(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) **1-0047720**

(51)[2020.01] **A61K 39/395**; A61P 35/02; C07K 16/18; G01N 33/68; C12N 5/20; G01N 33/574; G01N 33/577; A61P 35/00; C12N 15/13

(13) **B**

(21) 1-2022-01215
(22) 31/07/2020
(86) PCT/CN2020/106219 31/07/2020
(87) WO 2021/023108 11/02/2021
(30) 201910711138.5 02/08/2019 CN; 201911105711.4 13/11/2019 CN; 201911105715.2 13/11/2019 CN; 201911133858.4 19/11/2019 CN
(45) 25/06/2025 447
(43) 26/09/2022 414A
(73) CTTQ-AKESO (SHANGHAI) BIOMED. TECH. CO., LTD. (CN)
Room A1001, Building 3, No. 2288, Shitai Road, Baoshan District Shanghai 201908, China
(72) WANG, Zhongmin (US); ZHANG, Peng (CN); LI, Baiyong (US); XIA, Yu (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

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

(21) 1-2022-01215

(57) Sáng chế đề cập tới lĩnh vực điều trị khối u và miễn dịch phân tử, và cụ thể là, đề cập tới kháng thể kháng PD-1. Cụ thể là, sáng chế đề cập tới kháng thể đơn dòng, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng bao gồm CDR có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19–SEQ ID NO: 21, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng bao gồm CDR có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22–SEQ ID NO: 24; trong đó theo hệ đánh số EU, vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm đột biến ở vị trí bất kỳ 2 hoặc 3 trong số các vị trí 234, 235 và 237, và hằng số ái lực của kháng thể với FcγRIIIa và/hoặc C1q giảm đi sau khi có đột biến so với hằng số này trước khi có đột biến. Kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể gắn kết tốt và đặc hiệu với PD-1, đặc biệt làm giảm nhẹ sự ức chế miễn dịch của PD-1 ở sinh vật và hoạt hoá tế bào lympho T.

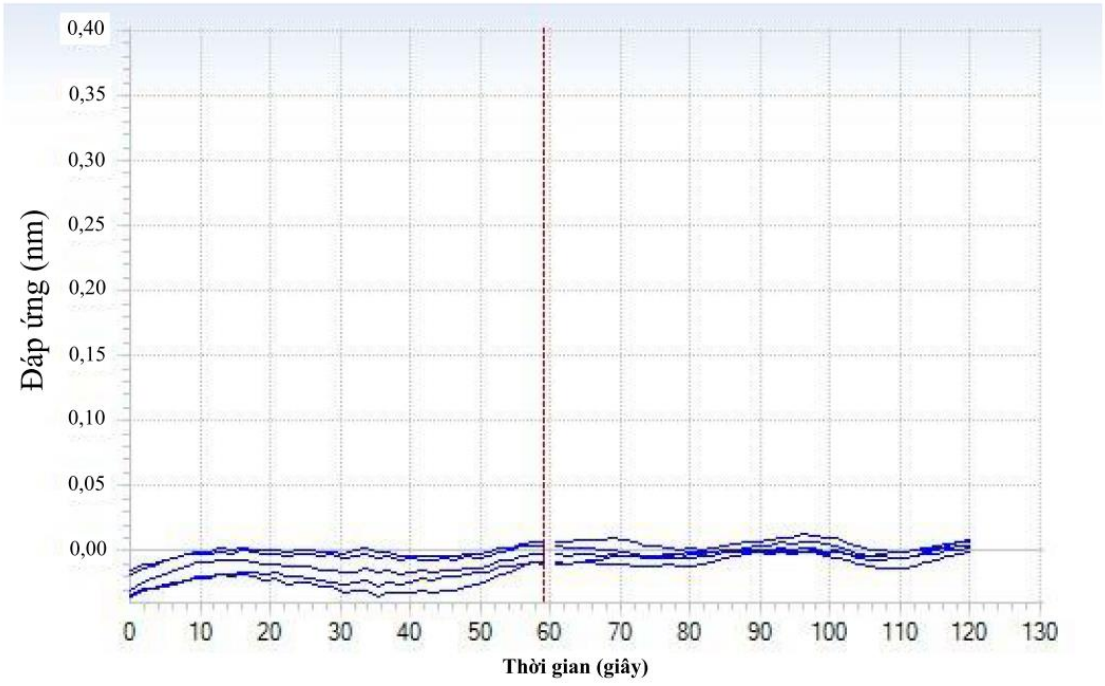


FIG. 34

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới lĩnh vực điều trị khối u và miễn dịch phân tử, và cụ thể là, đề cập tới kháng thể kháng PD-1 và ứng dụng dược của chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập tới kháng thể kháng PD-1 đột biến.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể qua màng PD-1 (protein chết tế bào theo chương trình 1) là thành viên của họ CD28, và được biểu hiện ở tế bào dạng tuỷ, tế bào B và tế bào T hoạt hoá. Cả phối tử của PD-1, PDL1 (phối tử chết tế bào theo chương trình 1, hoặc PDL-1) và PDL2 (phối tử chết tế bào theo chương trình 2, hoặc PDL-2), là thành viên của siêu họ B7. PDL1 được biểu hiện ở nhiều tế bào bao gồm tế bào T, tế bào B, tế bào nội mạc và tế bào biểu mô, và PDL2 chỉ được biểu hiện ở tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào dạng nhánh và đại thực bào.

Con đường tín hiệu PD-1/PDL1 đóng vai trò quan trọng trong điều tiết tính dung nạp miễn dịch, bệnh nhiễm khuẩn và sự thoát khỏi miễn dịch của khối u. PD-1 chủ yếu được biểu hiện ở tế bào miễn dịch như tế bào T, và phối tử PDL1 của PD-1 được biểu hiện mức cao ở nhiều mô khối u ở người. Phong bế con đường tín hiệu PD-1/PDL1 có thể hoạt hoá tế bào T bị ức chế, mà do đó tấn công tế bào ung thư. Phong bế tín hiệu PD-1/PDL1 có thể thúc đẩy sự tăng sinh tế bào T đặc hiệu kháng nguyên khối u, hoạt hoá quá trình diệt tế bào khối u và ức chế hơn nữa sự tăng trưởng khối u cục bộ (Julie R et al., 2012, *N Engl J Med.*, 366:2455–2465).

