
2	6 (đ)	BCD-100			20
3	6 (đ)	BCD-100			40
4	6 (đ)	Keytruda® (Pembrolizumab) Đối chứng dương			40
5	6 (đ)	IVIg Đối chứng là chất dẫn thuốc			40

Trong thời gian thử nghiệm, trọng lượng (trước khi tiêm và sau đó hai lần một tuần) và thể tích hạch u trong các động vật được đánh giá sử dụng the công thức sau:

$$W^2 \times L \times 0,536$$

Trong đó W – chiều rộng của hạch u, L – chiều dài của hạch u.

Các động vật được an tử trong ngày 37 của thí nghiệm. Trước khi an tử, máu động vật được lấy mẫu để đánh giá mức độ tuần hoàn các tế bào lymphô máu người trong các quần thể sau:

□ CD45+ CD20+	Các lympho bào B
□ CD45+ CD3+	Các lympho bào T
□ CD45+ CD3+ CD4+	Các tế bào T hỗ trợ
□ CD45+ CD3+ CD8+	Các tế bào T gây độc tế bào
□ CD45+ CD3- CD(16+56)+	Các tế bào NK

Ví dụ 20

Đánh giá độ độc động học của kháng thể kháng-PD1

Nghiên cứu độ độc động học được tiến hành trên các cá thể khỉ cynomolgus sử dụng ba mức liều lượng BCD-100. Sơ đồ các nhóm thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Sơ đồ nghiên cứu tính độc

Nhóm số	Số lượng động vật	Chế phẩm	Phương pháp sử dụng	Liều dùng, mg/kg
1	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1	qua tĩnh mạch	10
2	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		70
3	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		140
4	3 (♂)	Chất dẫn thuốc		-

Các thông số sau được đánh giá trong suốt quá trình nghiên cứu:

- Các kết quả khám lâm sàng;
- Cân nặng của động vật (trước khi tiêm và trong ngày 4, 8, 22, 42 của thí nghiệm);
- Nhiệt độ cơ thể (trước khi tiêm và sau khi 1, 2, 4, 6, 24 giờ sau khi tiêm, trong ngày 4, 8, 22, 42 của thí nghiệm);
- Phân tích nước tiểu (trước khi tiêm và trong ngày 4, 8, 22, 42 của thí nghiệm);
- Phân tích máu đầy đủ theo các thông số sau: số lượng hồng cầu, số lượng hồng cầu bạch cầu, nồng độ huyết cầu tố (trước khi tiêm và trong ngày 4, 8, 22, 42 của thí nghiệm);
- Phân tích sinh hóa huyết thanh theo các thông số sau: lactat dehydrogenaza,

tổng bilirubin, tổng protein, glucozo, atpatat aminotransferaza, alanin amino transferaza (trước khi tiêm và trong ngày 4, 8, 22, 42 của thí nghiệm);

- Kiểm tra nồng độ bản chế phẩm trong huyết thanh máu các động vật linh trưởng (5, 15 phút và 0,5, 1, 3, 6, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 264, 336, 408, 576, 888, 984 giờ sau khi tiêm).

Ví dụ 21

Đánh giá độc tính trong trường hợp tiêm dưới da bội số trong các cá thể khi xynomoligus trong ba tháng theo sau là thời gian không tiêm trong ba tháng

Kiểm tra độc trong trường hợp tiêm dưới da bội số trong ba tháng theo sau là thời gian phục hồi trong ba tháng được thực hiện trên các động vật thích hợp – các cá thể khi xynomoligus. Ba mức liều lượng đã được sử dụng trong thí nghiệm. Sơ đồ các nhóm thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Sơ đồ đánh giá độc tính trong trường hợp tiêm dưới da bội số

Nhóm số	Số lượng động vật	Chế phẩm	Phương pháp sử dụng	Liều dùng
1	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1	qua tĩnh mạch	5,0
	3 (♀)			mg/kg
2	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		30,0
	3 (♀)			mg/kg
3	3 (♂) *	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		70,0 mg/kg
	3 (♀) *			
	3 (♂)			
	3 (♀)			
4	3 (♂)	Chất dẫn thuốc		-
	3 (♀)			

Các thông số sau được đánh giá trong suốt quá trình nghiên cứu:

- Các kết quả khám lâm sàng;
- Cân nặng của động vật (trước khi tiêm và trong các tuần 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 sau đó);
- Nhiệt độ cơ thể (trước khi tiêm và sau đó hằng tuần tới khi kết thúc thí nghiệm);

- Tác dụng trên hệ tim mạch dựa trên hoạt động điện sinh học của tim được đánh giá bằng máy đo nhịp tim; đánh giá được thực hiện trước khi tiêm và sau đó trong tuần 5, 9, 13, 18, 22, 26 của thí nghiệm;
- Phân tích nước tiểu (trước khi tiêm và trong tuần 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 của thí nghiệm);
- Phân tích máu đầy đủ theo các thông số sau: số lượng hồng cầu, số lượng hồng cầu bạch cầu, nồng độ huyết cầu tố, số lượng các tế bào lymphô, số lượng bạch cầu đơn nhân, số bạch cầu trung tính, số bạch cầu ưa eosin, số bạch cầu ưa kiềm, số lượng tiểu cầu (trước khi tiêm, và sau đó mỗi tuần một lần bắt đầu từ tuần đầu tiên của thí nghiệm);
- Đánh giá tác dụng trên hệ thống đông máu theo các thông số sau: thời gian tromboplastin từng phần đã hoạt hoá, nồng độ chất tạo tơ máu, thời gian protrombin (trước khi tiêm, sau đó hai tuần một lần trong thời gian tiêm, bắt đầu từ tuần thứ hai của thí nghiệm, trong thời gian phục hồi vào tuần 15, 20 và 25 của thí nghiệm);
- Phân tích sinh hóa huyết thanh theo các thông số sau: natri, kali, creatini, ure, kiềm phosphat, lactat dehydrogenaza, tổng bilirubin, tổng protein, glucozo, triglyxerit, atpatat aminotransferaza, alanin amino transferaza, tổng colexteron (trước khi tiêm và trong tuần 4, 8, 12, 15, 20 của thí nghiệm);
- Vào cuối thời gian cấp truyền, các động vật nhóm vệ tinh 3* đã an tử, tiếp theo là kiểm tra bệnh lý theo sáng chế; vào cuối nghiên cứu, các động vật nhóm 3 và nhóm kiểm soát đã an tử, theo sau là kiểm tra bệnh lý theo sáng chế;
- Là một phần của nghiên cứu độc tính, các tác dụng kích thích cục bộ của các chế phẩm cũng được đánh giá, và các mô mềm nằm gần khu vực tiêm do đó được lựa chọn và kiểm tra mô học.

