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

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

(11) **1-0044790**

(51)[2006.01] **C07K 16/28**; A61K 45/00; C07K 19/00; C07K 16/46; A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2020-05194
(22) 22/02/2019
(86) PCT/US2019/019076 22/02/2019
(87) WO2019/168745 06/09/2019
(30) 62/637,643 02/03/2018 US
(45) 25/04/2025 445
(43) 25/12/2020 393A
(71) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) CHAI, Qing (CN); FENG, Yiqing (US); NEWBURN, Kristin Paige (US); TRUHLAR, Stephanie Marie (US); VERDINO, Petra (AT); YACHI, Pia Pauliina (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ MÀ GẮN KẾT VỚI PD-1 CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-05194

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể chủ vận kháng protein chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1) của người, và dược phẩm chứa các kháng thể này. Các kháng thể này là hữu dụng để điều trị các rối loạn tự miễn như bệnh viêm khớp dạng thấp hoặc để giảm sự thải bỏ các tế bào và/hoặc các mô được cấy ghép.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y tế. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến các kháng thể chủ vận hướng đến protein chết tế bào theo chương trình 1 của người (PD-1; còn được biết như là CD279), các chế phẩm chứa các kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người, và các phương pháp sử dụng các kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người để điều trị các rối loạn tự miễn hoặc thải ghép.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các con đường kiểm soát miễn dịch điều biến cả đáp ứng tự miễn và đáp ứng miễn dịch chống ung thư (Isakov, N., *J. Autoimmune Disorders 2016*; 2(2):17). Đối với liệu pháp điều trị bệnh tự miễn, việc thúc đẩy, tức là chủ vận, tác dụng của con đường ức chế miễn dịch, sao cho đáp ứng miễn dịch được ngăn chặn, là mong muốn. Ngược lại, trong liệu pháp điều trị ung thư, việc ức chế, tức là đối kháng, tác dụng của con đường ức chế miễn dịch, sao cho đáp ứng miễn dịch được giải phóng, hoặc được kích thích, lại là mong muốn.

PD-1 là protein màng tế bào typ I. PD-1 thuộc họ CD28/CTLA-4 mở rộng chứa miền IgV ngoại bào tiếp sau là miền xuyên màng và nội bào. Việc hoạt hóa con đường PD-1 dẫn đến sự ức chế sự hoạt hóa tế bào miễn dịch, như giảm sự tăng sinh tế bào, giảm sự sống sót tế bào, và sự ức chế các xytokin gây viêm (ví dụ, IFNγ, TNFα và IL-2). PD-1 được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch được hoạt hóa gần đây, như các tế bào T, các tế bào B, các tế bào NKT, các bạch cầu đơn nhân, và các tế bào đuôi gai; và sự biểu hiện của nó được điều hòa một cách chặt chẽ. Tầm quan trọng của việc truyền tín hiệu qua trung gian PD-1 trong việc điều biến đáp ứng miễn dịch ở người được chứng minh với sự thành công trong điều trị bệnh nhân ung thư bằng các kháng thể đối kháng PD-1. Các bệnh nhân ung thư được điều trị bằng kháng thể đối kháng PD-1 có xu hướng có các triệu chứng tự miễn khác nhau như là tác dụng phụ của việc điều trị (Cappelli, L.C., et al., 2017; Hoffman, L., et al., 2016). Ngoài ra, có các mối liên quan đã biết khác giữa hoạt tính bệnh tự miễn và con đường PD-1. Ví dụ, các bệnh nhân

SLE bùng phát có xu hướng có sự biểu hiện PD-L1 thấp (Mozaffarian, N., et al., 2008) và có các tự kháng thể đối với PD-1 (Shi, H., et al., 2017).

Do đó, sự tăng việc truyền tín hiệu qua trung gian PD-1 tạo nên phương pháp tiếp cận tiềm năng để quản lý các rối loạn tự miễn mà có thể dẫn đến sự làm giảm nhẹ bệnh tật rõ rệt và sự bền vững của đáp ứng đi kèm với các lợi ích an toàn chính so với các liệu pháp điều biến miễn dịch hiện tại. Nói chung, các liệu pháp hiện tại này điều hòa giảm một cách rộng rãi hệ thống miễn dịch của cơ thể (ví dụ, các corticosteroit và xyclophosphamit). Tuy nhiên, PD-1 được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào miễn dịch được hoạt hóa. Do đó, các kháng thể kháng PD-1 có tiềm năng đối với các tế bào đích chọn lọc mà được hoạt hóa trong thời gian điều trị, không động đến phần còn lại của tập hợp tế bào miễn dịch.

Lĩnh vực này có khó khăn là cần phân phối các kháng thể chủ vận PD-1 (Sharpe, A. and Pauken, E., *Nature Reviews Immunology* (2017)). Khó khăn này, ít nhất một phần, được cho là do các tương tác tế bào phức tạp cần thiết để đạt được sự chủ vận PD-1 trong môi trường sinh lý *in vitro* hoặc *in vivo*. Do đó, bối cảnh thử nghiệm hoặc mô hình được sử dụng để nhận diện các kháng thể trị liệu rõ ràng là quan trọng khi đánh giá hoạt tính của kháng thể chủ vận PD-1.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20170088618 bộc lộ các kháng thể kháng PD-1 của người, mà, theo một số phương án, và trong các thử nghiệm *in vitro* nhất định, có các đặc tính như là các chất chủ vận với tỷ lệ liên hợp và phân ly liên quan đến miền ngoại bào PD-1 dẫn đến giá trị K_D nằm trong khoảng từ 19 đến 22 nM (như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) sử dụng thiết bị BIAcore®T200).

Do đó, cần có kháng thể kháng PD-1 của người kiểu khác mà 1) gắn kết với PD-1 của người với tỷ lệ liên hợp và phân ly mong muốn để hoạt tính chủ vận tối ưu, 2) chủ vận PD-1 của người trong bối cảnh liên quan về mặt miễn dịch để đạt được hiệu lực *in vivo*, 3) thể hiện hiệu lực đủ để làm liệu pháp đơn để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn tự miễn hoặc ngăn ngừa sự thải ghép, 4) thể hiện hoạt tính mong muốn để làm một phần của liệu pháp kết hợp với các phương pháp trị liệu khác để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn tự miễn hoặc phòng ngừa sự thải ghép, và/hoặc 5) cung cấp loại thuốc hữu hiệu khác để chuyển đổi thuốc khi, trong quá trình điều trị rối

loạn tự miễn bằng kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người kiểu khác, liệu pháp điều trị bị dừng lại do ít nhất một sự kiện bất lợi và/hoặc do sự không hiệu lực (cụ thể là, giảm hiệu lực qua trung gian kháng thể kháng thuốc (anti-drug antibody - ADA).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề xuất các kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người kiểu mới, được làm giống như của người. Các kháng thể theo sáng chế đặc biệt có ưu điểm so với các kháng thể kháng PD-1 có trong lĩnh vực vì nhiều lý do khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các lý do dưới đây: 1) chúng gắn kết với PD-1 của người (cũng như PD-1 của khỉ cynomolgus) với tỷ lệ liên hợp và phân ly mong muốn, 2) chúng có thể có hiệu quả trong điều trị ở mức liều thấp hơn hoặc tần suất dùng liều ít hơn, 3) chúng ức chế sự tăng sinh tế bào T sơ cấp của người *in vitro*, 4) chúng điều hòa sự biểu hiện bề mặt tế bào PD-1 của người, 5) chúng ức chế hoạt tính truyền tín hiệu thụ thể tế bào T trong thử nghiệm tế bào thông báo NFAT *in vitro*, 6) chúng có khả năng sinh miễn dịch protein trị liệu thấp (tức là, các kháng thể kháng thuốc (ADA)), 7) chúng làm giảm hoạt tính của bệnh trên mô hình GvHD được làm giống như của người, và/hoặc 8) trên mô hình bệnh viêm thận lupus *in vivo*, chúng ức chế sự hoạt hóa tế bào miễn dịch:

a) không có độc tính gây hại tế bào phụ thuộc bổ thể đáng kể và/hoặc phát hiện được,

b) không cạnh tranh với PD-L1/2 của người để gắn kết với PD-1 của người,

c) không cảm ứng sự giải phóng xytokin đáng kể và/hoặc phát hiện được trong các thử nghiệm *in vitro*.

Hơn nữa, các kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người lấy làm ví dụ theo sáng chế còn thể hiện tính ổn định *in vivo*, tính ổn định về mặt vật lý và hóa học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độ ổn định nhiệt, độ hòa tan, khả năng tự liên hợp thấp, và các tính chất dược động học mà có thể chấp nhận được để phát triển và/hoặc sử dụng trong điều trị các rối loạn tự miễn và/hoặc chứng thải ghép (tức là bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ). Ngoài ra, các trình tự polynucleotit được bộc lộ ở đây mà mã hóa các kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người ví dụ theo sáng chế được thiết

kế để sử dụng codon ưu tiên để cải thiện đáng kể sự biểu hiện của các kháng thể trong các hệ biểu hiện dòng tế bào động vật có vú được ưu tiên, như CHO.