PD-1/PD-L1 là điểm kiểm tra miễn dịch đặc hiệu quan trọng. Sự tạo thành phức hợp PD-1/PD-L1 truyền tín hiệu ức chế và điều hoà âm đáp ứng miễn dịch của tế bào T. Nó ức chế sự hoạt hoá tế bào T qua trung gian-TCR, sản xuất xytokin và sự tăng sinh tế bào T (Fife et al., (2011) *Nature Immunology* 10:1185–1193), gây suy kiệt hoặc suy nhược ở tế bào T đặc hiệu kháng nguyên tương đồng (Hofmeyer et al., (2011) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011:1–9), thúc đẩy sự biệt hoá tế bào Th1 thành tế bào T điều hoà Foxp3+ (Armanath et al., (2011) *Science Trans. Med.*, 3:1–13; Francisco et al., (2009) *J. Exp. Med.*, 206:3015–3029), và gây chết

theo chương trình của tế bào T hiệu ứng. Sự phá vỡ gen PD-L1 dẫn đến đáp ứng tế bào T được điều tiết tăng và sản xuất tế bào T phản ứng tự động (Latchman et al., (2004) *PNAS*, 101:10691–10696). Phong bế PD-1 hoặc PD-L1 bởi kháng thể dẫn đến tính miễn dịch kháng khối u gia tăng (Iwai et al., (2002) *PNAS*, 99:12293–12297).

Trong vòng gần 20 năm qua, các nhà nghiên cứu đã rất nỗ lực phát triển chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch đặc hiệu, hy vọng là cung cấp phác đồ miễn dịch trị liệu mới để điều trị bệnh ung thư. Trong số này, hệ thống miễn dịch tế bào lympho T bẩm sinh có thể đáp ứng với nhiều kháng nguyên khối u khác nhau do khả năng chống ung thư cao và tính đặc hiệu chính xác và rộng của nó. Liệu pháp miễn dịch ung thư mới này tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng khối u bằng cách chuyển tế bào hiệu ứng đã hoạt hoá, gây miễn dịch kháng lại kháng nguyên liên quan, hoặc cung cấp chất kích thích miễn dịch không đặc hiệu. Do đó, chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch đặc hiệu PD-1/PD-L1 có tiềm năng để điều trị bệnh ung thư liên quan.

Cơ chế tác dụng của kháng thể kháng PD-1 là phong bế sự gắn kết của protein PD-1 trên bề mặt của tế bào miễn dịch với phối tử PDL1 hoặc PDL2 của chúng, và để hoạt hoá tế bào miễn dịch tiêu diệt khối u. Hiện nay, vẫn có nhu cầu phát triển kháng thể kháng PD-1 mới để làm giảm hoặc loại bỏ tổn thương gây ra bởi hoạt tính ADCC, ADCP và/hoặc CDC qua trung gian kháng thể ở tế bào miễn dịch mà kháng thể kháng PD-1 gắn kết vào, và để cải thiện hiệu quả của liệu pháp kháng thể. ADCC (độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể) đề cập đến việc tiêu diệt tế bào đích bởi tế bào giết tự nhiên (tế bào NK, đại thực bào, v.v.) mà được điều tiết bởi sự gắn kết của mảnh Fab của kháng thể với epitop của tế bào bị lây nhiễm virut hoặc tế bào khối u và sự gắn kết của mảnh Fc của kháng thể với thụ thể Fc (FcR) trên bề mặt của tế bào giết.

CDC (độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể) đề cập đến tác dụng phân giải tế bào đích bởi phức hợp tấn công màng mà được tạo thành bằng cách gắn kết hàng loạt kháng thể với kháng nguyên tương ứng trên bề mặt của màng tế bào và C1q bổ thể và hoạt hoá C2-C9.

Thụ thể Fc thuộc họ globulin miễn dịch mà được biểu hiện trên bề mặt của tế bào miễn dịch đặc hiệu để nhận biết vùng Fc của kháng thể và điều tiết đáp ứng miễn dịch. Sau khi vùng Fab nhận biết kháng nguyên, vùng Fc của kháng thể gắn kết với

thụ thể Fc ở tế bào miễn dịch (ví dụ, tế bào giết) để khởi đầu chức năng đáp ứng của tế bào miễn dịch, như thực bào và ADCC.

Theo kiểu kháng thể được nhận biết bởi thụ thể Fc và kiểu tế bào biểu hiện, thụ thể Fc chủ yếu được phân loại thành ba kiểu, FcγR, FcαR và FcεR. FcγR có thể được phân loại tiếp thành bốn kiểu phụ, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) và FcRn (thụ thể Fc mới sinh). Trong số này, FcγRI, FcγRII và FcγRIII liên quan chặt chẽ với tác dụng ADCC. FcγRIII là ADCC điều tiết phân tử nổi trội nhất, có hai kiểu phụ rất tương đồng, FcγRIIIa và FcγRIIIb, ở kiểu tế bào khác nhau. Trong quần thể FcγRIIIa, hai kiểu phụ được phân biệt bởi vị trí có tính đa hình nucleotit đơn nhất (SNP), FcγRIIIa_V158 có ái lực cao và FcγRIIIa_F158 có ái lực thấp, là có mặt. FcγRI có ái lực cao hơn đối với vùng Fc của IgG và tham gia vào quá trình ADCC; FcγRII bao gồm ba kiểu phụ, FcγRIIa, FcγRIIb và FcγRIIc (còn được gọi lần lượt là CD32a, CD32b và CD32c), trong số này FcγRIIa có hoạt tính ADCC; đối với FcγRIIa, hai kiểu phụ, FcγRIIa_H131 và FcγRIIa_R131, có mặt ở người do đột biến nucleotit đơn nhất; FcγRIIb là thụ thể ức chế, và là FcγR ức chế điển hình mà ức chế con đường ITAM gần đó. Ví dụ, sau khi gắn kết phức hợp miễn dịch với BCR, mảnh Fc gắn kết với FcγRIIb ở cùng tế bào, điều hoà âm hoạt hoá tế bào B và làm giảm tiết kháng thể và xytokin (Hogarth PM, Pietersz GA., 2012, *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY*, 11(4):311–331).