Ví dụ 22

Đánh giá độc tính miễn dịch của kháng thể kháng-PD1 chế phẩm

Kiểm tra độc tính miễn dịch trong trường hợp tiêm dưới da bội số trong ba tháng theo sau là thời gian phục hồi trong ba tháng được thực hiện trên các động vật thích hợp – các cá thể khỉ cynomolgus. Ba mức liều lượng đã được sử dụng trong thí nghiệm. Sơ đồ các nhóm thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Sơ đồ đánh giá tính gây độc tế bào trong trường hợp sử dụng dưới da nhiều lần

Nhóm số	Số lượng động vật	Chế phẩm	Phương pháp sử dụng	Liều dùng	
1	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1	trong tĩnh mạch	5,0 mg/kg	
	3 (♀)				
2	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		30,0	
	3 (♀)			mg/kg	
3	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		70,0	
	3 (♀)			mg/kg	
4	3 (♂)	Chất dẫn thuốc			-
	3 (♀)				

Các thông số sau được đánh giá trong suốt quá trình nghiên cứu:

- Thành phần số lượng động vật nhận diện được của các tế bào lymphô được đánh giá trước khi tiêm chế phẩm và tiếp sau đó trong tuần 3, 7, 13, 21 và 26 của thí nghiệm;
- Tỷ lệ các nhóm globulin miễn dịch được đánh giá trước khi tiêm và trong tuần 4, 8, 12, 20, 25 của thí nghiệm;
- Tác dụng trên thực bào được đánh giá trước khi tiêm và trong tuần 3, 7, 13, 21, 26 của thí nghiệm;
- Phản ứng nở biến đổi của được đo lường trước khi tiêm chế phẩm và sau đó trong tuần 5, 13, 21, 26 của thí nghiệm.

Ví dụ 23

Đánh giá động học dược lý và tính di truyền miễn dịch trong trường hợp tiêm dưới da bội số các kháng thể kháng-PD-1

Kiểm tra động học dược lý và độc tính miễn dịch trong dịch trong trường hợp tiêm dưới da bội số trong ba tháng, tiếp theo là thời gian phục hồi trong ba tháng được thực hiện trên các động vật thích hợp – các cá thể khỉ *xynomolgus*. Ba mức liều lượng đã được sử dụng trong thí nghiệm. Sơ đồ các nhóm thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Sơ đồ đánh giá độc tính trong trường hợp sử dụng dưới da nhiều lần

Nhóm số	Số lượng động vật	Chế phẩm	Phương pháp sử dụng	Liều
1	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1	trong tĩnh mạch	5,0 mg/kg
	3 (♀)			
2	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		30,0 mg/kg
	3 (♀)			
3	3 (♂)	Kháng thể đơn dòng kháng-PD-1		70,0 mg/kg
	3 (♀)			

Để đánh giá động lực của nồng độ chế phẩm và để về sau tính toán các thông số động học dược lý, huyết thanh máu của các động vật được lấy trước khi tiêm chế phẩm và tiếp sau đó trong ngày 1, 2, 8, 9, 15, 16, 22, 23, 29, 30, 36, 37, 43, 44, 50, 51, 57, 58, 64, 65, 71, 72, 78, 79, 85, 86, 92, 99, 106, 113, 120, 127, 134, 148, 162, 176 của thí nghiệm.

Tính di truyền miễn dịch được đánh giá bằng mức độ gắn kết các kháng thể, và vì mục đích này, máu được lấy ra và huyết thanh được tách ra trước khi tiêm chế phẩm và tiếp sau đó trong tuần 4, 8, 12, 20, 26 của thí nghiệm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có khả năng gắn kết với thụ thể PD-1 của người chứa trình tự axit amin có mức độ giống ít nhất 75% với trình tự SEQ ID NO: 3.
2. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, miền gắn kết chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.
3. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, kháng thể hoặc mảnh của nó chứa:
 - trình tự của miền biến đổi chuỗi nặng có mức độ giống ít nhất 75% với trình tự SEQ ID NO: 7, và
 - trình tự của miền biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ giống ít nhất 75% với trình tự SEQ ID NO: 8.
4. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong các trình tự SEQ ID NO: 1-3.
5. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của vùng CDR1 chuỗi nhẹ (L-CDR1) nêu trong SEQ ID NO: 4, trình tự axit amin của vùng CDR2 chuỗi nhẹ (L-CDR2) nêu trong SEQ ID NO: 5, trình tự axit amin của vùng CDR3 chuỗi nhẹ (L-CDR3) nêu trong SEQ ID NO: 6.
6. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, miền gắn kết cạnh tranh để gắn kết hoặc gắn kết với cùng epitop dưới dạng miền gắn kết chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7.
7. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, miền gắn kết có mức độ giống ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 7.
8. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7.

9. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.
10. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, miền gắn kết được làm cho giống với của người.
11. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, khác biệt ở chỗ, kháng thể này liên quan đến một trong số các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người.
12. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với PD-1 của người và có trình tự chuỗi nặng có mức độ giống ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 9.
13. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9.
14. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, kháng thể này gắn kết với PD-1 của người và có trình tự chuỗi nhẹ có mức độ giống ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 10.
15. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.
16. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó phần ổn định Fc chứa sự đột biến bất kỳ làm giảm hoặc làm mất chức năng bất kỳ trong số các chức năng hiệu ứng ADCC, ADCP hoặc CDC, so với trình tự tự nhiên.
17. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, trong đó phần ổn định Fc chứa đột biến làm tăng các thông số dược động học của người hoặc động vật, ví dụ như $t_{1/2\beta}$ (giờ) hoặc $C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$).
18. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, kháng thể này có ít nhất một trong số các đặc tính sau:
 - a) tính ổn định kết tụ: hàm lượng chất kết tụ tăng không quá 5% hàm lượng ban đầu trong dung dịch ở nồng độ cao hơn 10 mg/ml và ở nhiệt độ bảo quản $T = 4^{\circ}\text{C}$ trong thời gian hơn 6 tháng;

b) tính ổn định kết tụ: hàm lượng chất kết tụ tăng không quá 5% hàm lượng ban đầu trong dung dịch ở nồng độ cao hơn 10 mg/ml và với nhiệt độ tăng lên đến 37 °C trong thời gian hơn 2 tuần;

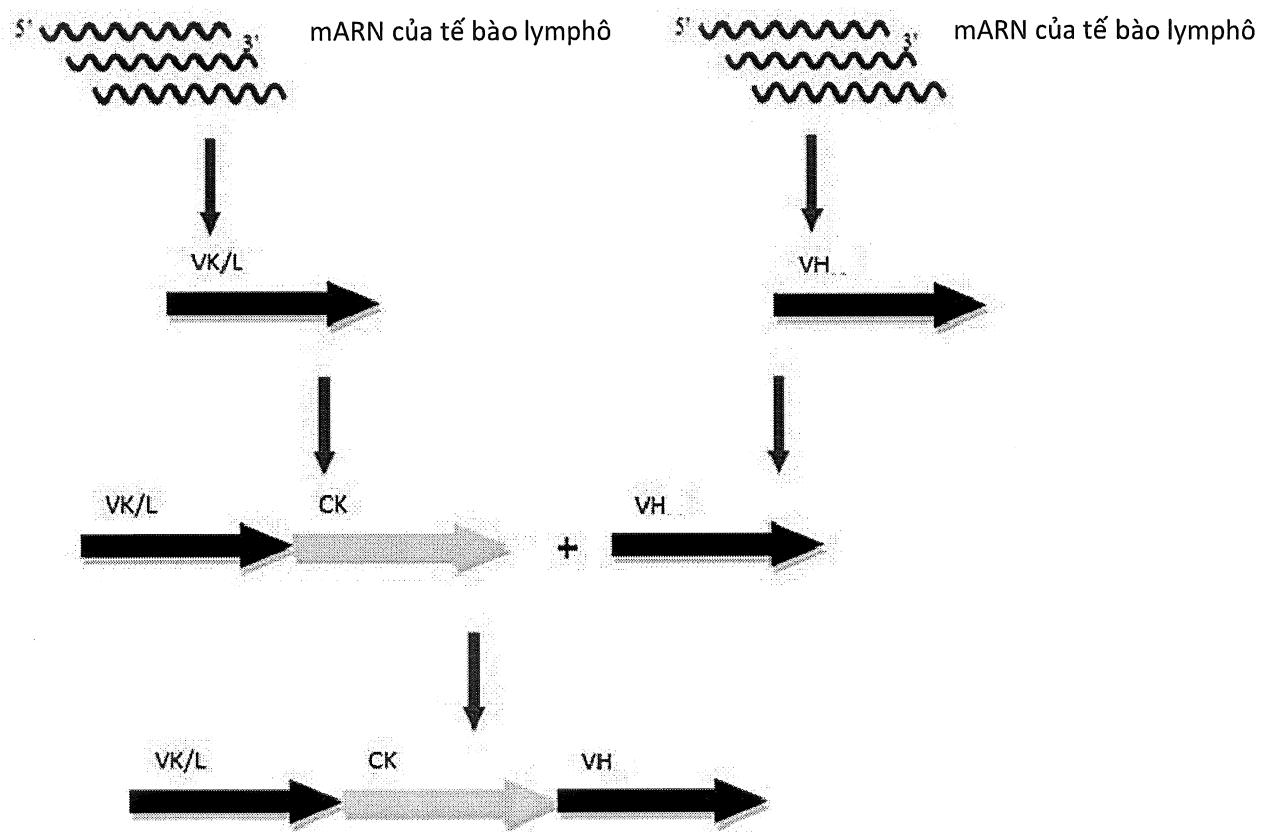
c) tính ổn định kết tụ: hàm lượng chất kết tụ tăng không quá 5% hàm lượng ban đầu trong dung dịch ở nồng độ cao hơn 10 mg/ml và với nhiệt độ tăng lên đến 50°C trong thời gian hơn 6 giờ;

d) hằng số phân ly K_D không lớn hơn 10^{-9} (M) khi gắn kết với PD-1 của người;

e) hằng số kết hợp động học kon (1/Ms) bằng ít nhất 10^5 (1/Ms) khi gắn kết với PD-1 của người;

f) hằng số phân ly động học dis (1/s) không quá 10^{-4} (1/s) khi gắn kết với PD-1 của người;

19. Kháng thể đặc hiệu kép chứa mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18.
20. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18.
21. Vector biểu hiện chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 20.
22. Tế bào chủ chứa trình tự nucleotit theo điểm 20.
23. Phương pháp tạo ra tế bào chủ theo điểm 22, bao gồm bước chuyển nhiễm tế bào gốc thích hợp với vector biểu hiện theo điểm 21.
24. Phương pháp tạo ra kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, bao gồm các bước: tạo ra tế bào chủ theo điểm 22, nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện đủ để tạo ra kháng thể nêu trên hoặc mảnh của nó, và phân lập và tinh chế kháng thể thu được hoặc mảnh có hoạt tính của nó.
25. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất dẫn thuốc được dùng.