Sáng chế có ưu điểm so với lĩnh vực kỹ thuật bằng cách tạo ra các chế phẩm và các phương pháp hữu dụng trong phòng ngừa, điều hòa giảm hoặc làm thuyên giảm bệnh tự miễn và/hoặc các rối loạn có liên quan đến khả năng dung nạp miễn dịch thông qua việc kích thích điểm kiểm soát miễn dịch sử dụng kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người đã được xử lý đáng kể. Các kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người theo sáng chế có khả năng cải thiện hoặc làm hồi phục bệnh lý miễn dịch, tốt hơn là, thông qua sự ức chế nhánh thích nghi của đáp ứng miễn dịch, khử bỏ quy trình miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên và, nhờ đó trực tiếp hướng đến bệnh lý bệnh cơ sở. Việc sử dụng các kháng thể này trên lâm sàng có thể chứng minh là dẫn đến tuổi thọ lâu dài hoặc thuyên giảm (các) bệnh đang được điều trị.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR) chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7; và 2) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable region - LCVR) chứa LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là phân lớp isotyp IgG 1 (IgG1).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và 2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và 2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID

NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7; và 2) LCVR chứa LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và 2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và 2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người mà chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Sáng chế còn đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể, trong đó kháng thể này chứa: 1) HCVR chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7; và 2) LCVR chứa LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1; và b) thu hồi kháng thể này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể, trong đó kháng thể này chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và 2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1; và b) thu hồi kháng thể này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể, trong đó kháng thể này chứa: 1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và 2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2; và b) thu hồi kháng thể này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể, trong đó kháng thể này bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2; và b) thu hồi kháng thể này.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người được sản xuất bằng các quy trình nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng PD-1 của người được sản xuất bằng các quy trình nêu trên và chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN chứa polynucleotit có trình tự SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc các trình tự SEQ ID NO: 11 và 12. Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN chứa polynucleotit có trình tự SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc các trình tự SEQ ID NO: 11 và 12.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa: 1) kháng thể kháng PD-1 của người chứa: a) HCVR chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7; và b) LCVR chứa LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1; và 2) chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa: 1) kháng thể kháng PD-1 của người chứa: a) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và b) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1; và 2) chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa: 1) kháng thể kháng PD-1 của người chứa: a) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và b) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2; và 2) chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 của người của các dược phẩm nêu trên bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, "PD-1" đề cập đến sự chết tế bào theo chương trình 1 (programmed cell death 1), còn được biết như là sự chết theo chương trình 1 (PD-1; CD279), protein màng tế bào typ I thuộc họ CD28/CTLA-4 mở rộng chứa miền IgV ngoại bào tiếp sau là miền xuyên màng và nội bào.

Như được sử dụng ở đây "hPD-1" hoặc "PD-1 của người" để chỉ PD-1 của người kiểu dại, tốt hơn là, PD-1 của người kiểu dại mà có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 (tức là, NCBI Reference Sequence NP_005009.2).

Các thuật ngữ "cyno", "cynomolgus" hoặc "khỉ cynomolgus" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây. Khi được sử dụng liên quan đến polypeptit PD-1, các thuật ngữ này được dự tính là đề cập đến PD-1 của khỉ cynomolgus kiểu dại, và, tốt hơn là PD-1 của khỉ cynomolgus kiểu dại mà có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15.

"Miền ngoại bào" polypeptit PD-1 hoặc "ECD" ("extracellular domain") để chỉ dạng polypeptit PD-1 mà về cơ bản là không có miền xuyên màng và miền tế bào chất. Tốt hơn là, ECD PD-1 có nhỏ hơn 1% miền xuyên màng và tế bào chất, tốt hơn nữa là ECD PD-1 có nhỏ hơn 0,5% các miền này. Thậm chí tốt hơn nữa là, polypeptit ECD PD-1 của người là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 và polypeptit ECD PD-1 của khỉ cynomolgus là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16. Polypeptit ECD PD-1 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Cách khác, polypeptit ECD PD-1 của người có thể được mua từ các nhà cung cấp khác nhau như Sino Biological (Beijing, China; reference #10377-H08) và R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; cat. #8986-PD). Polypeptit ECD PD-1 của khỉ cynomolgus có thể được mua từ R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; cat. #8509-PD).

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người" để chỉ kháng thể mà gắn kết với PD-1 của người, và, khi được dùng *in vivo*, dẫn đến ít nhất một hoạt tính tự miễn được làm giảm đi một cách đáng kể như giảm hiệu giá kháng ADN sợi kép (double stranded DNA: ds-DNA), giảm điểm số bệnh hoặc giảm xytokin gây viêm.

Như được sử dụng ở đây "Kháng thể 1" để chỉ kháng thể gắn kết PD-1 của người chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin HCDR1 SEQ ID NO: 5, trình tự axit amin HCDR2 SEQ ID NO:6, trình tự axit amin HCDR3 SEQ ID NO: 7; và 2) LCVR có trình tự axit amin LCDR1 SEQ ID NO: 8, trình tự axit amin LCDR2 SEQ ID NO: 9, trình tự axit amin LCDR3 SEQ ID NO: 10, trình tự axit amin HCVR SEQ ID NO: 3, trình tự axit amin LCVR SEQ ID NO: 4, trình tự axit amin HC SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin LC SEQ ID NO: 2.

Thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng ở đây đề cập đến phức chất polypeptit được thiết kế, không có trong tự nhiên, có hai chuỗi nặng (HC) và hai chuỗi nhẹ (LC) sao cho các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua, trong đó kháng thể là kháng thể isotyp IgG. Như được sử dụng ở đây liên quan đến các kháng thể theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể" để chỉ kháng thể mà phân lớp isotyp IgG 1 (tức là, IgG1), và có các chuỗi "nặng" và các chuỗi "nhẹ" mà được liên kết ngang thông qua các liên kết disulfua nội chuỗi và liên chuỗi. Mỗi chuỗi nhẹ tạo thành các liên kết disulfua với chuỗi nặng, và hai chuỗi nặng tạo thành hai liên kết disulfua giữa chúng với nhau. Mỗi chuỗi nặng gồm một HCVR tận cùng bằng N và một vùng hằng định của chuỗi nặng ("HCCR"). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm LCVR có đầu tận cùng N và vùng hằng định của chuỗi nhẹ ("LCCR"). Khi được biểu hiện trong các hệ sinh học nhất định, các kháng thể có trình tự Fc nguyên thể của người được glycosyl hóa ở vùng Fc. Thông thường, sự glycosyl hóa xảy ra trong vùng Fc của kháng thể ở vị trí N-glycosyl hóa được bảo tồn cao. Các N-glycan thường gắn vào asparagin. Các kháng thể cũng có thể được glycosyl hóa ở các vị trí khác.

Tốt hơn là các kháng thể theo sáng chế chứa phần Fc mà là kiểu phụ IgG1 của người. Đã biết rõ rằng IgG1 của người gắn kết với họ thụ thể Fc-gamma (FcγR) cũng như C1q. Sự tương tác với các thụ thể này có thể cảm ứng hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell cytotoxicity - ADCC) và hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity - CDC).

Vùng hằng định của các chuỗi nặng chứa các miền CH1, CH2, và CH3. CH1 xuất hiện sau HCVR; CH1 và HCVR tạo thành phần chuỗi nặng của Fab. CH2 xuất hiện sau vùng bản lề và trước CH3. CH3 xuất hiện sau CH2 và nằm ở đầu tận cùng carboxy của chuỗi nặng. Vùng hằng định của các chuỗi nhẹ chứa một miền CL. CL

xuất hiện sau LCVR; CL và LCVR hình thành phần chuỗi nhẹ của Fab. Tốt hơn là, vùng CL của các kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người theo sáng chế là thuộc kiểu phụ kappa của người (ví dụ, SEQ ID NO: 18).

Phân tử ADN theo sáng chế là phân tử ADN mà chứa trình tự polynucleotit không có trong tự nhiên mã hóa polypeptit có trình tự axit amin của ít nhất một trong số các polypeptit trong kháng thể theo sáng chế (ví dụ, chuỗi nặng, chuỗi nhẹ, chuỗi nặng biến đổi, và chuỗi nặng biến đổi).

Các vùng HCVR và LCVR của kháng thể theo sáng chế có thể được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ trợ (CDR), đặt rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung ("FR"). Mỗi một HCVR và LCVR bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ở đây, ba CDR của chuỗi nặng được gọi là "HCDR1, HCDR2, và HCDR3" và ba CDR của chuỗi nhẹ được gọi là "LCDR1, LCDR2, và LCDR3". Các CDR chứa hầu hết các gốc tạo thành tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Định nghĩa về CDR của Kabat (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) dựa trên tính biến thiên về trình tự của kháng thể. Định nghĩa về CDR của Chothia (Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) dựa trên các cấu trúc ba chiều của kháng thể và định khu học của các nút CDR. Các định nghĩa về CDR của Chothia giống với các định nghĩa về CDR của Kabat trừ HCDR1 và HCDR2. Định nghĩa về CDR của North (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) dựa trên thuật toán phân cụm lan truyền độ tương tự với số lượng lớn các cấu trúc tinh thể. Nhằm mục đích của sáng chế, việc gán các axit amin vào các miền CDR nằm trong vùng LCVR và HCVR của kháng thể theo sáng chế dựa trên quy tắc đánh số Kabat đã biết rõ (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), và quy tắc đánh số North

(North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)). Trong trường hợp các CDR chuỗi nhẹ của các kháng thể theo sáng chế, các định nghĩa về CDR của North được sử dụng. Trong chuỗi nặng cả HCDR1 và HCDR3 đều sử dụng định nghĩa của North. HCDR2 sử dụng định nghĩa lai giữa định nghĩa của North và định nghĩa của Kabat. Định nghĩa của North được sử dụng để nhận diện vị trí đầu tận cùng N bắt đầu trong khi định nghĩa của Kabat được sử dụng để xác định vị trí cuối cùng.

ADN phân lập mã hóa vùng HCVR có thể được chuyển thành gen chuỗi nặng có độ dài đầy đủ bằng cách liên kết theo kiểu hoạt động được ADN mã hóa HCVR với một phân tử ADN khác mã hóa các vùng hằng định của chuỗi nặng. Trong các trình tự của người cũng như động vật có vú khác, các gen vùng hằng định của chuỗi nặng là đã biết trong lĩnh vực này. Các mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể thu được ví dụ, bằng phương pháp khuếch đại PCR chuẩn.

ADN phân lập mã hóa vùng LCVR có thể được chuyển thành gen chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ bằng cách liên kết theo kiểu hoạt động được ADN mã hóa LCVR với một phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Trong các trình tự của người cũng như động vật có vú khác, các gen vùng hằng định của chuỗi nhẹ là đã biết trong lĩnh vực này. Các mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng phương pháp khuếch đại PCR chuẩn. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là vùng hằng định kappa hoặc lambda. Tốt hơn nếu trong các kháng thể theo sáng chế, vùng hằng định của chuỗi nhẹ là vùng hằng định kappa.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể được biểu hiện trong tế bào chủ sau khi các trình tự đã được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự điều khiển việc biểu hiện. Các vectơ biểu hiện thường sao chép được trong sinh vật chủ dưới dạng episom hoặc dưới dạng phần không thể thiếu trong ADN nhiễm sắc thể chủ. Thông thường, các vectơ biểu hiện sẽ chứa các dấu chuẩn chọn lọc, ví dụ, tetraxyclin, neomyxin, và dihydrofolat reductaza, để cho phép phát hiện các tế bào được biến nạp bằng trình tự ADN mong muốn.