Họ IgG bao gồm bốn thành viên, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, mà khác biệt về axit amin ở vùng có thể kết tinh dạng mảnh (Fc) của vùng ổn định chuỗi nặng, dẫn đến ái lực khác nhau của chúng đối với FcγR. IgG1 là kiểu phụ có nhiều nhất ở người và cũng là kiểu phụ hay gặp nhất được sử dụng trong thuốc kháng thể đơn dòng. IgG1 có khả năng gắn kết các FcγR khác nhau và có thể gây cảm ứng tác dụng ADCC và CDC. IgG2 có ái lực thấp nhất đối với FcγR, mà vẫn có thể gây cảm ứng ADCC qua trung gian bạch cầu đơn nhân bằng cách gắn kết với FcγRIIa. IgG3 thể hiện khả năng gắn kết cao nhất với FcγR, và có thể gây cảm ứng ADCC và tác dụng CDC mạnh hơn IgG1. Phân tử IgG4 cho thấy sự gắn kết yếu với FcγR ngoài FcγRI, có xác suất thấp gây CDC và ADCC qua trung gian tế bào NK. Tuy nhiên, kháng thể của kiểu phụ IgG4 có thể điều tiết tác dụng ADCP thông qua gắn kết với FcγRI, và tác dụng ADCP, có mặt ở liệu pháp kháng thể hướng đích tế bào miễn dịch, có thể gây tổn thương đối

với tế bào miễn dịch, gây ra tác dụng bất lợi về mặt dược lý. Zhang et al. (Zhang T et al, *Cancer Immunol Immunother.*, 2018; 67(7):1079–1090.) và Dahan et al. (Dahan R et al., *Cancer cell*, 2015, 28(3):285–95.) đã báo cáo là sự gắn kết của mảnh Fc của kháng thể hướng đích điểm kiểm tra miễn dịch như PD-1 và CTLA-4 với thụ thể Fc có ảnh hưởng âm đến hoạt tính chống ung thư qua trung gian-kháng thể, có thể là do tổn thương tế bào miễn dịch được cảm ứng bởi-chức năng hiệu ứng phụ thuộc Fc bao gồm độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, trong đó sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) là cơ chế quan trọng dẫn đến tổn thương tế bào miễn dịch.

Bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ không phải tế bào vảy (NSCLC) và bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ tế bào vảy (sNSCLC) đều là thể ác tính mô phổi. Chiến lược trị liệu hiện nay bao gồm phẫu thuật giai đoạn sớm. Tuy nhiên, phần lớn bệnh nhân ung thư phổi được chẩn đoán là ở giai đoạn tiến triển, thể hiện đáp ứng kém đối với phẫu thuật và xạ trị. Do đó, hoá trị liệu đã trở thành cách điều trị quan trọng. Hiện nay, hoá trị liệu platin kết hợp và hoá trị liệu khác vẫn là hoá trị liệu hàng đầu đối với bệnh ung thư phổi bao gồm sNSCLC tiến triển và NSCLC (Pfister DG. et al., *J. Clin. Oncol.*, 2003, 22:330; De Ruysscher et al., (2006) *Annals of Oncology*, 17:543-552).

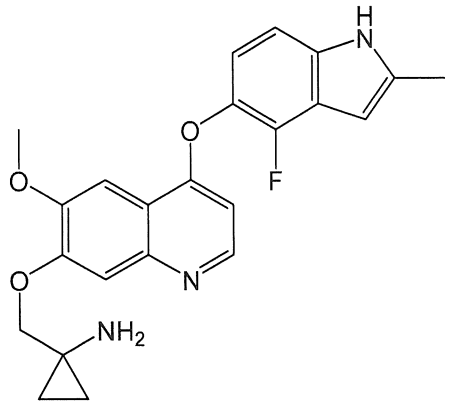
Hiện nay, hoá trị liệu chủ yếu được phân loại thành chín nhóm sau (He Jie, et al., *Clinical Oncology*, Beijing, People's Medical Publishing House, 2016:230–237). Nhóm đầu tiên là thuốc gắn kết trực tiếp với DNA và ngăn sự sao chép DNA, bao gồm tác nhân alkyl hoá khác nhau, mitomycin, bleomycin, dacarbazin, thuốc gốc platin (ví dụ, cisplatin và carboplatin), camptothecin, và dẫn xuất của chúng. Nhóm thứ hai là thuốc để ngăn sự sinh tổng hợp axit nucleic, mà chủ yếu tác động đến hệ thống enzym của tế bào khối u và phong bế sự tổng hợp tiền chất của DNA và RNA, nhờ đó ức chế sự tạo thành DNA hoặc RNA, bao gồm methotrexat, flouracil, 6-mercaptopurin, hydroxyure và cytarabin; thuốc này tác dụng chủ yếu lên tế bào ở pha S, và là thuốc hoá trị liệu chống chuyển hoá và thuốc chống ung thư đặc hiệu-chu trình tế bào. Nhóm thứ ba là thuốc hoá trị liệu mà ảnh hưởng đến sự phiên mã thông qua cơ chế dược lý mà thuốc được cài xen vào DNA sợi kép để tạo thành sự gắn kết không phải cộng hoá trị với DNA sợi kép, can thiệp vào quá trình phiên mã của thông tin di truyền trên DNA thành mRNA phụ thuộc DNA và gây ảnh hưởng đến chức

năng khuôn mẫu và cản trở sự phiên mã. Nhóm thứ tư là nhóm tác động đến tubulin và sự phân bào có tơ, bao gồm vinca alkaloid, podophyllotoxin và taxan. Nhóm thứ năm là thuốc tác động đến chức năng của ribosom và phong bế sự tổng hợp protein; đại diện của thuốc này là harringtonin, mà chức chế sự khởi đầu quá trình tổng hợp protein, phân huỷ ribosome và giải phóng chuỗi peptit mới, nhưng không phong bế sự gắn kết của mRNA và tRNA với ribosom; thuốc này làm giảm DNA của nhân và RNA ở bào tương và khử polyme hoá polysom, và ức chế sự phân bào có tơ. Nhóm thứ sau là thuốc mà tác động đến màng tế bào khối u như concanavalin (Con-A) và phytohemagglutinin (PHA); chúng có thể gắn kết thụ thể glycoprotein trên màng tế bào, nhờ đó tác động đến sự tổng hợp DNA ở tế bào khối u và ngăn không cho tế bào khối u phân chia. Nhóm thứ bảy là thuốc gây cảm ứng chết theo chương trình, như arsen trioxit. Nhóm thứ tám là hormon điều trị khối u bằng cách điều hoà hệ nội tiết, bao gồm estrogen, antiestrogen, progestogen, androgen, antiandrogen, corticosteroid, và anticorticosteroid (bao gồm diclodiphenyldicloetan và aminoglutethimit). Nhóm thứ chín là liệu pháp hướng đích chống ung thư, bao gồm kháng thể đơn dòng, chất ức chế tín hiệu yếu tố tăng trưởng biểu bì (ví dụ, thuốc hướng đích kháng lại con đường thụ thể tyrosin kinaza), chất ức chế ubiquitin-proteasome, và chất ức chế sinh mạch. Tuy nhiên, ngoài tiêu diệt tế bào khối u, hoá trị liệu cũng gây tổn thương cho tế bào bình thường của người, vì vậy phác đồ hoá trị liệu thông thường cho bệnh nhân ung thư thường gây ra độc tính và tác dụng phụ nghiệm trọng. Quan trọng hơn là, ngoài độc tính rõ ràng, hoá trị liệu chỉ cho kiểm soát thời gian ngắn đối với bệnh và tỷ lệ sống sót 5 năm ở mức thấp ở bệnh nhân dùng hoá trị liệu. Do đó, phát triển thuốc hoặc liệu pháp kết hợp có độc tính thấp hơn và hiệu lực cao hơn là có ý nghĩa đáng kể.