**Fig.1**

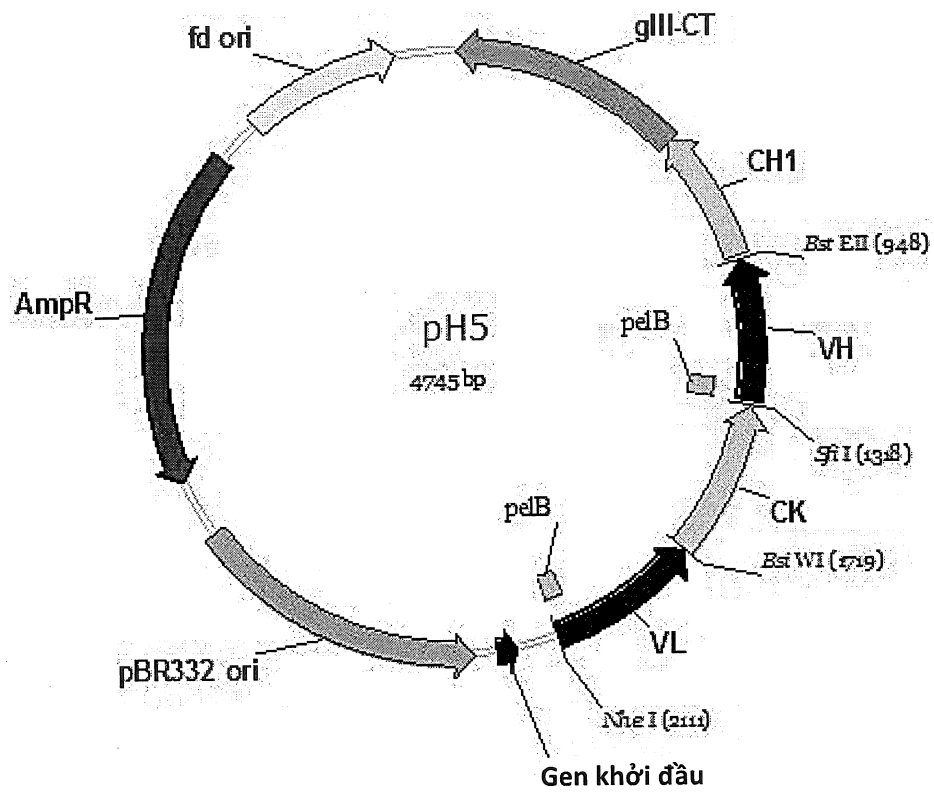


Fig.2A

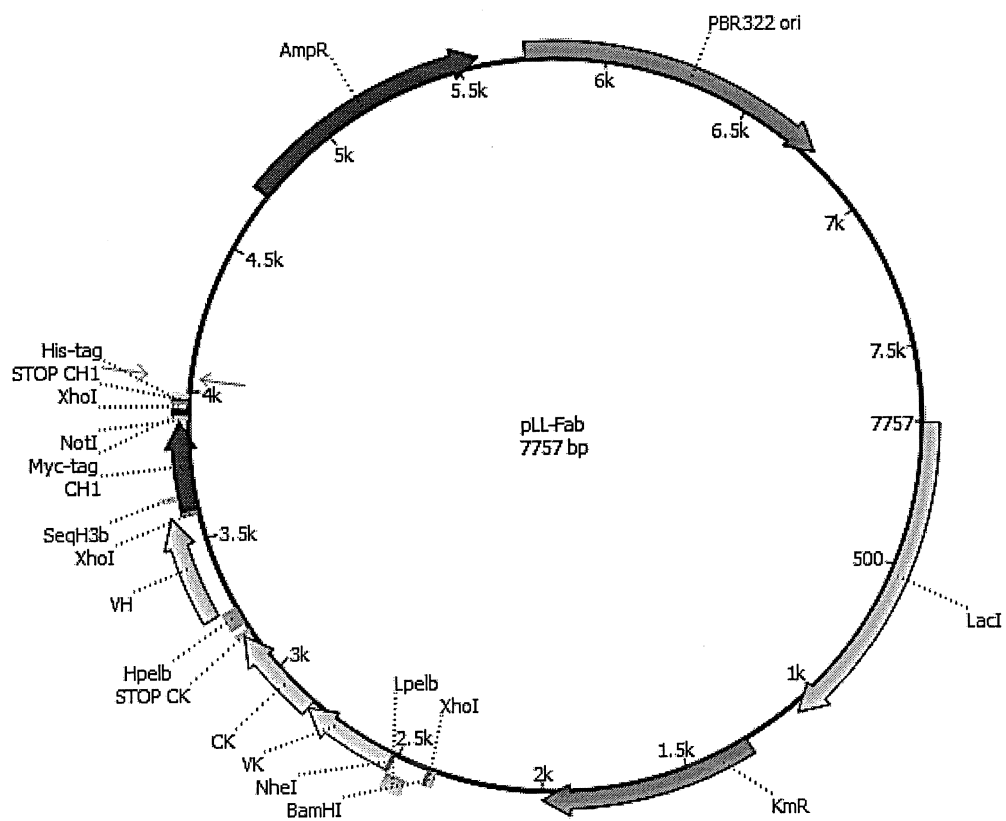
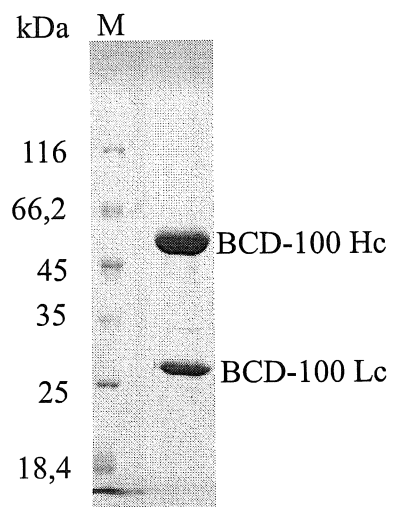
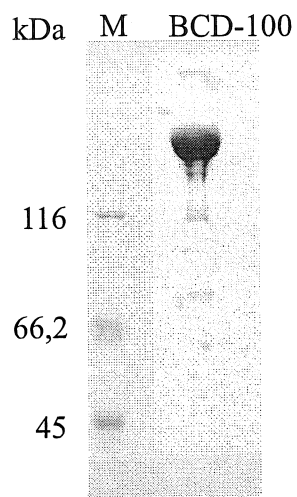