Kháng thể của sáng chế có thể dễ dàng sản xuất được trong các tế bào động vật có vú, các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn của tế bào này bao gồm các tế bào

CHO, NS0, HEK293 hoặc COS. Các tế bào chủ được nuôi cấy bằng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Các vectơ chứa trình tự polynucleotit quan tâm (ví dụ, các polynucleotit mã hóa polypeptit của kháng thể và các trình tự điều khiển việc biểu hiện) có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng phương pháp đã biết rõ, mà có thể thay đổi tùy thuộc vào loại tế bào chủ.

Các phương pháp tinh chế protein khác nhau có thể được sử dụng để tinh chế các protein, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể, và các phương pháp như vậy đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án khác của sáng chế, kháng thể, hoặc các axit nucleic mã hóa kháng thể, được tạo ra ở dạng phân lập. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân lập" chỉ protein, peptit hoặc axit nucleic không chứa hoặc hầu như không chứa các đại phân tử bất kỳ khác được phát hiện trong môi trường tế bào. "Về cơ bản là không chứa" như được sử dụng ở đây có nghĩa là protein, peptit, hoặc axit nucleic quan tâm chứa các đại phân tử có mặt với lượng nhiều hơn 80% (trên cơ sở mol), tốt hơn là nhiều hơn 90%, và tốt hơn nữa là nhiều hơn 95%.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc dược phẩm chứa kháng thể này, có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ không giới hạn về đường dùng này là dùng dưới da và dùng trong tĩnh mạch. Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng đơn độc cho bệnh nhân với các chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng theo liều đơn hoặc nhiều liều. Các dược phẩm theo sáng chế theo sáng chế có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press) và chứa kháng thể, như được mô tả ở đây, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bệnh tự miễn" hoặc "rối loạn tự miễn" được sử dụng có thể thay thế nhau ở đây và để chỉ các điều kiện không mong muốn mà phát sinh từ phản ứng miễn dịch không mong muốn hoặc không thích hợp chống lại bản thân các tế bào và/hoặc các mô hoặc các tế bào và/hoặc các mô được ghép. Thuật ngữ "bệnh tự miễn" hoặc "rối loạn tự miễn" có nghĩa là bao gồm các tình trạng bệnh lý như vậy, trong đó chúng được gián tiếp gây ra bởi đáp ứng miễn dịch thể dịch hoặc

đáp ứng miễn dịch tế bào. Các bệnh hoặc các rối loạn tự miễn ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (graft-versus-host disease - GVHD), bệnh thải ghép cơ quan rắn, bệnh viêm mạch, bệnh lupus ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus - SLE), bệnh tiểu đường typ 1 (type 1 diabetes mellitus - T1DM), bệnh đa xơ cứng (multiple sclerosis - MS), bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (giant cell arteritis - GCA), bệnh vảy nến (psoriasis - PsO), bệnh viêm khớp vảy nến (psoriatic arthritis - PsA), bệnh viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis - RA), bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), bệnh viêm loét đại tràng (ulcerative colitis - UC), bệnh viêm cột sống dính khớp (ankylosing spondylitis - AS), hội chứng Sjogren (Sjogren's syndrome - SjS), bệnh viêm gan tự miễn, bệnh xơ cứng bì, bệnh celiac (bệnh không dung nạp gluten), bệnh Addison, bệnh Hashimoto, bệnh Graves, bệnh viêm dạ dày teo/bệnh thiếu máu ác tính, bệnh giảm năng tuyến sinh dục mắc phải/vô sinh, suy tuyến cận giáp, thiếu máu tán huyết dương tính Coombs, các bệnh dị ứng mạn tính (như bệnh hen, bệnh sốt mùa hè, hoặc viêm mũi dị ứng), bệnh Crohn, bệnh vô sinh nam hoặc nữ, hội chứng Behcet, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm cơ tim, bệnh viêm cơ, đau cơ dạng thấp (polymyalgia rheumatic - PMR), sảy thai tự nhiên, bệnh bạch biến, chứng xơ vữa động mạch, bệnh viêm tụy tự miễn, bệnh bọng nước dạng pemphigus, bệnh nhiễm virut mạn tính, và bệnh nhược cơ. Theo sáng chế, các bệnh tự miễn được ưu tiên là bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), bệnh thải ghép cơ quan rắn, bệnh viêm mạch, bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh tiểu đường typ 1 (T1DM), bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (GCA), bệnh vảy nến (PsO), bệnh viêm khớp vảy nến (PsA), bệnh viêm khớp dạng thấp (RA), bệnh viêm ruột (IBD), bệnh viêm loét đại tràng (UC), bệnh viêm cột sống dính khớp (AS), hội chứng Sjogren (SjS), bệnh viêm gan tự miễn, bệnh xơ cứng bì.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng” ngụ ý cộng hoặc trừ mười phần trăm của trị số hoặc khoảng trị số được nêu. Ví dụ: "khoảng" 12, bao gồm các trị số nằm trong khoảng từ 10,8 (gồm cả trị số đầu mút này) đến 13,2 (gồm cả trị số đầu mút này); khoảng 10 phần trăm khối lượng bao gồm cấu phần gồm từ 9 (gồm cả trị số đầu mút này) đến 11 (gồm cả trị số đầu mút này) phần trăm khối lượng; và các dạng tương tự.

"Gắn kết" như được sử dụng ở đây liên quan đến ái lực của kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người đối với PD-1 của người (SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người, tốt hơn là, ECD PD-1 của người như được thể hiện trên SEQ ID NO: 14, được dự tính là để chỉ, trừ khi có quy định khác, K_D bằng khoảng 1 $x10^{-7}$ M, khoảng 1 x 10^{-8} M, khoảng 1 x 10^{-9} M, khoảng 5 x 10^{-9} M, khoảng 1 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Tốt hơn nữa là, kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người theo sáng chế gắn kết với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ 1 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm bằng cách sử dụng cảm biến sinh học SPR ở 25°C hoặc 37°C. Thậm chí tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy sẽ có ái lực đối với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), nằm trong khoảng từ 5 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm bằng cách sử dụng cảm biến sinh học SPR ở 25°C hoặc 37°C. Thậm chí tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy sẽ có các giá trị Kon và Koff đối với ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14) lần lượt là khoảng 1,0 x 10^{-4} đến khoảng 1,0 x 10^{-3} và khoảng 1,3 x 10^5 đến khoảng 2,0 x 10^5, (như được xác định bằng SPR sử dụng trên BIAcore®8K về cơ bản là như được mô tả ở đây).

Trong trường hợp các kháng thể đơn dòng, các thuật ngữ "người", "được làm giống như của người" và "hoàn toàn của người" đã được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này biết rõ (Weiner LJ, *J. Immunother. 2006*; 29: 1-9; Mallbris L, *et al.*, *J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016*; 9: 13–15).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miễn dịch thích ứng" bao gồm nhánh đáp ứng miễn dịch mà, ngược lại với nhánh bẩm sinh của đáp ứng miễn dịch, là đặc hiệu với kháng nguyên và thể hiện các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên thứ cấp, được tăng cường khi tái kích thích bằng chính kháng nguyên này.

Thuật ngữ "việc điều trị" (hoặc "điều trị" hoặc "phép điều trị") chỉ việc làm chậm, làm gián đoạn, làm ngừng, làm thuyên giảm, dừng, giảm, hoặc đẩy lùi sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, rối loạn, tình trạng, hoặc bệnh đã có.

"Lượng hữu hiệu" là lượng kháng thể IgG1 chủ vận kháng PD-1 của người theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa kháng thể như vậy mà sẽ gây ra đáp ứng sinh học hoặc y học hoặc tác dụng điều trị mong muốn trên mô, cơ thể, động vật, động vật có vú hoặc người mà nhà nghiên cứu, bác sĩ, hoặc bác sĩ lâm sàng nhắm đến. Lượng hữu hiệu của kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và khả năng tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể của kháng thể. Lượng hữu hiệu cũng là lượng mà trong đó tác động độc hại hoặc bất lợi bất kỳ của kháng thể nhỏ hơn rất nhiều so với các tác dụng có lợi trong điều trị. Các tác dụng có lợi như vậy bao gồm một hoặc nhiều lợi ích bất kỳ trong số: gia tăng khả năng dung nạp miễn dịch của các cơ quan được ghép; ổn định hóa bệnh hoặc rối loạn tự miễn; hoặc cải thiện các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của rối loạn tự miễn, v.v.. Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng xác định được bằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những trường hợp tương tự. Khi xác định lượng hữu hiệu cho một bệnh nhân, nhiều yếu tố được cân nhắc bởi bác sĩ chẩn đoán, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: kích thước, tuổi tác và sức khỏe chung của bệnh nhân; bệnh hoặc rối loạn cụ thể liên quan; mức độ hoặc tình trạng liên quan hoặc mức độ nặng của bệnh hoặc rối loạn; đáp ứng của từng bệnh nhân; hợp chất cụ thể được sử dụng; phương thức sử dụng; các đặc trưng sinh khả dụng của chế phẩm được sử dụng; phác đồ liều lượng lựa chọn; việc sử dụng thuốc đồng thời; và các tình huống liên quan khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đáp ứng hữu hiệu” của bệnh nhân hoặc “tính đáp ứng” của bệnh nhân đối với việc điều trị là để chỉ lợi ích trên lâm sàng hoặc trong điều trị được truyền cho bệnh nhân khi dùng kháng thể theo sáng chế. Lợi ích như vậy bao gồm một hoặc nhiều lợi ích bất kỳ trong số: tăng khả năng dung nạp miễn dịch của các cơ quan được ghép; ổn định hóa bệnh hoặc rối loạn tự miễn; hoặc cải thiện các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của rối loạn tự miễn, v.v.