Anlotinib là chất ức chế tyrosin kinaza dẫn xuất quinolin. Đối với chất ức chế tyrosin kinaza hướng nhiều đích (TKI), chất này tác động đến sự sinh mạch và tải nạp tín hiệu tăng sinh của khối u. Đích chính bao gồm: thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch tyrosin kinaza (VEGFR) từ 1 đến 3, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGFR) từ 1 đến 4, thụ thể yếu tố tăng trưởng thu được từ tiểu cầu (PDGFR) α và β, và thụ thể yếu tố tế bào gốc (SCFR) 7, 8 và 9. Thử nghiệm pha 2 cho thấy là anlotinib cải thiện tỷ lệ sống sót không có bệnh tiến triển kèm theo lợi ích tiềm năng cho tỷ lệ sống sót tổng thể (Han B, et al., *Br J*

Cancer, 2018; 118(5):654–661). Thử nghiệm lâm sàng pha 3 ngẫu nhiên, mù kép, đa tâm cho thấy là anlotinib cho kết quả tỷ lệ sống sót không có bệnh tiến triển và tỷ lệ sống sót tổng thể kéo dài ở bệnh nhân Trung quốc. Kết quả này gợi ý là anlotinib được dung nạp tốt và là thuốc điều trị hàng thứ ba tiềm năng hoặc điều trị tiếp cho bệnh nhân mắc NSCLC (Han B, et al., *JAMA Oncol.*, 2018 Nov.; 4(11):1569–1575).

Ví dụ 24 của WO2008112407 đề cập đến chất ức chế tyrosin kinaza dẫn xuất-quinolin 1-[[[4-(4-flo-2-metyl-1*H*-indol-5-yl)oxy-6-metoxyquinolin-7-yl]oxy]metyl]xyclopropylamin và phương pháp điều chế nó. Công thức cấu trúc của chất ức chế tyrosin kinaza dẫn xuất quinolin được thể hiện trong công thức I. Anlotinib hydroclorua là muối hydroclorua của hợp chất có công thức I.

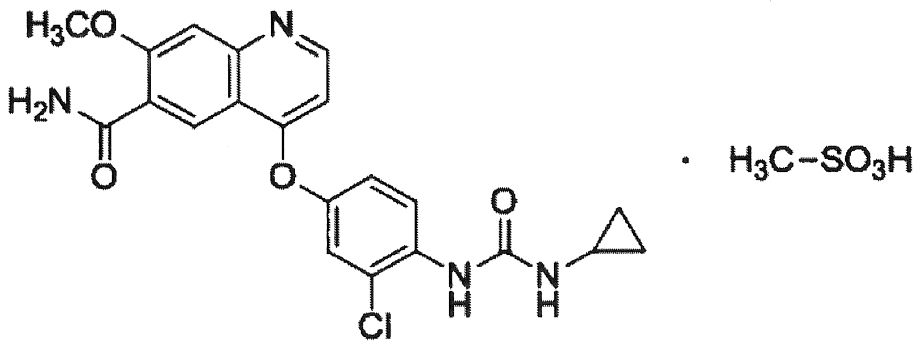


Công thức I

Lenvatinib, chất ức chế tyrosin kinaza nhiều đích qua đường miệng do Eisai (Japan) nghiên cứu phát triển, là chất ức chế tyrosin kinaza thụ thể nhiều đích mà ức chế hoạt tính kinaza của VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR) và VEGFR3 (FLT4). Ngoài chức năng tế bào bình thường, lenvatinib còn ức chế tyrosin kinaza thụ thể khác tham gia vào quá trình sinh mạch bệnh lý, tăng trưởng khối u và tiến triển của bệnh ung thư, bao gồm thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF) FGFR1, FGFR2, FGFR3 và FGFR4, thụ thể "được sắp xếp lại trong khi chuyển nhiễm" (RET), KIT và thụ thể yếu tố tăng trưởng thu được từ tiểu cầu α (PDGFRα). Lenvatinib cũng thể hiện hoạt tính chống tăng sinh ở dòng tế bào caxinom tế bào gan, mà phụ thuộc vào tín hiệu FGFR hoạt hoá và ức chế đồng thời sự phosphoryl hoá cơ chất thụ thể FGF 2α (FRS2α).

Cấu trúc của lenvatinib, 4-(3-clo-4(xyclopropylaminocarbonyl) aminophenoxy)-7-metoxy-6-quinolincarboxamit, được đề cập trong Ví dụ 368 của

Patent Mỹ số 7,612,208. Patent Mỹ số 7,253,286 bộc lộ dạng muối mesylat của lenvatinib (nghĩa là, lenvatinib mesylat), gọi là 4-[3-clo-4-(xyclopropylureido)phenoxy]-7-metoxyquinolin-6-carboxamit mesylat, cấu trúc hoá học của nó được cung cấp dưới đây (công thức II):



Công thức II

Tuy nhiên, đối với nhiều loại khối u, bệnh vẫn là không thể kiểm soát được trong thời gian dài sau hoá trị liệu, và tỷ lệ sống sót 5 năm vẫn rất thấp. Do đó, nghiên cứu phát triển thuốc hoặc liệu pháp kết hợp với độc tính thấp hơn và hiệu lực tốt hơn là có ý nghĩa to lớn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Với nỗ lực nghiên cứu chuyên sâu và sáng tạo, tác giả đã cải biến mảnh Fc của cấu trúc kháng thể kháng PD-1 để làm giảm khả năng gắn kết của vùng Fc với thụ thể Fc, nhờ đó làm giảm tác dụng ADCC, ADCP và/hoặc CDC đối với tế bào T và làm tăng hiệu lực của kháng thể kháng PD-1. Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây.

Một khía cạnh của sáng chế đề cập tới kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm HCDR1-HCDR3 có trình tự axit amin được đưa ra tương ứng trong SEQ ID NO: 19–SEQ ID NO: 21, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm LCDR1-LCDR3 có trình tự axit amin được đưa ra tương ứng trong SEQ ID NO: 22–SEQ ID NO: 24;

kháng thể có kiểu phụ IgG1 của người;

trong đó, theo hệ đánh số EU, vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm đột biến ở vị trí bất kỳ 2 hoặc 3 trong số các vị trí 234, 235 và 237, và hằng số ái lực của kháng thể với FcγRIIIa và/hoặc C1q giảm đi sau khi đột biến được so sánh với

hằng số này trước khi đột biến; tốt hơn là, hằng số ái lực được đo bằng hệ thống Fortebio Octet.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể là kháng thể đơn dòng.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể là kháng thể kháng PD-1, tốt hơn là kháng thể đơn dòng kháng PD-1.