Fig.2B

**Fig.3A**

M – Lên men, gen đánh dấu PW không được nhuộm

Fig.3B

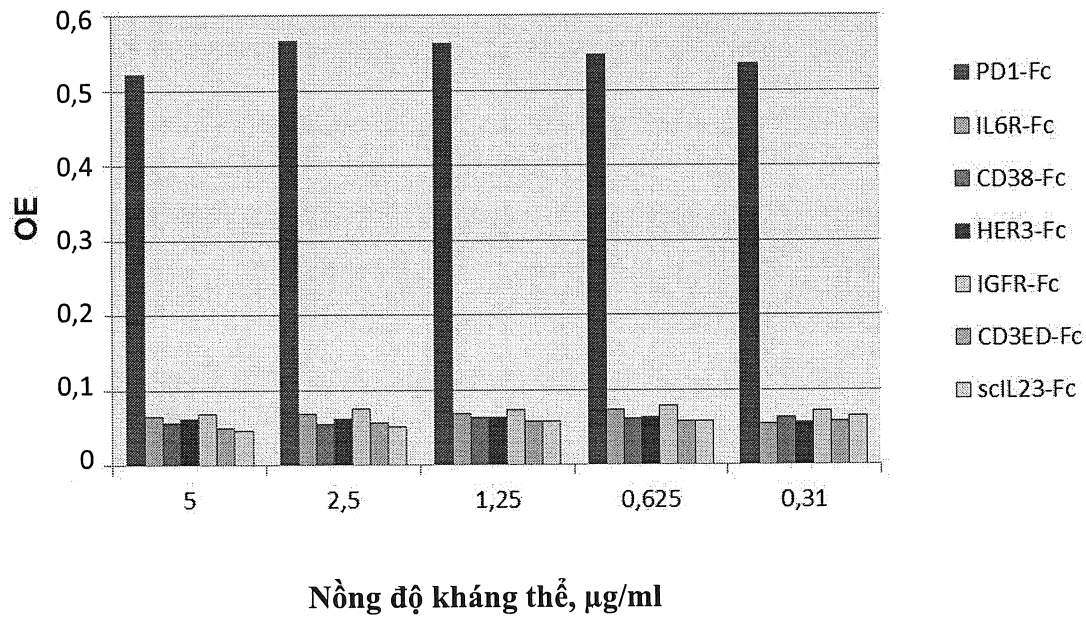


Fig.4

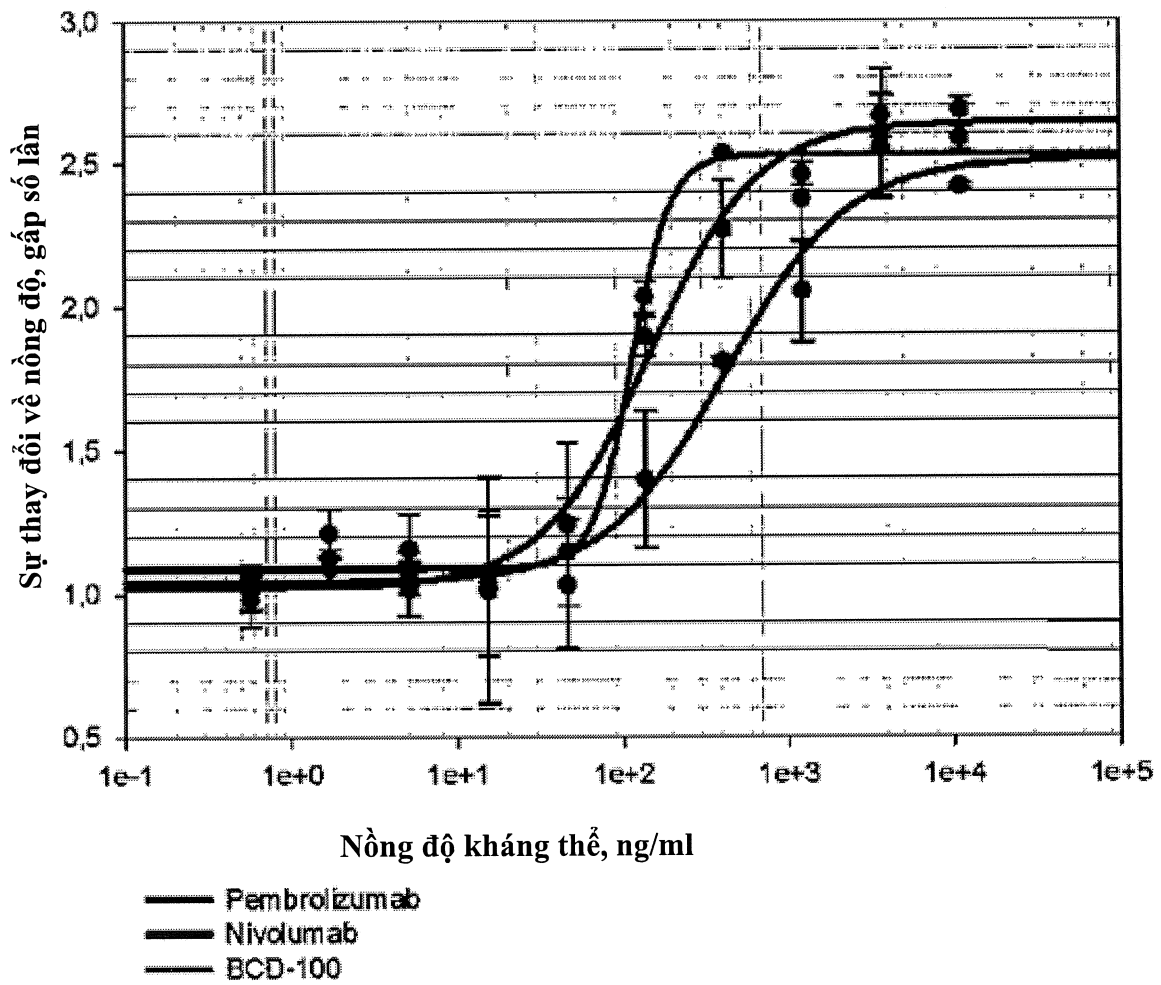


Fig.5

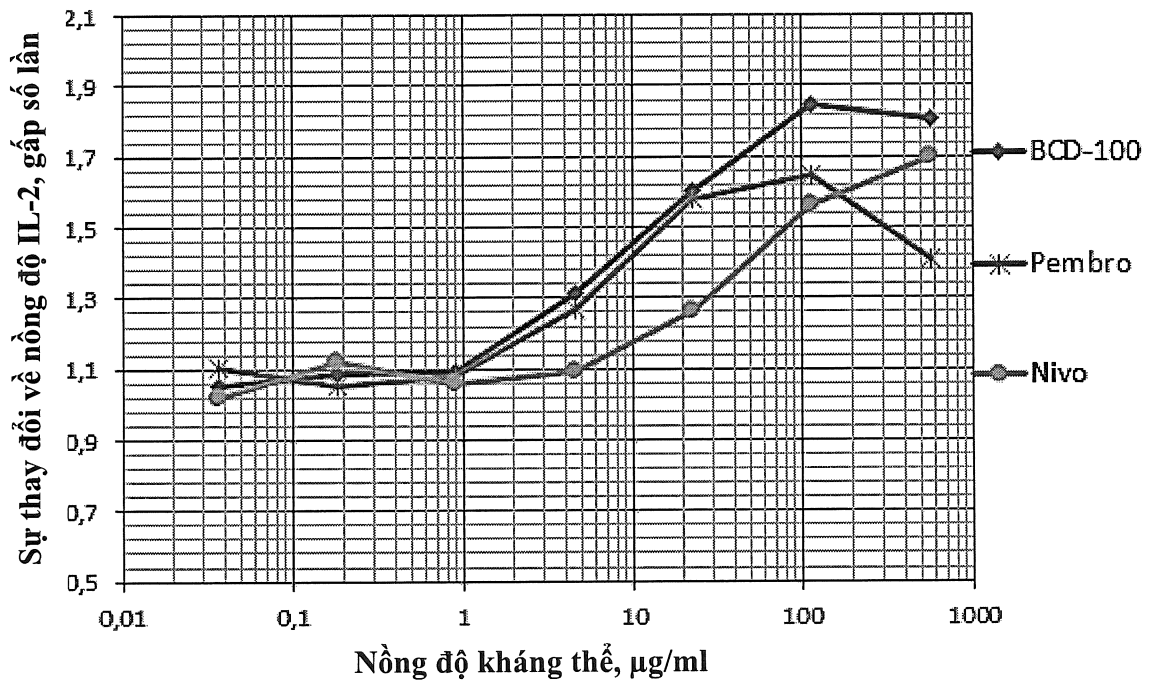


Fig.6

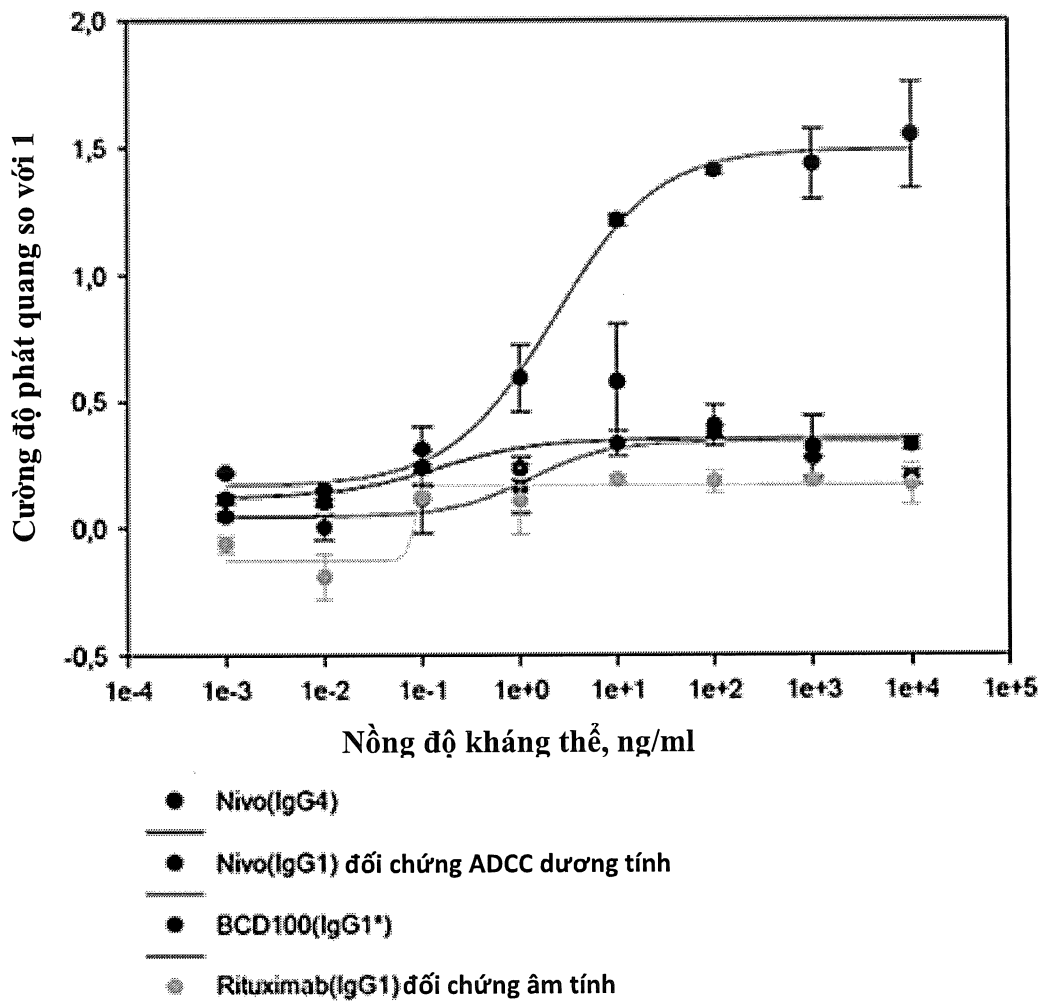


Fig.7

	FeRn KD, M	FcgRIa KD, M	FcgRIIIaV KD, M	FcgRIIaH KD, M	FcgRIIb KD, M
Nivolumab IgG4	9,52E-09±5,07E-10	6,40E-08 ±1.1E-08M	4,20E-06 ±5.4E-07M	1,60E-06 ±1.5E-07M	2,80E-07 ±2.2E-08M
Pembrolizumab IgG4	5,10E-09±3,21E-10	5,00E-08 ±7.9E-09M	5,00E-06±4.4E-07M	1,30E-06±1.6E-07M	2,30E-06±1.9E-07M
BCD-100 IgG1*	9,60E-09±4,24E-10	7,50E-07 ±9.3E-08M	7,40E-07±1.1E-07M	NA	NA