Thuận lợi tiềm năng của các phương pháp được bộc lộ ở đây là khả năng tạo ra sự thuyên giảm rõ rệt và/hoặc kéo dài ở bệnh nhân bị rối loạn tự miễn với biên dạng an

toàn chấp nhận được bao gồm khả năng dung nạp, độc tính và/hoặc tác hại chấp nhận được, do đó bệnh nhân nói chung sẽ có lợi từ phương pháp điều trị. Hiệu quả của việc điều trị theo sáng chế có thể được đo bằng các điểm đầu mút mà thường được sử dụng để đánh giá việc điều trị các rối loạn tự miễn khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, American College of Rheumatology (ACR) 20, ACR50, ACR70, Chỉ số độ nặng và diện tích bị vảy nến (Psoriasis Area and Severity Index - PASI) 50, PASI75, PASI90, PASI100, Chỉ số hoạt tính bệnh lupus ban đỏ hệ thống (Systemic Lupus Erythmatosus Disease Activity Index - SLEDAI). Các phương pháp khác để xác định hiệu quả của liệu pháp cụ thể bất kỳ theo sáng chế có thể tùy ý được áp dụng, bao gồm, ví dụ, các dấu chuẩn hoạt hóa tế bào miễn dịch, các tiêu chuẩn đo về mức độ viêm, hiển thị số đo các dấu chuẩn sinh học phụ thuộc chu trình tế bào, và/hoặc số đo đáp ứng thông qua các đánh giá mức độ đau.

Sự tạo thành kháng thể kháng thuốc (Anti-drug antibody – ADA) đối với các sản phẩm sinh học có thể làm giảm hiệu quả của việc điều trị do sự tạo thành các kháng thể trung hòa hoặc dược động học nhanh hơn. Trong một số trường hợp hiếm, ADA còn có thể đi kèm với các vấn đề an toàn. Các bệnh tự miễn là mạn tính, cần việc điều trị kéo dài. Do đó, thường có nhu cầu về các phép điều trị thay thế khi thuốc điều trị sinh học (ví dụ, kháng thể điều trị) không còn tác dụng. Để khắc phục các thử thách về khả năng sinh miễn dịch theo thời gian, việc sử dụng lần lượt các sản phẩm sinh học, thậm chí các sản phẩm hướng cùng một đích, ví dụ các chất ức chế TNF, đã được chấp nhận rộng rãi và được sử dụng làm thực hành điều trị trong lĩnh vực tự miễn (xem, ví dụ, Lloyd, S., et al. (2010) The effectiveness of anti-TNFα therapies when used sequentially in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis. Rheumatology, 49:2313-21).

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa:

1) HCVR chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7; và

2) LCVR chứa LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1. Tốt hơn là, kháng thể như vậy gắn kết với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D

khoảng 1 x 10^{-7} M, khoảng 1 x 10^{-8} M, khoảng 1 x 10^{-9} M, khoảng 5 x 10^{-9} M, hoặc khoảng 1 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Tốt hơn là, kháng thể như vậy gắn kết PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 1 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy gắn kết PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 5 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa:

1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và

2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1. Tốt hơn là, kháng thể như vậy gắn kết với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D khoảng 1 x10^{-7} M, khoảng 1 x 10^{-8} M, khoảng 1 x 10^{-9} M, khoảng 5 x 10^{-9} M, hoặc khoảng 1 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy gắn kết với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 1 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng

hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Thậm chí tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy gắn kết PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 5 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa:

1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và

2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Tốt hơn là, kháng thể như vậy gắn kết với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D khoảng 1 x10^{-7} M, khoảng 1 x 10^{-8} M, khoảng 1 x 10^{-9} M, khoảng 5 x 10^{-9} M, khoảng 1 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy gắn kết với PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 1 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C. Thậm chí tốt hơn nữa là, kháng thể như vậy gắn kết PD-1 của người (tức là, SEQ ID NO: 13) hoặc ECD PD-1 của người (ví dụ, SEQ ID NO: 14), với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 5 x 10^{-8} M đến khoảng 5 x 10^{-10} M như được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc bằng các phương pháp về cơ bản là như được mô tả ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C hoặc 37°C.

Sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa: HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7, LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 và LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa kháng thể kháng PD-1 của người chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa kháng thể kháng PD-1 của người chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: 1) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7, LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1; và 2) thu hồi kháng thể này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người bao gồm các bước: 1) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 và LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1, và 2) thu hồi kháng thể này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: 1) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2; và 2) thu hồi kháng thể

này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người, bao gồm các bước: 1) nuôi cấy tế bào động vật có vú có khả năng biểu hiện kháng thể kháng PD-1 của người chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2; và 2) thu hồi kháng thể này. Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người được sản xuất bằng quy trình này và chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa polynucleotit có trình tự SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc các trình tự SEQ ID NO: 11 và 12. Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN chứa polynucleotit có trình tự SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, hoặc các trình tự SEQ ID NO: 11 và 12.

Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa 1) kháng thể kháng PD-1 của người, chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7, LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1, và 2) chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược dược dụng. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 của người chứa HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 và LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 của người chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 của người chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Vai trò của con đường PD-1 làm điểm kiểm soát tính miễn dịch đã được nghiên cứu chuyên sâu. Đã biết rằng khi con đường PD-1 được kích thích, hoạt tính hệ miễn dịch thường giảm, điều này có thể được khai thác để điều trị các rối loạn tự miễn, cảm ứng dung nạp miễn dịch, và/hoặc giảm bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tự miễn, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR chứa HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7; và 2) LCVR chứa LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ

ID NO: 9, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó kháng thể này là IgG1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tự miễn, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và 2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tự miễn, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và 2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất kháng thể chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo các phương án này, sáng chế còn đề xuất rối loạn tự miễn là GVHD, thải ghép cơ quan rắn, viêm mạch, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, viêm gan tự miễn, bệnh xơ cứng bì, bệnh celiac (bệnh không dung nạp gluten), bệnh Addison, bệnh Hashimoto, bệnh Graves, bệnh viêm dạ dày teo/bệnh thiếu máu ác tính, bệnh giảm năng tuyến sinh dục mắc phải/vô sinh, suy tuyến cận giáp, thiếu máu tán huyết dương tính Coombs, các bệnh dị ứng mạn tính (như bệnh hen, bệnh sốt mùa hè, hoặc viêm mũi dị ứng), bệnh Crohn, bệnh vô sinh nam hoặc nữ, hội chứng Behcet, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm cơ tim, bệnh viêm cơ, đau cơ dạng thấp (polymyalgia rheumatic - PMR), sảy thai tự nhiên, bệnh bạch biến, chứng xơ vữa động mạch, bệnh viêm tụy tự miễn, bệnh bọng nước dạng pemphigus, bệnh nhiễm virut mạn tính, và bệnh nhược cơ.

Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất là kháng thể được dùng kết hợp với các chất điều trị khác được sử dụng để điều trị các rối loạn tự miễn.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người theo sáng chế, để sử dụng trong trị liệu. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và 2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1, để sử dụng trong trị liệu. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, để sử dụng trong trị liệu. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất kháng thể chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất là việc trị liệu này là để điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất rối loạn tự miễn là GVHD, thải ghép cơ quan rắn, viêm mạch, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, viêm gan tự miễn, bệnh xơ cứng bì, bệnh celiac (bệnh không dung nạp gluten), bệnh Addison, bệnh Hashimoto, bệnh Graves, bệnh viêm dạ dày teo/bệnh thiếu máu ác tính, bệnh giảm năng tuyến sinh dục mắc phải/vô sinh, suy tuyến cận giáp, thiếu máu tán huyết dương tính Coombs, các bệnh dị ứng mạn tính (như bệnh hen, bệnh sốt mùa hè, hoặc viêm mũi dị ứng), bệnh Crohn, bệnh vô sinh nam hoặc nữ, hội chứng Behcet, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm cơ tim, bệnh viêm cơ, đau cơ dạng thấp (polymyalgia rheumatic - PMR), sảy thai tự nhiên, bệnh bạch biến, chứng xơ vữa động mạch, bệnh viêm tụy tự miễn, bệnh bọng nước dạng pemphigus, bệnh nhiễm virut mạn tính, và bệnh nhược cơ. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất là kháng thể được dùng kết hợp với chất điều trị khác để điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất là kháng thể được (hoặc sẽ được) dùng kết hợp đồng thời, riêng rẽ, hoặc lần lượt với chất điều trị khác để điều trị rối loạn tự miễn.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người theo sáng chế, để sản xuất thuốc để điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3; và 2) LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, trong đó kháng thể này là IgG1, để sản xuất thuốc để điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 của người chứa: 1) chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1; và 2) chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, để sản xuất thuốc để điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất kháng thể chỉ bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, sáng chế đề xuất thuốc là để điều trị rối loạn tự miễn. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất thuốc là để điều trị GVHD, thải ghép cơ quan rắn, viêm mạch, SLE, T1DM, MS, GCA, PsO, PsA, RA, IBD, UC, AS, SjS, viêm gan tự miễn, bệnh xơ cứng bì, bệnh celiac (bệnh không dung nạp gluten), bệnh Addison, bệnh Hashimoto, bệnh Graves, bệnh viêm dạ dày teo/bệnh thiếu máu ác tính, bệnh giảm năng tuyến sinh dục mắc phải/vô sinh, suy tuyến cận giáp, thiếu máu tán huyết dương tính Coombs, các bệnh dị ứng mạn tính (như bệnh

hen, bệnh sốt mùa hè, hoặc viêm mũi dị ứng), bệnh Crohn, bệnh vô sinh nam hoặc nữ, hội chứng Behcet, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm cơ tim, bệnh viêm cơ, đau cơ dạng thấp (polymyalgia rheumatic - PMR), sảy thai tự nhiên, bệnh bạch biến, chứng xơ vữa động mạch, bệnh viêm tụy tự miễn, bệnh bọng nước dạng pemphigus, bệnh nhiễm virut mạn tính, và bệnh nhược cơ.

Các chế độ liều dùng có thể được điều chỉnh để mang lại đáp ứng mong muốn tối đa (ví dụ, hiệu quả điều trị). Liều lượng điều trị có thể được chuẩn độ để tối ưu hóa độ an toàn và tính hiệu quả. Phác đồ liều dùng, để dùng trong tĩnh mạch (intravenous- i.v.) hoặc không trong tĩnh mạch, dùng dưới da (subcutaneous- s.c.), dùng cục bộ hoặc dùng toàn thân, hoặc các kết hợp các cách dùng này, thường sẽ trong phạm vi từ liều bolus đơn hoặc truyền liên tục để dùng dưới da nhiều lần mỗi tháng, tốt hơn là, không nhiều hơn một lần mỗi ngày, tốt hơn nữa là không nhiều hơn một lần mỗi tuần, thậm chí tốt hơn nữa là không nhiều hơn một lần mỗi hai tuần, thậm chí tốt hơn nữa là không nhiều hơn một lần mỗi tháng hoặc như được chỉ định bởi bác sĩ điều trị và tình trạng của bệnh nhân. Liều lượng và tần suất có thể được xác định bởi bác sĩ điều trị bệnh nhân.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Biểu hiện và tinh chế kháng thể

Các trình tự axit amin của các CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các trình tự axit amin đầy đủ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể 1, và các trình tự nucleotit mã hóa chúng, được liệt kê dưới đây trong mục "Trình tự axit amin và trình tự nucleotit". Ngoài ra, các SEQ ID NO của các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, LCVR, và HCVR của Kháng thể 1 được thể hiện trên bảng 1(a) dưới đây. Hơn nữa, các SEQ ID NO đối với các trình tự axit amin của các CDR của vùng biến đổi HC và vùng biến đổi LC của Kháng thể 1 được thể hiện trên bảng 1(a).