Theo một số phương án của sáng chế, đối với kháng thể, theo hệ đánh số EU, vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm đột biến dưới đây ở vị trí 234, 235 và/hoặc 237:

L234A và L235A;

L234A và G237A;

L235A và G237A;

hoặc

L234A, L235A và G237A.

Trong bản mô tả này, chữ cái phía trước chữ số biểu thị axit amin trước khi đột biến, và chữ cái sau chữ số biểu thị axit amin sau khi đột biến, trừ khi có quy định khác.

Sáng chế cũng đề cập tới kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm HCDR1-HCDR3 có trình tự axit amin được đưa ra tương ứng trong SEQ ID NO: 19–SEQ ID NO: 21, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm LCDR1-LCDR3 có trình tự axit amin được đưa ra tương ứng trong SEQ ID NO: 22–SEQ ID NO: 24;

kháng thể có kiểu phụ IgG1 của người;

trong đó theo hệ đánh số EU, vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm đột biến dưới đây ở vị trí 234, 235 và/hoặc 237:

L234A và L235A;

L234A và G237A;

L235A và G237A;

hoặc

L234A, L235A và G237A.

Theo một số phương án của sáng chế, theo hệ đánh số EU, vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể còn bao gồm một hoặc nhiều đột biến được chọn từ:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A và K320A.

Theo một số phương án của sáng chế, đối với kháng thể,

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 6; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án của sáng chế, đối với kháng thể,

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 4;

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 8;

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 4; hoặc

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án của sáng chế, đối với kháng thể,

chuỗi nặng được đưa ra trong SEQ ID NO: 16, và chuỗi nhẹ được đưa ra trong SEQ ID NO: 12;

hoặc

chuỗi nặng được đưa ra trong SEQ ID NO: 18, và chuỗi nhẹ được đưa ra trong SEQ ID NO: 12.

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng xác định khả năng gắn kết kháng nguyên; vùng biến đổi của mỗi chuỗi bao gồm ba vùng siêu biến, nghĩa là, vùng xác định tính bổ trợ (CDR) (CDR của chuỗi nặng (H) bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, và CDR của chuỗi nhẹ (L) bao gồm LCDR1, LCDR2, LCDR3; được xác định theo Kabat et al., xem: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition (1991), Volumes 1–3, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD).

Trình tự axit amin của vùng CDR của kháng thể đơn dòng ở mục từ (1) đến (3) nêu trên được phân tích bằng các phương pháp kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, bằng cơ sở dữ liệu VBASE2:

Kháng thể 14C12, 14C12H1L1(hG1WT), 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1TM) theo sáng chế có CDR giống nhau.

Trình tự axit amin của 3 vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng là như sau:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 19),

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 20), và

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 21).

Trình tự axit amin của 3 vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như sau:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 22),

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 23), và

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 24).

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể gắn kết với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb với hằng số ái lực lớn hơn khoảng10^{-7} M, ví dụ, lớn hơn khoảng10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, hoặc 10^{-3} M hoặc lớn hơn; tốt hơn là, hằng số ái lực được đo bằng hệ thống Fortebio Octet;

tốt hơn là, kháng thể không có tín hiệu gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết nhỏ hơn 0,1 nm với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb;

tốt hơn là, tín hiệu gắn kết đề cập đến đáp ứng được đo bằng hệ thống Fortebio Octet.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể gắn kết với C1q với hằng số ái lực lớn hơn khoảng10^{-9} M, ví dụ, lớn hơn khoảng10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, hoặc 10^{-5} M hoặc lớn hơn; tốt hơn là, hằng số ái lực được đo bằng hệ thống Fortebio Octet;

tốt hơn là, kháng thể không có tín hiệu gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết nhỏ hơn 0,1 nm với C1q; tốt hơn là, tín hiệu gắn kết đề cập đến đáp ứng được đo bằng hệ thống Fortebio Octet.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể là kháng thể đơn dòng.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể là kháng thể được làm giống như của người.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập tới phân tử axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới vectơ chứa phân tử axit nucleic được phân lập được đề cập ở đây.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic được phân lập hoặc vectơ được đề cập ở đây.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới thể liên hợp, bao gồm kháng thể và phần được liên hợp, trong đó kháng thể là kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, và phần được liên hợp là chất đánh dấu có thể phát hiện; tốt hơn là, phần được liên hợp là chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất tạo màu, hoặc enzym.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới kit chứa kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc chứa thể liên hợp được đề cập ở đây;

tốt hơn là, kit này còn chứa kháng thể thứ hai nhận biết đặc hiệu kháng thể; tuỳ ý, kháng thể thứ hai còn chứa chất đánh dấu có thể phát hiện, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất tạo màu, hoặc enzym.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới việc sử dụng kháng thể hoặc thể liên hợp theo phương án bất kỳ của sáng chế để chuẩn bị kit để phát hiện sự có mặt hoặc nồng độ của PD-1 trong một mẫu.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới dược phẩm chứa kháng thể hoặc thể liên hợp theo phương án bất kỳ của sáng chế; tuỳ ý, dược phẩm còn bao gồm tá dược và/hoặc chất mang dược dụng.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, dược phẩm còn bao gồm một hoặc nhiều chất hoá trị liệu chống khối u;

tốt hơn là, chất hoá trị liệu chống khối u là chất ức chế tyrosin kinaza; tốt hơn nữa là, chất hoá trị liệu chống khối u là anlotinib hoặc muối dược dụng của nó (ví dụ, muối hydroclorua), hoặc lenvatinib hoặc muối dược dụng của nó (ví dụ, muối mesylat).

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, liều đơn vị của dược phẩm là 100–1000 mg, 200–800 mg, 200–500 mg, 300–600 mg, 400–500 mg, hoặc 450 mg, tính theo khối lượng của kháng thể.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới tổ hợp trị liệu bao gồm: kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, và ít nhất một (ví dụ, 1, 2 hoặc 3) chất hoá trị liệu chống khối u.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với tổ hợp trị liệu, chất hoá trị liệu chống khối u là chất ức chế tyrosin kinaza; tốt hơn là, chất hoá trị liệu chống khối u là anlotinib hoặc muối dược dụng của nó (ví dụ, muối hydroclorua), hoặc lenvatinib hoặc muối dược dụng của nó (ví dụ, muối mesylat).