Fig. 8

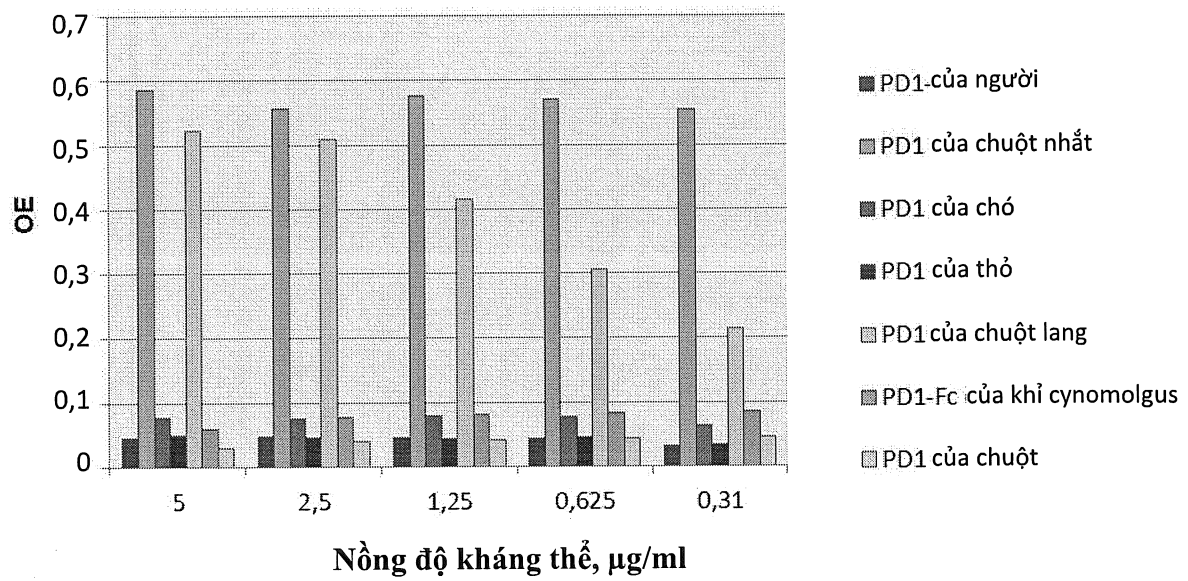


Fig.9

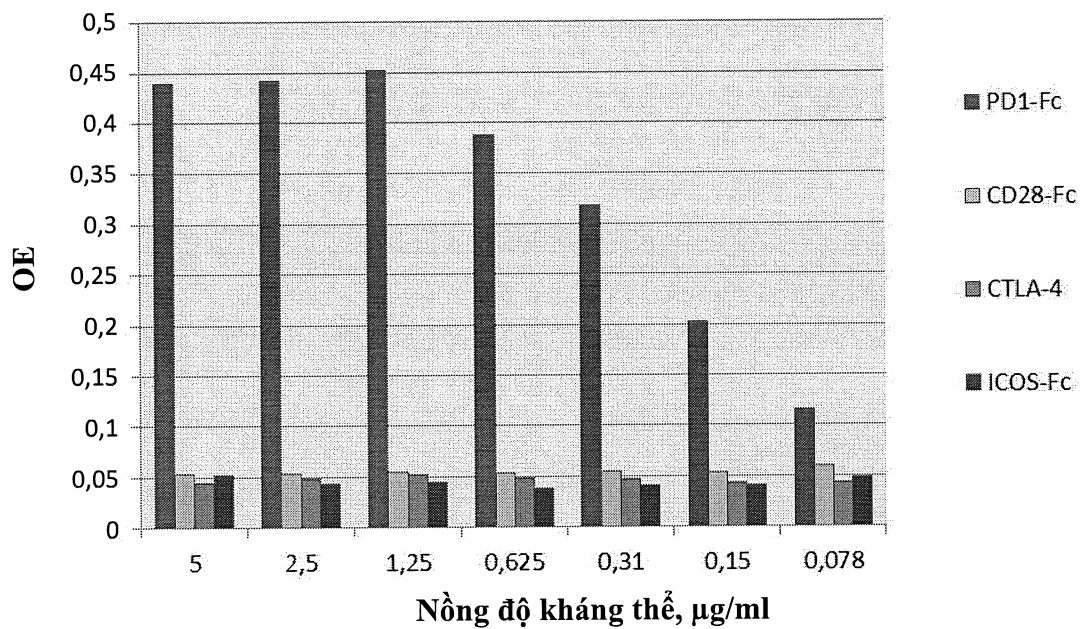


Fig.10

	PD1 của người KD, M	PD1 của khỉ Cynomolgus KD, M
BCD-100 IgG1*	1,86E-10	<1.0E-12

Fig.11

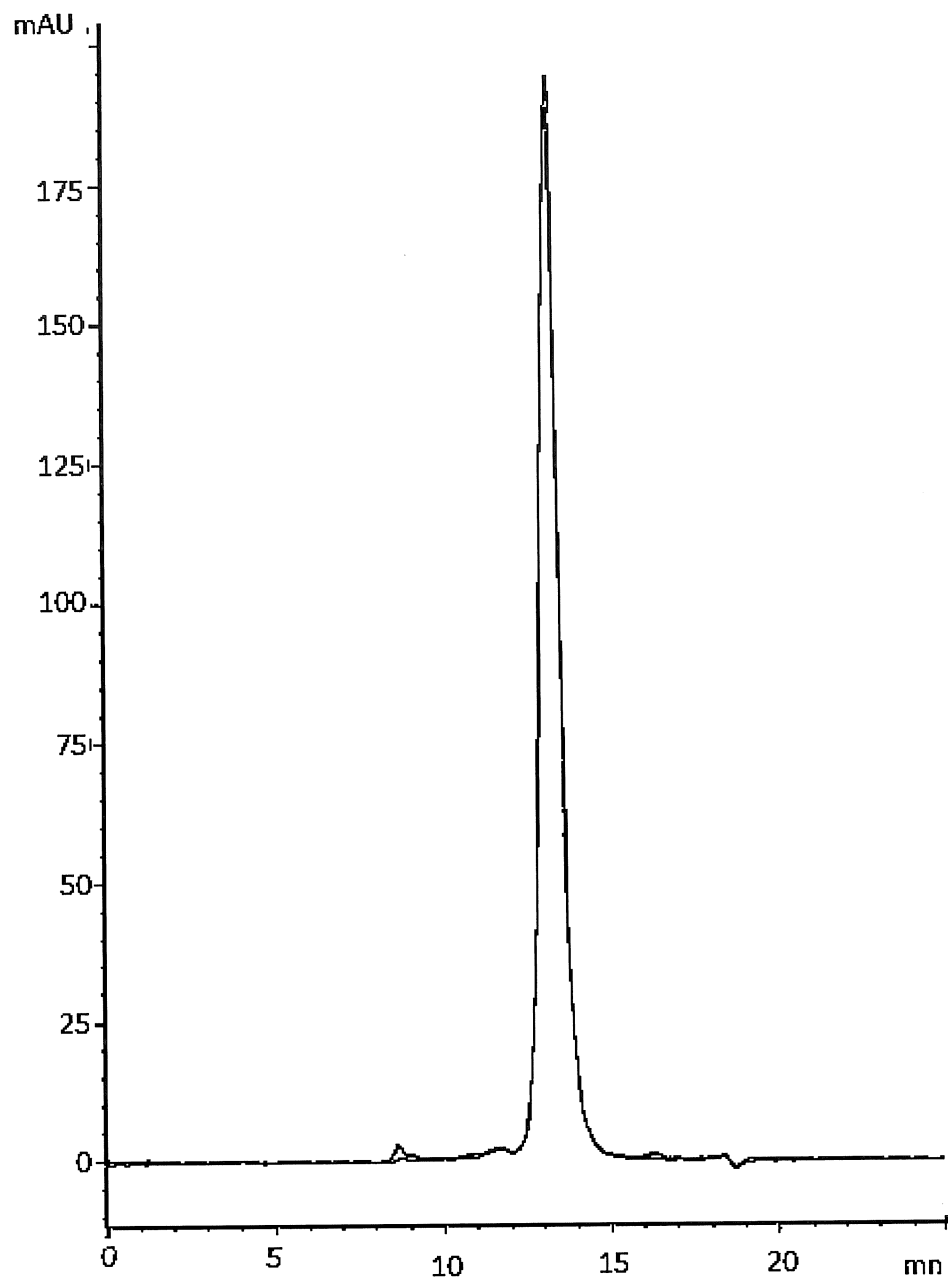


Fig.12

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JSC «BIOCAD»

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<150> RU2016128487

<151> 2016-07-13

<160> 10

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<223> tổng hợp

<400> 3

Cys Ala Arg Asp Glu Gly Gly Gly Thr Gly Trp Gly Val Leu Lys Asp

1

5

10

15

Trp Pro Tyr Gly Leu Asp Ala

20

<210> 4

<211> 11

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 4
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 5
 Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 6
 Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Val Asn Ala Lys Asn Thr Met 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 Asp Glu Gly Gly Gly Thr Gly Trp Gly Val Leu Lys Asp Trp

100 105 110
 Pro Tyr Gly Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 8
 Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 85 90 95
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln
 100 105

<210> 9
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln 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
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Val Asn Ala Lys Asn Thr Met 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 Asp Glu Gly Gly Gly Thr Gly Trp Gly Val Leu Lys Asp Trp
 100 105 110
 Pro Tyr Gly Leu Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

```

145          150          155          160
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
          165          170          175
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
          180          185          190
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
          195          200          205
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
          210          215          220
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225          230          235          240
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
          245          250          255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
          260          265          270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
          275          280          285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
          290          295          300
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305          310          315          320
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
          325          330          335
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Tyr Thr
          340          345          350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          355          360          365
Gln Val Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          370          375          380
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385          390          395          400
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
          405          410          415
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
          420          425          430
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          435          440          445
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          450          455

```

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<223> tổng hợp

<400> 10

```

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1          5          10          15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Asn Val
          20          25          30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45
Arg Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65          70          75          80

```

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Thr	Ala	Val
				85					90					95	
Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gln	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												