Các kháng thể theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Kháng thể 1, có thể được tạo ra và tinh chế chủ yếu như sau. Tế bào chủ thích hợp như, nhưng không chỉ giới hạn ở, HEK 293 hoặc CHO, có thể được chuyển nhiễm tạm thời hoặc ổn định bằng hệ biểu hiện để tiết các kháng thể sử dụng, ví dụ, vectơ đơn mã hóa để biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc hai vectơ, một vectơ mã hóa chuỗi nặng và

một vectơ mã hóa chuỗi nhẹ (sử dụng tỷ lệ vectơ HC:LC tối ưu đã định trước (như 1:3 hoặc 1:2).

Vì sự biểu hiện hiệu quả của các kháng thể điều trị ở các tế bào động vật có vú thường là yếu tố cốt yếu cho sự thành công về mặt thương mại của kháng thể điều trị, cADN mã hóa Kháng thể 1 được tối ưu hóa bằng cách thử nghiệm nhiều biến thể codon, bao gồm một số biến thể thu được từ các dịch vụ tối ưu hóa codon có bán trên thị trường đối với trình tự tín hiệu và các vùng biến đổi. Các polynucleotit như được thể hiện trên các SEQ ID NO: 11 và 12 lần lượt mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Kháng thể 1, được sử dụng để tạo ra dòng tế bào mà tạo ra một cách hữu hiệu các hiệu giá gia tăng (ví dụ, tốt hơn là, lên tới khoảng 6 lần, tốt hơn nữa là lên tới khoảng 7 lần, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới khoảng 8 lần, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới khoảng 9 lần, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 10 lần, thậm chí tốt hơn nữa là lên tới 11 lần hoặc hơn) so với dòng tế bào CHO tương tự biểu hiện polynucleotit như được thể hiện trong SEQ ID NO:12 và polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của Kháng thể 1 mà không được tối ưu hóa về mặt sử dụng codon trong dòng tế bào CHO ổn định.

Môi trường, mà Kháng thể 1 được tiết vào, có thể được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật thường được sử dụng. Ví dụ, môi trường có thể được đưa lên cột MabSelect (GE Healthcare), hoặc cột KappaSelect (GE Healthcare) dùng cho mảnh Fab, mà đã được cân bằng bằng dung dịch đệm tương thích, như nước muối đệm bằng phosphat (độ pH=7,4). Cột có thể được rửa để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể liên kết có thể được rửa giải, ví dụ, bằng gradien độ pH (như dung dịch đệm Tris 20 mM độ pH=7 đến dung dịch đệm natri xitrat 10 mM độ pH = 3,0, hoặc nước muối được đệm bằng phosphat độ pH=7,4 đến dung dịch đệm glyxin 100 mM độ pH=3,0). Các phân đoạn kháng thể có thể được phát hiện, như bằng cách hấp thụ UV hoặc SDS-PAGE, và sau đó có thể được gom lại. Thể kết tụ và các multime hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, sắc ký đa phương thức, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Kháng thể có thể được cô đặc, trao đổi dung dịch đệm, và/hoặc lọc vô trùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Sản phẩm có thể được bảo quản ở 4°C đến 5°C hoặc được làm lạnh ngay lập tức ở -80°C hoặc có thể được làm đông khô.

Bảng 1(a): Các SEQ ID NO đối với kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người

Kháng thể 1	
Trình tự axit amin đối với:	SEQ ID NO:
Chuỗi nặng	1
Chuỗi nhẹ	2
HCVR	3
LCVR	4
HCDR1	5
HCDR2	6
HCDR3	7
LCDR1	8
LCDR2	9
LCDR3	10
Trình tự ADN mã hóa cho:	SEQ ID NO:
HC	11
LC	12

Bảng 1(b): Các SEQ ID NO đối với các trình tự PD-1

Trình tự axit amin đối với:	SEQ ID NO:
PD-1 của người	13
ECD PD-1 của người	14
PD-1 của khỉ Cynomolgus	15
ECD PD-1 của khỉ Cynomolgus	16

Ví dụ 2: Kháng thể 1 gắn kết với PD-1 của người và của khỉ Cynomolgus trên bề mặt tế bào

Khả năng của các kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người được bộc lộ ở đây trong việc gắn kết với PD-1 của người hoặc của khỉ cynomolgus trên bề mặt tế bào có thể được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm phân tích tế bào theo dòng. Các tế bào ổn định biểu hiện PD-1 của người và của khỉ cynomolgus (tức là, như được thể hiện lần

lượt trên các SEQ ID NO: 13 và 15) được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm ADN plasmit PD-1 của người hoặc của khỉ cynomolgus vào các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO-k1; Lonza) bằng cách sử dụng hệ thống điện chuyển (Gene Pulser Xcell; BioRad) theo các phương thức đã được thiết lập. Các tế bào ổn định được chọn từ các tế bào được phân lập đơn bằng cách sử dụng G418 500 µg/mL (Thermo Scientific) trong môi trường nuôi cấy. Để đếm tế bào theo dòng, các tế bào được chuyển vào đĩa đáy hình chữ V 96 lỗ ở mật độ 1 x 10^5 tế bào/lỗ. Các tế bào được rửa 1 lần bằng dung dịch đệm FACS (Becton Dickinson #554656). Kháng thể 1, hoặc IgG1 của người đối chứng (được pha loãng trong dung dịch đệm FACS theo cách chuẩn độ 12 điểm ba lần đối với kháng thể, bắt đầu ở 100 microgram/mL) được bổ sung (trong 100 microlit) và các tế bào được ủ ở 4°C trong 30 phút.

Sau khi rửa hai lần trong dung dịch đệm FACS, kháng thể thứ cấp mảnh $F(ab')^2$ của dê đặc hiệu kháng mảnh Fcγ, IgG của người, được liên hợp với FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories 109-096-170) được bổ sung ở tỷ lệ pha loãng 1:200 và các tế bào được ủ ở 4°C trong 30 phút. Sau khi rửa hai lần trong dung dịch đệm FACS, việc nhuộm tế bào sống/chết được thực hiện bằng cách sử dụng SytoxBlue (Invitrogen, #S34857) theo phương thức của nhà sản xuất. Các tế bào được xử lý trên thiết bị đếm tế bào theo dòng Fortessa, Fortessa Fx hoặc LSRII. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo. Giá trị cường độ huỳnh quang trung bình hình học (GMFI) được sử dụng để tính EC_{50} tương đối trên cơ sở phương pháp hồi quy logistic 4 thông số.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như nêu trên, Kháng thể 1 có thể gắn kết với PD-1 của người hoặc của khỉ cynomolgus được biểu hiện trên màng tế bào với EC_{50} trung bình lần lượt là 1,30 +/- 0,16 µg/mL và 1,09 +/- 0,30 µg/mL. Dữ liệu này chứng minh rằng Kháng thể 1 có thể gắn kết với cả PD-1 gắn trên màng tế bào của người và PD-1 gắn trên màng tế bào của khỉ cynomolgus với ái lực tương đương.

Ví dụ 3: Động lực/Ái lực gắn kết của Kháng thể 1 đối với ECD PD-1 của người và của khỉ Cynomolgus

Động lực gắn kết của kháng thể chủ vận kháng PD-1 của người theo sáng chế đối với các ECD PD-1 của người và của khỉ cynolmolgus có thể được xác định bằng cách sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt như BIAcore®2000, BIAcore®3000, BIAcore® 8K, hoặc BIAcore® T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Mô tả ngắn gọn là, thiết bị BIAcore® 8K được sử dụng để đo động lực gắn kết của Kháng thể 1 đối với His-miền ngoại bào (ECD)-PD1 của người và của khỉ cynomolgus thông qua cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 25°C. Các mẫu được hòa tan trong 1X HBS-EP+ dung dịch đệm chạy (Teknova cat. # H8022) và chip cảm biến CM5 Series S liên hợp với protein A (GE Healthcare Cat #29139131-AA) được sử dụng để bắt giữ mAb. Các protein ECD-PD1 của người và của khỉ cynomolgus mà chứa 8x thẻ histidin đầu tận cùng C được biểu hiện trên các tế bào CHO và được tinh chế bằng IMAC được nạp niken sau đó là sắc ký loại trừ theo kích thước.

Sự gắn kết được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều chu trình phân tích. Mỗi chu trình được thực hiện ở 25°C với lưu lượng là 10 µl/phút để bắt giữ mAb và 30 µl/phút để liên hợp và phân ly phối tử. Mỗi chu trình bao gồm các bước sau: tiêm mAb ở nồng độ 2 µg/ml trong thời gian tiếp xúc 60 giây hướng đích mức bắt giữ khoảng 220RUs trên tế bào dòng chảy 2, tiêm 150 giây his-ECD-PD1 của người hoặc của khỉ (khoảng nồng độ là từ 400 nM đến 1,6 nM bằng cách pha loãng theo chuỗi bốn lần) sau đó tiêm pha phân ly 600 giây, và hồi phục bằng cách sử dụng glyxin hydroclorua 10 mM, pH = 1,5 trong thời gian tiếp xúc 30 giây. Hằng số kết hợp (tức là, Kon) và hằng số phân ly (tức là, Koff) đối với mỗi chu trình được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp tham chiếu kép tiêu chuẩn và khớp với mô hình "gắn kết 1:1 (Langmuir)" trong phần mềm đánh giá Biacore 8K theo chế độ xử lý lô động lực song song. Ái lực (K_D) được tính từ động lực gắn kết theo hệ thức K_D = Koff/ Kon.