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với tổ hợp trị liệu, liều đơn vị của kháng thể là 100–1000 mg, 200–800 mg, 200–500 mg, 300–600 mg, 400–500 mg, hoặc 450 mg.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với tổ hợp trị liệu, liều đơn vị của chất hoá trị liệu chống khối u là 0,1–100 mg, 0,5–50 mg, 0,5–10 mg, 1–10 mg, 2–8 mg, hoặc 1–5 mg.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với tổ hợp trị liệu, liều đơn vị của chất hoá trị liệu chống khối u là 1–20 mg, 2–15 mg, 4–12 mg, hoặc 8–12 mg.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với tổ hợp trị liệu, trong đó

tổ hợp trị liệu là tổ hợp cố định, ví dụ, ở dạng dược phẩm rắn hoặc dược phẩm

lỏng; hoặc

tổ hợp trị liệu là tổ hợp không cố định, ví dụ, kháng thể kháng PD-1 và chất hoá trị liệu chống khối u trong tổ hợp không cố định là ở dạng dược phẩm.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới sản phẩm kit chứa dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế, và tờ hướng dẫn sử dụng.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới việc sử dụng kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, thể liên hợp được đề cập ở đây, dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế để điều chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u hoặc bệnh thiếu máu, hoặc để điều chế thuốc để chẩn đoán khối u hoặc bệnh thiếu máu, trong đó tốt hơn là khối u được chọn từ một hoặc nhiều bệnh trong số u melanin, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư mũi họng và bệnh ung thư nội mạc tử cung;

tốt hơn là, bệnh ung thư phổi được chọn từ một hoặc nhiều bệnh trong số bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào vảy;

tốt hơn là, bệnh ung thư dạ dày là bệnh ung thư biểu mô tuyến dạ dày hoặc bệnh ung thư biểu mô tuyến đoạn nối thực quản-dạ dày;

tốt hơn là, khối u là khối u rắn có kiểu hình MSI-H/dMMR; tốt hơn là, khối u được chọn từ một hoặc nhiều khối u sau đây có kiểu hình MSI-H/dMMR:

bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư dạ dày, u trung biểu mô, sacoma, caxinom tuyến thượng thận, u melanin ác tính và ung thư tế bào mầm buồng trứng.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với việc sử dụng, khối u là khối u tái phát, di căn (ví dụ, di căn thể lympho bào, di căn não, và/hoặc di căn xương) hoặc khối u kháng thuốc.

MSI đề cập đến độ không ổn định vi vệ tinh. Vi vệ tinh là đoạn lặp tandem ngắn trên toàn bộ bộ gen của người, bao gồm 10–50 đoạn lặp của một, hai hoặc nhiều

nucleotit. Vi vệ tinh ở một số tế bào bất thường, như khối u, được biến đổi độ dài bằng cách xen đoạn hoặc khuyết đoạn đơn vị lặp lại so với tế bào bình thường. Biến đổi này được gọi là MSI. Dựa vào độ không ổn định và mức độ, MSI có thể được phân loại là độ không ổn định vi vệ tinh-mức cao (MSI-H), độ không ổn định vi vệ tinh-mức thấp (MSI-L) và vi vệ tinh ổn định (MSS). Nguyên nhân chính của MSI là suy giảm sửa chữa ghép cặp sai DNA (MMR). Gen sửa chữa ghép cặp sai ở người (gen MMR) có thể biểu hiện protein sửa chữa ghép cặp sai tương ứng thông qua phiên mã và dịch mã. Thiếu protein MMR bất kỳ có thể dẫn đến suy giảm sửa chữa ghép cặp sai, và ghép sai cặp bazơ sẽ tích luỹ trong quá trình sao chép DNA do suy giảm này, cuối cùng dẫn đến MSI. Khoảng 15% bệnh ung thư đại tràng-trực tràng là có liên quan đến con đường MSI. Hiện tượng này lần đầu tiên được ghi nhận ở bệnh ung thư đại tràng-trực tràng, và cũng có thể xuất hiện ở bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư nội mạc tử cung, caxinom tuyến thượng thận và bệnh tương tự (Baretti M et al., *Pharmacol Ther.*, 2018; 189:45-62). Đặc tính MSI-H/dMMR cũng tìm thấy ở u trung biểu mô, sacoma, caxinom tuyến thượng thận, u melanin ác tính và ung thư tế bào mầm buồng trứng trong nghiên cứu sau này.

MSI-H và dMMR thể hiện kết quả của hai thử nghiệm khác nhau và là nhất quán về mặt sinh học, gọi là MSI-H/dMMR hoặc MSI-high/dMMR, trong khi MSI-L và MSS là kiểu hình của MMR hoàn hảo (pMMR). Phát hiện dMMR là thực hiện thử nghiệm hoá mô miễn dịch biểu hiện protein đối với bốn gen ghép cặp sai MSH2, MLH1, MSH6 và PMS2 dựa vào mẫu bệnh phẩm khối u (bao gồm mẫu bệnh phẩm phẫu thuật và mẫu bệnh phẩm chọc hút). Không có protein bất kỳ trong số bốn protein khẳng định dMMR; kết quả dương tính tất cả bốn protein chỉ ra có pMMR, nghĩa là chức năng sửa chữa ghép cặp sai hoàn chỉnh. Phát hiện MSI là ghép cặp độ dài của trình tự DNA lặp (trình tự vi vệ tinh) ở tế bào khối u và tế bào soma, và để so sánh độ dài. Khi 5 locus tiêu chuẩn được phát hiện bằng cách sử dụng PCR dựa vào tiêu chuẩn của NCI của Mỹ, sự không thống nhất ở hai hoặc nhiều locus chỉ ra có độ không ổn định, được xác định là MSI-H, một locus không thống nhất chỉ ra MSI-L, và 5 locus thống nhất chỉ ra MSS. Xác định trình tự hiệu suất cao (còn gọi là xác định trình tự thế hệ mới, hoặc NGS) cũng có thể được sử dụng làm phương pháp để phát hiện độ không ổn định vi vệ tinh. Khi nhiều locus vi vệ tinh được lựa chọn, như nhiều hơn 5 locus hoặc locus vi vệ tinh bổ sung, đối với thử nghiệm PCR, mức không thống

nhất ở ≥30% locus được xác định là MSI-H, mức thống nhất ở tất cả các locus được xác định là MSS, và mức không thống nhất trong khoảng 0 và 30% được xác định là MSI-L.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới việc sử dụng kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, thể liên hợp được mô tả ở đây, dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế để điều chế:

thuốc để phong bế sự gắn kết của PD-1 với PD-L1,

thuốc để điều tiết giảm hoạt tính hoặc nồng độ của PD-1,

thuốc để làm giảm nhẹ sự ức chế miễn dịch của PD-1 ở sinh vật, hoặc

thuốc để gia tăng biểu hiện IFN-γ và/hoặc IL-2 ở tế bào lympho T.

Interferon γ (IFN-γ) được sản xuất chủ yếu và bẩm sinh bởi tế bào giết tự nhiên (NK) và tế bào T giết tự nhiên (NKT) và được sản xuất bởi tế bào T hiệu ứng như tế bào CD4 Th1 và lympho bào T độc tính tế bào CD8 được kích thích bởi kháng nguyên đặc hiệu. Đối với xytokin miễn dịch mắc phải và bẩm sinh quan trọng, IFN-γ đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại hoặc ức chế nhiễm virut và một số bệnh nhiễm vi khuẩn và động vật nguyên sinh nhất định. Đồng thời, IFN-γ có thể hoạt hoá đại thực bào, gây cảm ứng biểu hiện phức hợp tương hợp mô chính typ II, và hoạt hoá đáp ứng miễn dịch để kiểm soát tiến triển của khối u (Schoenborn JR, Wilson CB., Regulation of Interferon-γ During Innate and Adaptive Immune Responses, *Advances in Immunology*, 2007, 96:41–101). Trong thí nghiệm *in vitro* của sáng chế, kháng thể được đề cập ở đây có thể gây cảm ứng tiết IFN-γ để hoạt hoá đáp ứng miễn dịch.

Interleukin 2 (IL-2) được sản sinh bởi tế bào T. Đây là yếu tố tăng trưởng mà điều hoà phân nhóm tế bào T, và yếu tố quan trọng trong điều hoà đáp ứng miễn dịch. Nó thúc đẩy tăng sinh tế bào B đã hoạt hoá, và tham gia vào đáp ứng kháng thể, sinh tạo máu và giám sát khối u. IL-2 của người tái tổ hợp đã được Cục Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ phê duyệt để điều trị u ác tính, bao gồm u melanin và khối u thận (Chavez, A.R., et al., Pharmacologic administration of interleukin-2, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009, 1182:p.14–27). Nghiên cứu *in-vitro* chứng tỏ là kháng thể được đề cập ở đây có thể làm giảm đặc hiệu sự ức chế miễn dịch của PD-1, hoạt hoá tế bào T, và

gây cảm ứng sinh IL-2, và hứa hẹn có ứng dụng rộng rãi trong liệu pháp chống lại bệnh như khối u và bệnh nhiễm ký sinh trùng.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới phương pháp *in vivo* hoặc *in vitro* bao gồm bước: cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, thể liên hợp được mô tả ở đây, dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế. Phương pháp này được chọn từ:

phương pháp để phong bế sự gắn kết của PD-1 với PD-L1,

phương pháp để điều tiết giảm hoạt tính hoặc nồng độ của PD-1,

phương pháp để làm giảm nhẹ sự ức chế miễn dịch của PD-1 ở sinh vật, hoặc

phương pháp để gia tăng biểu hiện IFN-γ và/hoặc IL-2 ở tế bào lympho T.

Sáng chế cũng đề cập tới kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, thể liên hợp được mô tả ở đây, dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế để sử dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u hoặc bệnh thiếu máu, hoặc trong chẩn đoán khối u hoặc bệnh thiếu máu, trong đó tốt hơn là khối u được chọn từ một hoặc nhiều bệnh trong số u melanin, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư mũi họng và bệnh ung thư nội mạc tử cung;

tốt hơn là, bệnh ung thư phổi được chọn từ một hoặc nhiều bệnh trong số bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào vảy;

tốt hơn là, bệnh ung thư dạ dày là bệnh ung thư biểu mô tuyến dạ dày hoặc bệnh ung thư biểu mô tuyến đoạn nối thực quản-dạ dày;

tốt hơn là, khối u là khối u rắn có kiểu hình MSI-H/dMMR; tốt hơn là, khối u được chọn từ một hoặc nhiều khối u sau đây có kiểu hình MSI-H/dMMR:

bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư dạ dày, u trung biểu mô, sacoma, caxinom tuyến thượng thận, u melanin

ác tính và ung thư tế bào mầm buồng trứng.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với kháng thể hoặc thể liên hợp được mô tả ở đây, khối u là khối u tái phát, di căn (ví dụ, di căn thể lympho bào, di căn não, và/hoặc di căn xương) hoặc khối u kháng thuốc.

Kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, thể liên hợp được mô tả ở đây, dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế được sử dụng để:

Phong bế sự gắn kết của PD-1 với PD-L1,

Điều hoà giảm hoạt tính hoặc nồng độ của PD-1,

Làm giảm sự ức chế miễn dịch của PD-1 ở sinh vật, hoặc

Làm tăng biểu hiện IFN-γ và/hoặc IL-2 ở tế bào lympho T.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập tới phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u hoặc bệnh thiếu máu, hoặc phương pháp chẩn đoán khối u hoặc bệnh thiếu máu, bao gồm bước: cho đối tượng cần dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo phương án bất kỳ của sáng chế, thể liên hợp được mô tả ở đây, dược phẩm theo phương án bất kỳ của sáng chế hoặc tổ hợp trị liệu theo phương án bất kỳ của sáng chế, trong đó tốt hơn là khối u được chọn từ một hoặc nhiều bệnh trong số u melanin, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư mũi họng và bệnh ung thư nội mạc tử cung;

tốt hơn là, bệnh ung thư phổi được chọn từ một hoặc nhiều bệnh trong số bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và bệnh ung thư phổi tế bào vảy;

tốt hơn là, bệnh ung thư dạ dày là bệnh ung thư biểu mô tuyến dạ dày hoặc bệnh ung thư biểu mô tuyến đoạn nối thực quản-dạ dày;

tốt hơn là, khối u là khối u rắn có kiểu hình MSI-H/dMMR; tốt hơn là, khối u được chọn từ một hoặc nhiều khối u sau đây có kiểu hình MSI-H/dMMR:

bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung,

bệnh ung thư dạ dày, u trung biểu mô, sacoma, caxinom tuyến thượng thận, u melanin ác tính và ung thư tế bào mầm buồng trứng.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với phương pháp này, khối u là khối u tái phát, di căn (ví dụ, di căn thể lympho, di căn não, và/hoặc di căn xương) hoặc khối u kháng thuốc.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, đối với phương pháp này, sử dụng là trước hoặc sau khi điều trị bằng phẫu thuật và/hoặc trước hoặc sau xạ trị.