Trong các thử nghiệm tiếp theo, Biacore được sử dụng để đo động lực gắn kết của Kháng thể 1 đối với His- ECD-PD1 của người và của khỉ cynomolgus thông qua phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 37°C bằng BIAcore® T200. Để phân tích ở 37°C, sự gắn kết được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều chu trình phân tích. Mỗi chu trình được thực hiện ở 37°C với lưu lượng là 10 µl/phút để bắt giữ mAb và 100 µl/phút để liên hợp và phân ly phối tử. Mỗi chu trình bao gồm các bước sau: tiêm mAb ở nồng độ 2,5 µg/ml hướng đích mức bắt giữ khoảng 220RUs trên tế bào

dòng chảy 2, tiêm 180 giây his-ECD-PD1 của người hoặc của khỉ (khoảng nồng độ là từ 1000 nM đến 1,6 nM bằng cách pha loãng theo chuỗi 2 lần) sau đó tiêm pha phân ly 600 giây, và hồi phục bằng cách sử dụng glyxin hydroclorua 10 mM, pH = 1,5 trong thời gian tiếp xúc 30 giây. Kon, Koff, và KD được tính về cơ bản là như nêu trên. Dữ liệu ái lực được báo cáo dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn trung bình được xác định từ các phép đo lặp lại ba lần trong ba thử nghiệm độc lập (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 9).

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như nêu trên, Kháng thể 1 gắn kết với his-ECD-PD1 của người và của khỉ cynomolgus như được xác định bằng Biacore ở 25°C (n=1) và ở 37°C (n=9) và như được minh họa trong bảng 2.

Bảng 2. Động lực và ái lực của Kháng thể 1 gắn kết với ECD PD-1

	Loại ECD PD-1	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	KD (nM)
25°C	Người	1,7E+05	1,7E-04	1,0
	Cynomolgus	2,4E+05	1,1E-03	4,7
37°C	Người	$3,07 \pm 0,16 \times 10^{5}$	$7,01 \pm 0,92 \times 10^{-4}$	2,29 ± 0,36
	Cynomolgus	$5,19 \pm 0,52 \times 10^{5}$	$4,89 \pm 0,10 \times 10^{-3}$	9,51 ± 0,85

Như được thể hiện trên bảng 2, Kháng thể 1 gắn kết với cả ECD PD-1 của người và ECD PD-1 của khỉ cynomolgus với ái lực nanomol và chứng minh động lực gắn kết tương đương trên cả ECD PD-1 của người và ECD PD-1 của khỉ cynomolgus.

Ví dụ 4: Kháng thể 1 không phong bế gắn kết của PD-1 với PD-L1 hoặc PD-L2

Khả năng của kháng thể theo sáng chế trong việc phong bế sự gắn kết của PD-1 với PD-L1 và PD-L2 có thể được xác định như sau. Mô tả ngắn gọn là, các tế bào ổn định biểu hiện PD-1 của người được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm ADN plasmit PD-1 của người vào các tế bào CHO-k1 (Lonza) bằng cách sử dụng hệ thống điện chuyển (Gene Pulser Xcell; BioRad) theo các phương thức đã được thiết lập. Các tế bào ổn

định được chọn từ các tế bào được phân lập đơn bằng cách sử dụng G418 500 µg/mL (Thermo Scientific) trong môi trường nuôi cấy. Các kháng thể PD-1 thử nghiệm ở nồng độ 200 µg/mL hoặc bắt đầu ở nồng độ 100 µg/mL sau đó là chuẩn độ kháng thể 7 điểm 12 lần trong dung dịch đệm FACS được ủ ở 4°C trong 30 phút. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS. Các tế bào được tái tạo huyền phù trong 50 µl dung dịch đệm FACS với 20 µg/mL PD-L1 của người được biotinyl hóa (Acros, #PD-1-H82F3) hoặc PD-L2 của người được biotinyl hóa (Abcam, ab198764) và được ủ ở 4°C trong 30 phút. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS, và tái tạo huyền phù trong 100 microlit dung dịch đệm FACS với Streptavidin-APC (BD Bioscienses, #554067) ở mức pha loãng 1:200 trong dung dịch đệm FACS, và được ủ ở 4°C trong 30 phút. Sau khi rửa hai lần trong dung dịch đệm FACS, việc nhuộm tế bào sống/chết được thực hiện bằng cách sử dụng SytoxBlue (Invitrogen, #S34857) theo phương thức của nhà sản xuất. Các tế bào được xử lý trên thiết bị đếm tế bào theo dòng Fortessa, Fortessa Fx hoặc LSRII. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo. Các giá trị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) được sử dụng để tính IC_{50} tương đối dựa trên phương pháp hồi quy logistic 4 thông số.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản là như được mô tả trên đây, Kháng thể 1 và kháng thể đối chứng isotyp không phong bế sự gắn kết với PD-L1 hay PD-L2, IC_{50} của kháng thể đối chứng dương tính, kháng thể đối kháng đặc hiệu với PD-1 (tương đồng với nivolumab), là 0,22 +/- 0,02 µg/mL đối với PD-L1 và 0,42 +/- 0,12 µg/mL đối với PD-L2. Các dữ liệu này chứng minh rằng Kháng thể 1 không phong bế sự gắn kết của PD-1 với PD-L1 hoặc PD-L2.

Ví dụ 5: Kháng thể 1 ức chế sự truyền tín hiệu NFAT cảm ứng bởi sự hoạt hóa thụ thể tế bào T

NFAT (Nuclear factor of activated T cells – yếu tố nhân của tế bào T được hoạt hóa) là yếu tố phiên mã mà đóng vai trò quan trọng trong việc dàn xếp sự hoạt hóa thụ thể tế bào T thành đáp ứng miễn dịch bằng cách điều biến sự biểu hiện của các gen mã hóa các xytokin viêm, ví dụ, TNF, IL-2 cũng như một vài thụ thể bề mặt tế bào. Khả

năng của các kháng thể được bộc lộ ở đây trong việc ức chế sự truyền tín hiệu NFAT cảm ứng bởi sự hoạt hóa thụ thể tế bào T có thể được đo như sau.

Mô tả một cách ngắn gọn là, tế bào T Jurkat được chuyển nhiễm bằng cả gen thông báo luciferaza NFAT và PD-1 của người (Promega) được hoạt hóa bằng kháng thể CD3 của người và các tế bào THP-1 (ATCC®). Các tế bào THP-1 (40.000 tế bào/lỗ) được gieo cấy trong 100 µl vào đĩa 96 lỗ trắng (Corning, #3917). Hai µg/mL kháng thể kháng CD3 của người (OKT3) (eBioscience, #16-0037) và các kháng thể điều trị (Kháng thể 1 hoặc kháng thể đối chứng isotyp) ở nồng độ cuối cùng là 20 µg/mL hoặc sản phẩm chuẩn độ kháng thể 7 điểm năm lần bắt đầu ở 10 µg/mL được bổ sung vào các tế bào THP-1. Các hỗn hợp tế bào và kháng thể được ủ ở 37°C, 5% CO_2 trong 30 phút. Các tế bào thông báo Jurkat luciferaza-NFAT biểu hiện PD-1 (50.000 tế bào/lỗ) được bổ sung vào các hỗn hợp các tế bào THP-1, kháng thể CD3 và kháng thể điều trị trên các đĩa 96 lỗ, và được ủ ở 37°C, 5% CO_2 trong 5 giờ. Kết thúc quá trình ủ, các đĩa được đưa đến nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Tám mươi (80) microlít chất phản ứng BioGlo (Promega, #G7940) được bổ sung vào các lỗ, và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Đo mức phát quang bằng thiết bị LMaxII384 (Molecular Devices) hoặc Envision 2105 (Perkin Elmer).

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây, Kháng thể 1 và kháng thể đối chứng isotyp ức chế hoạt tính tế bào thông báo luciferaza-NFAT PD-1 của người với IC_{50} trung bình từ bốn thử nghiệm độc lập là 75,2 +/- 37,6 ng/mL trong khi đó kháng thể đối chứng isotyp không ức chế đáng kể sự truyền tín hiệu NFAT. Các dữ liệu này chứng minh rằng Kháng thể 1 có khả năng ức chế sự truyền tín hiệu NFAT cảm ứng bởi sự hoạt hóa thụ thể tế bào T.

Ví dụ 6: Kháng thể 1 ức chế sự tăng sinh tế bào T sơ cấp của người

Khả năng của các kháng thể được bộc lộ ở đây trong việc ức chế sự tăng sinh tế bào T cảm ứng bởi sự hoạt hóa thụ thể tế bào T có thể được đo như sau. Mô tả một cách ngắn gọn là, các tế bào đơn nhân máu ngoại biên của người (PBMC) được phân lập từ Trima LRS của người khỏe mạnh (San Diego Blood Bank; San Diego, CA) sử dụng phương pháp ly tâm gradien tỷ trọng Ficoll bằng cách phủ 35 mL máu loãng (dịch pha loãng mười lần trong PBS không chứa canxi hoặc magie) trên 15 mL Ficoll

37°C (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare; #17144002) trong các ống hình nón dung tích 50 mL. Các ống được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút ở tốc độ 900xG. Bề mặt chung tế bào được chuyển vào ống hình nón dung tích 50 mL mới. Thể tích cuối cùng được điều chỉnh đến 50 mL bằng PBS nhiệt độ trong phòng (không chứa canxi hoặc magie). Sau khi rửa hai lần trong PBS, các tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường CTS đầy đủ (Gibco, #A1048501; #A10484-02).

PBMC của người được phân lập được đánh dấu bằng CFSE (Biolegend, cat. #79898). PBMC được rửa ba lần trong môi trường RPMI không chứa huyết thanh. Việc đánh dấu CFSE được thực hiện trong môi trường không chứa huyết thanh với sự có mặt của 1 µM CFSE ở 37°C với 5% CO_2 trong 20 phút. CFSE được chấm dứt bằng môi trường CTS đầy đủ sau đó là bước rửa.

PBMC được đánh dấu bằng CFSE (150.000 tế bào/lỗ) được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa đáy tròn 96 lỗ chứa Kháng thể 1 hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Các tế bào được kích thích bằng 4 ng/mL superantigen (Staphylococcal Enterotoxin, SEB) (Toxin Technologies BT2021MG) trong 72 giờ ở 37°C với 5% CO_2.

Các đĩa sau khi ủ được rửa bằng dung dịch đệm FACS (Miltenyi Biotec; #130-091-221), ủ bằng chất phản ứng phong bế Fc của người (Miltenyi Biotec, #130-059-901) trong 10 phút sau đó bằng cách nhuộm bằng các kháng thể được đánh dấu kháng lại CD4 (Biolegend, #317426) và PD-1 (eBioscience, #17-2799-42) trong 30 phút trên đá. Sau khi rửa trong dung dịch đệm FACS, việc nhuộm tế bào sống/chết được thực hiện bằng cách sử dụng SytoxBlue (Invitrogen, #S34857) theo phương thức của nhà sản xuất. Các tế bào được xử lý trên thiết bị đếm tế bào theo dòng Fortessa X20 với sự có mặt của các hạt CountBright (Invitrogen, #C36950) để định lượng số lượng tế bào. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo. Tổng số tế bào dương tính với CD4 phân chia tuyệt đối được tính bằng cách sử dụng việc nhuộm CFSE và các hạt CountBright.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản như được mô tả trên đây, Kháng thể 1 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào T sơ cấp của người với IC_{50} trung bình là 175 +/- 128 ng/mL đối với tám người cho khác nhau, trong khi đó kháng thể đối chứng isotyp không ức chế sự tăng sinh tế bào T sơ cấp. Các dữ liệu này chứng minh rằng Kháng thể 1 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào T in vitro.

Ví dụ 7: Nghiên cứu sự giải phóng xytokin *In Vitro*

Mục đích của nghiên cứu này là để thử nghiệm liệu Kháng thể 1 có cảm ứng sự giải phóng xytokin từ PBMC của người không được kích thích hay không.

Mô tả một cách ngắn gọn là, PBMC mới được phân lập từ các đối tượng khỏe mạnh được ủ với Kháng thể 1 được liên kết trên đĩa, hoặc các kháng thể đối chứng trong 24 giờ, trong khoảng chuẩn độ từ 0,5 µg đến 1,5 µg. Các mẫu đối chứng dương tính là kháng thể kháng CD3ε của người, OKT3, và thể tương đồng của kháng thể trị liệu siêu chủ vận đặc hiệu với CD28, TGN1412 có bán trên thị trường. Cả hai kháng thể này đều được biết là gây ra hội chứng giải phóng xytokin, một dạng hội chứng đáp ứng viêm toàn thân mà có thể đe dọa đến mạng sống. Mẫu đối chứng âm tính là kháng thể đối chứng isotyp kiểu dại (WT) IgG1 của người. Sử dụng thử nghiệm đa kênh có bán trên thị trường dựa trên nền tảng Mesoscale, năm xytokin bao gồm, IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10, và TNF-α được đo trong dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản là như được mô tả trên đây, việc ủ PBMC của người với Kháng thể 1 không dẫn đến các mức giải phóng xytokin đáng kể đối với IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10, và TNF-α ở nồng độ 0,5, 1, hoặc 1,5 µg/lỗ. Ngược lại, việc ủ PBMC với các kháng thể đối chứng dương tính TGN1412 và kháng CD3ε ở nồng độ 1 µg/lỗ dẫn đến sự sản xuất mạnh IL-2, IFN-γ, IL-10 và TNF-α ở hầu hết đối tượng cho.

Ví dụ 8: Mô hình bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ ở chuột nhắt (Graft-Versus-Host Disease - GVHD) *in vivo*

Mô hình GvHD ghép khác loài trên chuột nhắt được làm giống như của người dựa trên các dòng suy giảm miễn dịch được tiêm PBMC của người ("chuột nhắt Hu-PBMC") là công cụ quan trọng để nghiên cứu chức năng miễn dịch của người *in vivo*. Khả năng của các kháng thể được bộc lộ ở đây trong việc bảo vệ chuột nhắt khỏi GvHD được đánh giá ở mô hình chuột nhắt Hu-PBMC.

Mô tả một cách ngắn gọn là, các con chuột nhắt NSG cái (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, JAX Labs, Stock #05557) được nhốt 3 con mỗi lồng ở 72°C trong

chu kỳ 12 giờ sáng:tối và cho phép dùng thức ăn và nước uống tùy thích (n=78 con). PBMC của người được phân lập từ các ống LRS thu được từ hai người cho (San Diego Blood Bank) sử dụng các ống điều chế SepMate 50 Ficoll theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC). PBMC mới được phân lập được tạo huyền phù trong PBS ở mức 1,2 x 10^8 tế bào/mL và các con chuột nhắt được cấy 100 µL huyền phù PBMC vào trong tĩnh mạch vào ngày 0 (1,2 x 10^7/con chuột); 36 con chuột nhắt nhận PBMC từ Người cho 1, 36 con nhận từ Người cho 2, và 6 con chuột được làm đối chứng không cấy. Các phương thức tiến hành giống nhau được thực hiện đối với mỗi đối tượng cho. Vào ngày 1, các con chuột được chia thành bốn nhóm khớp về khối lượng/đối tượng cho và được dùng liều kháng thể đối chứng isotyp hoặc Kháng thể 1 ở dưới da với liều lượng 0,1, 1,0 hoặc 10,0 mg/kg (200 µL/con chuột). Việc dùng liều tiếp tục hai lần mỗi tuần trong thời gian còn lại của thử nghiệm. Việc kiểm tra sức khỏe và cân khối lượng cơ thể được thực hiện đều đặn. Các con chuột mà giảm đi 20% khối lượng ban đầu của chúng hoặc bị kiệt sức rõ ràng được làm chết nhẹ nhàng. Khi phần lớn số chuột đối chứng isotyp cần được làm chết nhẹ nhàng do sự tiến triển của bệnh, tất cả các con chuột đều được làm chết. Đối với tất cả các con chuột được làm chết nhẹ nhàng, máu được thu gom bằng cách chọc lỗ ở tim, trong điều kiện gây mê bằng isofluran, vào các ống EDTA để phân tích FACS và được làm trong bằng cách ly tâm để phân tích huyết tương. Quan sát khối lượng cơ thể và quan sát lâm sàng: Các con chuột được cân trong tủ hút BSL2 và được đánh giá các dấu hiệu lâm sàng về sự kiệt sức 2 đến 3 lần/tuần. Các dấu hiệu lâm sàng thông thường đối với mô hình này là lông xù, cơ thể gù, gầy còm, thở hoặc cử động khó khăn. Thay đổi khối lượng cơ thể được tính dưới dạng phần trăm khối lượng cơ sở của chúng: (Khối lượng ngày (x)/Khối lượng ngày 0)*100.

Phân tích huyết tương: Máu từ việc chọc lỗ ở tim được thu gom vào các ống được phủ EDTA, làm trong bằng cách ly tâm, và huyết tương thu được được bảo quản ở -80°C để xử lý sau này. Các xytokin huyết tương được đo bằng cách sử dụng Th1/Th2 10-Vplex của người Mesoscale Discovery (Rockville, Maryland) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thống kê Dữ liệu được dựng đồ thị và các số liệu thống kê được tính bằng cách sử dụng phần mềm Prism (GraphPad, San Diego, CA). Chênh lệch về khối lượng giữa

các nhóm được xác định bằng phương pháp RM-ANOVA 2 chiều với kiểm định post hoc Tukey. Chênh lệch về các mức xytokin huyết tương được xác định bằng phương pháp ANOVA 1 chiều với kiểm định post hoc Tukey. Chênh lệch giữa các nhóm thử nghiệm được xem như là đáng kể nếu $p < 0,05$.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản là như được mô tả trên đây, việc cấy PBMC của người từ Người cho 1 hoặc Người cho 2 đã gây ra GvHD như được chứng minh bằng sự hao mòn rõ rệt ở các con chuột NSG. Sự tiến triển của bệnh diễn ra nhanh chóng hơn ở các con chuột được cấy PBMC của Người cho 2 so với của Người cho 1 với sự kết thúc quá trình nghiên cứu do giảm thể trọng đáng kể lần lượt vào ngày 26 và 40. Việc điều trị bằng Kháng thể 1 làm suy giảm một cách đáng kể sự tiến triển của bệnh như được đo bằng sự giảm bớt sự giảm cân ở các con chuột được cấy bằng PBMC của cả hai người cho. Ngoài ra, Kháng thể 1 còn ức chế sự tăng rõ rệt các xytokin Th1 (IFN-γ) và Th2 (IL-13) của người trong huyết tương, sự tăng này đi kèm với sự tiến triển của bệnh. Do đó, Kháng thể 1 làm giảm đáng kể sự tiến triển của bệnh trên mô hình GvHD được làm giống như của người.

Ví dụ 9: Mô hình bệnh viêm thận lupus trên chuột nhắt bị GvHD mạn tính từ chuột gắn gen hPD-1 sang chuột Bm12

GvHD mạn tính (cGvHD) được đặc trưng bằng sự phát triển của các tự kháng thể và bệnh lý tương tự như viêm thận lupus ở người có thể được cảm ứng ở các con chuột Bm12 bằng cách tiêm tế bào lách từ các con chuột nhắt cho biểu hiện PD-1 của người trên nền C57BL/6. Trong thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 9 này, các tế bào lách từ các con chuột nhắt hPD-1 KI (C57BL/6-Pdcd1<tm1606.1) được tiêm vào các con chuột nhắt B6(C)-H2-Ab1bm12/KhEgJ (Bm12). Sau đó, các con chuột nhắt chủ từ từ tiến triển bệnh giống như SLE được đặc trưng bằng sự phát triển các tự kháng thể kháng lại dsADN và sự lắng đọng phức hợp miễn dịch trong thận. Do đó, hoạt tính của kháng thể chủ vận PD-1 có thể được đánh giá trong mô hình bệnh viêm thận lupus này như sau.

Mô tả một cách ngắn gọn là, các con chuột đực có gắn gen PD-1 người (Taconic Laboratories) là 9 tuần tuổi khi mua về và các con chuột đực Bm12 (Jackson Laboratories) là 11 tuần tuổi khi mua về. Tất cả các con chuột này được nhốt 4 con

vào mỗi lồng và để thích nghi trong 1 tuần trước khi bắt đầu nghiên cứu. Các con chuột này được cho ăn với chế độ ăn Teklad Global Rodent Diet 2014 (Harlan) và dùng nước tùy thích. Các con chuột được nhốt trong chu kỳ 12 giờ sáng/tối với nhiệt độ môi trường đặt ở 68 đến 79°F. Bốn ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu, các con chuột được phân loại ngẫu nhiên dựa trên khối lượng cơ thể và 75 µl máu toàn phần được thu gom thông qua khía đuôi. Huyết thanh được phân tách từ máu toàn phần bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút và được sử dụng để định lượng hiệu giá kháng dsADN. Sau đó các con chuột được phân phối vào các nhóm điều trị sau đây: (1) 10,0 mg/kg kháng thể đối chứng isotyp hIgG1, (2) 1,0 mg/kg Kháng thể 1, (3) 10,0 mg/kg Kháng thể 1. Các con chuột được dùng dưới da kháng thể đối chứng isotyp IgG1 của người hoặc Kháng thể 1 hai lần mỗi tuần bắt đầu từ Ngày 0. Các mẫu huyết thanh được thu thập thông qua khía đuôi từ các con chuột sau mỗi 2 tuần cho đến khi kết thúc nghiên cứu 42 ngày sau khi bắt đầu điều trị.

Các mức kháng dsADN huyết thanh được đo bằng phương pháp ELISA thông thường. Các đĩa (96 lỗ) được phủ qua đêm ở 4°C bằng 10 µg/ml ADN tuyến ức bê (R&D Systems). Sau khi rửa bằng PBS-Tween (0,05%), 2 µl mẫu được bổ sung (tỷ lệ pha loãng 1:100) và được pha loãng theo chuỗi 1:3. Sau 2 giờ ủ ở nhiệt độ trong phòng, các đĩa được rửa và kháng thể của dê kháng IgG của chuột nhắt (Jackson ImmunoResearch) được bổ sung ở tỷ lệ pha loãng 1:2000 trong 90 phút. Các đĩa được rửa và Ultra-TMB (ThermoSci Pierce) được bổ sung trong 15 phút và phản ứng được chấm dứt bằng dung dịch H_2SO_4 1N. Các giá trị OD được đọc ở bước sóng 450 nm và các giá trị EC_{50} được tính.

Trong các thử nghiệm được thực hiện về cơ bản là như được mô tả trên đây trong ví dụ 9, các hiệu giá của các tự kháng thể kháng lại ADN sợi kép (kháng dsADN) được giảm đi với việc điều trị bằng Kháng thể 1 theo cách thức phụ thuộc liều dùng trong khóa nghiên cứu. Ở liều lượng Kháng thể 1 là 1 mg/kg và 10 mg/kg, sự giảm các mức kháng dsADN là có ý nghĩa thống kê từ nhóm đối chứng isotyp IgG1 của người ở các ngày 28 và 42. Các diện tích dưới đường cong (AUC) kháng dsADN cũng được giảm phụ thuộc liều dùng Kháng thể 1. Kháng thể 1 ở mức liều 10 mg/kg có thể giảm AUC kháng dsADN một cách đáng kể so với nhóm đối chứng isotyp IgG1

của người. Do đó, Kháng thể 1 có thể giảm đáng kể sự tiến triển của bệnh trên mô hình cGvHD của bệnh lupus.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit

Chuỗi nặng của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGII
YTSGYTDYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGNPYYT
NGFNSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Chuỗi nhẹ của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSPNNLLAWYQQKPGKAPKLLIYGASD
LPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNNYYVGPVSYAFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

Vùng biến đổi của chuỗi nặng của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 3)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYSLSKYDMSWVRQAPGKGLEWMGII
YTSGYTDYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGNPYYT
NGFNSWGQGTLVTVSS

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSPNNLLAWYQQKPGKAPKLLIYGASD
LPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNNYYVGPVSYAFGGGTKV
EIK

HCDR1 của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 5)

KVSGYSLSKYDMS

HCDR2 của Kháng thể 1 (SEQ ID NO:6)

IIYTSGYTDYAQKFQG

HCDR3 của Kháng thể 1 (SEQ ID NO:7)

ATGNPYYTNGFNS

LCDR1 của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 8)

QASQSPNNLLA

LCDR2 của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 9)

YGASDLPS

LCDR3 của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 10)

QNNYYVGPVSYA

ADN mã hóa chuỗi nặng của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 11)

caagtgcagttggtgcagtcgggggcagaagtgaaaaagcccggcgcttcggtgaaagtgtcctgcaaagtgtccggcta
ttctttgtccaaatacgacatgtcatgggtcagacaggctcccggaaagggtctggagtggatggggattatctatacatccg
gctacaccgattacgcccaaaagttccaggggagagtcaccatgactgaggatacgtccaccgacaccgcctacatggaa
ctgtccagcctgcggtccgaggacactgcggtgtactactgcgcgaccggaaacccatactacaccaatggattcaatagct
ggggacagggtactcttgtgacggtgtccagcgcctccaccaagggcccatcggtcttcccgctagcaccctcctccaaga
gcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactca
ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc

gtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaa
agttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttc
ctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccac
gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagc
agtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag
gtgtacaccctgcccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccc
agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcccccgtgctggactcc
gacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtga
tgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

ADN mã hóa chuỗi nhẹ của Kháng thể 1 (SEQ ID NO: 12)

gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtgggagacagagtcaccatcacttgccaggccagtcaga
gccctaataacctcctggcctggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatggtgcatccgatctgcc
atctggggtcccatcaaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaagattt
tgcaacttactactgtcagaacaattattatgtgggaccagtgagctatgctttcggcggagggaccaaggtggagatcaagc
ggaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgct
gaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgt
cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgc

Trình tự axit amin của PD-1 của người (SEQ ID NO: 13)

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNAT
FTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR
DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS
PSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLK
EDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPAR
RGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

Trình tự axit amin của ECD PD-1 của người (SEQ ID NO: 14)

LDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTD
KLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLA
PKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ

Trình tự axit amin của PD-1 của khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 15)

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNAT
FTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGR
DFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS
PSPRPAGQFQALVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAAQGTIEARRTGQPLK
EDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPAPCVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPAR
RGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL

Trình tự axit amin của ECD PD-1 của khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 16)

LESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQTD
KLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAP
KAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQ

Trình tự axit amin của IgG1 của người (SEQ ID NO: 17):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin của kappa kiểu dại của người (SEQ ID NO: 18)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

Trình tự axit amin của lamda kiểu dại của người (SEQ ID NO: 19)

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể mà gắn kết với PD-1 của người, chứa: 1) vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR); và 2) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó HCVR bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và LCVR bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó trình tự axit amin của HCDR1 là SEQ ID NO:5, trình tự axit amin của HCDR2 là SEQ ID NO:6, và trình tự axit amin của HCDR3 là SEQ ID NO:7, trình tự axit amin của LCDR1 là SEQ ID NO:8, trình tự axit amin của LCDR2 là SEQ ID NO:9, và trình tự axit amin của LCDR3 là SEQ ID NO:10.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO:3 và trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO:4.

3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này là chất chủ vận PD-1 của người.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là chất chủ vận PD-1 của người như được xác định trong mô hình *in vivo* đối với bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), bệnh thải ghép cơ quan rắn, bệnh viêm mạch, bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh tiểu đường typ 1 (T1DM), bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (GCA), bệnh vảy nến (PsO), bệnh viêm khớp vảy nến (PsA), bệnh viêm khớp dạng thấp (RA), bệnh viêm ruột (IBD), bệnh viêm loét đại tràng (UC), bệnh viêm cột sống dính khớp (AS), hội chứng Sjogren (SjS), bệnh viêm gan tự miễn, bệnh xơ cứng bì và/hoặc viêm thận lupus.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này gắn kết với họ thụ thể Fc-gamma (FcγR).

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này là IgG1.

7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO:3 và trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO:4.

8. Kháng thể theo điểm 6 hoặc 7, trong đó kháng thể này chứa: 1) chuỗi nặng (HC); và 2) chuỗi nhẹ (LC), trong đó trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO:1, và trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO:2.

9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó kháng thể này chứa hai HC và hai LC, trong đó trình tự axit amin của mỗi HC trong số các HC là SEQ ID NO:1, và trình tự axit amin của mỗi LC trong số các LC là SEQ ID NO:2.

10. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> KHÁNG THỂ MÀ GẮN KẾT VỚI PD-1 CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> X21715

<150> 62/637,643
<151> 2018-03-02

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Leu Ser Lys Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Thr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Thr Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Asn Gly Phe Asn Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

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

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

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

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

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

Lys

<210> 2
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Pro Asn Asn Leu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Tyr Val Gly Pro

85 90 95

Val Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Leu Ser Lys Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Thr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

50 55 60

Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Thr Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Asn Gly Phe Asn Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Pro Asn Asn Leu
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Val Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 5

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

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Lys Val Ser Gly Tyr Ser Leu Ser Lys Tyr Asp Met Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Ile Ile Tyr Thr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
1 5 10 15

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Ala Thr Gly Asn Pro Tyr Tyr Thr Asn Gly Phe Asn Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Gln Ala Ser Gln Ser Pro Asn Asn Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 8
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Tyr Gly Ala Ser Asp Leu Pro Ser
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Gln Asn Asn Tyr Tyr Val Gly Pro Val Ser Tyr Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11
caagtgcagt tggtgcagtc gggggcagaa gtgaaaaagc ccggcgcttc ggtgaaagtg 60

tcctgcaaag tgtccggcta ttctttgtcc aaatacgaca tgtcatgggt cagacaggct 120

cccggaaagg gtctggagtg gatggggatt atctatacat ccggctacac cgattacgcc 180

caaaagttcc aggggagagt caccatgact gaggatacgt ccaccgacac cgcctacatg 240

gaactgtcca gcctgcggtc cgaggacact gcggtgtact actgcgcgac cggaaaccca 300

tactacacca atggattcaa tagctgggga cagggtactc ttgtgacggt gtccagcgcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttcccgcta gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggacgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc ccccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 12
<211> 651
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc aggccagtca gagccctaat aacctcctgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccgatc tgccatctgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagaac aattattatg tgggaccagt gagctatgct 300

ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaag cggaccgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg c 651

<210> 13
<211> 288
<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 13

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 14
<211> 143
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 14

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

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

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
35 40 45

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

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

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

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln

130 135 140

<210> 15
<211> 288
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 15

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Ala Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Gln Gly Thr Ile Glu Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Ala Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Leu Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Pro Arg Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 16
<211> 143
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 16

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

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

Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
35 40 45

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

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

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

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln
130 135 140

<210> 17
<211> 330
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 18

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 19
<211> 106
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 19

Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105