Theo một hoặc nhiều phương án của sáng chế, phương pháp, trong đó

liều đơn vị của kháng thể kháng PD-1 là 0,1–100 mg, tốt hơn là 1–10 mg (ví dụ, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg hoặc 10 mg)/kg thể trọng; theo cách khác, liều đơn vị của kháng thể kháng PD-1 là 10–1000 mg (ví dụ, khoảng 100 mg, khoảng 150 mg, khoảng 200 mg, khoảng 250 mg, khoảng 300 mg, khoảng 350 mg, khoảng 400 mg, khoảng 450 mg, khoảng 500 mg, khoảng 600 mg, khoảng 700 mg, khoảng 800 mg, khoảng 900 mg hoặc khoảng 1000 mg), tốt hơn là 50–500 mg, 100–400 mg, 150–300 mg, 150–250 mg hoặc 200 mg ở mỗi đối tượng;

tốt hơn là, liều dùng được dùng 3 ngày một lần, 4 ngày một lần, 5 ngày một lần, 6 ngày một lần, 10 ngày một lần, một tuần một lần, 2 tuần một lần, hoặc 3 tuần một lần;

tốt hơn là, đường dùng là tiêm truyền nhỏ giọt tĩnh mạch hoặc tiêm tĩnh mạch.

Theo một số phương án, sử dụng kháng thể kháng PD-1 được thực hiện theo chu trình 2 tuần (14 ngày) hoặc 3 tuần (21 ngày), và tốt hơn là, kháng thể kháng PD-1 được sử dụng qua tĩnh mạch vào ngày thứ nhất (D1) của mỗi chu trình. Ví dụ, kháng thể kháng PD-1 được sử dụng hai tuần một lần (q2w) hoặc ba tuần một lần (q3w).

Theo sáng chế, trừ khi được định nghĩa khác đi, thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa nói chung đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, hoạt động trong phòng thí nghiệm nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, hoá học axit nucleic và miễn dịch học được sử dụng ở đây là quy trình thường quy được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực tương ứng. Đồng thời, để hiểu rõ hơn về sáng chế, định nghĩa và giải thích thuật ngữ liên quan được cung cấp dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, khi đề cập đến trình tự axit amin của protein PD-1 (protein chết tế bào theo chương trình 1, NCBI GenBank: NP_005009.2), là bao gồm độ dài đầy đủ của protein PD-1, hoặc mảnh ngoại bào PD-1ECD của PD-1 hoặc mảnh bao gồm PD-1ECD, và cũng bao gồm protein dung hợp của PD-1ECD, như mảnh được dung hợp với mảnh protein Fc của IgG của chuột hoặc IgG của người (mFc hoặc hFc). Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được là trong trình tự axit amin của protein PD-1, đột biến hoặc biến đổi (bao gồm nhưng không giới hạn ở, thay thế, khuyết đoạn và/hoặc thêm đoạn) có thể được sản sinh một cách tự nhiên hoặc được đưa vào bằng cách nhân tạo mà không ảnh hưởng đến chức năng sinh học của chúng. Do đó, trong sáng chế này, thuật ngữ "protein PD-1" bao gồm tất cả trình tự này và biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của chúng. Hơn nữa, khi mô tả mảnh trình tự của protein PD-1, thuật ngữ này không chỉ bao gồm mảnh trình tự mà cả mảnh trình tự tương ứng trong biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của nó.

Như được sử dụng ở đây, khi đề cập đến trình tự axit amin của protein PDL1 (NCBI Genebank ID: NP_054862.1), là bao gồm độ dài đầy đủ của protein PDL1, hoặc mảnh ngoại bào PDL1ECD của PDL1 hoặc mảnh bao gồm PDL1ECD; cũng bao gồm protein dung hợp của PDL1ECD, như mảnh được dung hợp với mảnh protein Fc của IgG của chuột hoặc IgG của người (mFc hoặc hFc). Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được là trình tự axit amin của protein PDL1, đột biến hoặc biến đổi (bao gồm nhưng không giới hạn ở, thay thế, khuyết đoạn và/hoặc thêm đoạn) có thể được sản sinh một cách tự nhiên hoặc được đưa vào bằng cách nhân tạo mà không ảnh hưởng đến chức năng sinh học của chúng. Do đó, trong sáng chế này, thuật ngữ "protein PDL1" bao gồm tất cả trình tự này và biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của chúng. Hơn nữa, khi mô tả mảnh trình tự của protein PDL1, thuật ngữ này không chỉ bao gồm mảnh trình tự mà cả mảnh trình tự tương ứng trong biến thể tự nhiên hoặc nhân tạo của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ EC_{50} đề cập đến nồng độ hữu hiệu bán tối đa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" đề cập đến phân tử globulin miễn dịch mà nói chung gồm có hai cặp chuỗi polypeptit (mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (L) và một chuỗi "nặng" (H)). Chuỗi nhẹ kháng thể được phân loại là chuỗi nhẹ κ và

λ. Chuỗi nặng được phân loại là μ, δ, γ, α, hoặc ε. Isotyp của kháng thể được xác định là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng ổn định được liên kết bởi vùng "J" có khoảng 12 axit amin trở lên, và chuỗi nặng cũng bao gồm vùng "D" có khoảng 3 axit amin trở lên. Mỗi chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng ổn định chuỗi nặng (C_H). Vùng ổn định chuỗi nặng gồm có 3 miền (C_{H1}, C_{H2}, và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) và vùng ổn định chuỗi nhẹ (C_L). Vùng ổn định chuỗi nhẹ gồm có một miền C_L. Vùng ổn định của kháng thể có thể điều tiết sự gắn kết của globulin miễn dịch với yếu tố hoặc mô của vật chủ, bao gồm gắn kết các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) với thành phần thứ nhất (C1q) của hệ bổ thể cổ điển. Vùng V_H và V_L có thể được phân chia tiếp thành vùng biến đổi mức cao (được gọi là vùng xác định tính bổ trợ (CDR)), giữa các vùng bảo toàn gọi là vùng khung (FR) được phân bố. Mỗi V_H và V_L gồm có 3 CDR và 4 FR được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Vùng biến đổi (V_H và V_L) của mỗi cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ tạo thành vị trí gắn kết kháng thể. Việc xác định axit amin cho mỗi vùng hoặc miền tuân theo định nghĩa trong: Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1987 and 1991)), Chothia & Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917, hoặc Chothia et al. (1989) *Nature*, 342:878-883. Thuật ngữ "kháng thể" không bị giới hạn bởi phương pháp cụ thể bất kỳ để sản xuất kháng thể. Ví dụ, kháng thể bao gồm, cụ thể là, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể đơn dòng, và kháng thể đa dòng. Kháng thể có thể là kháng thể có isotyp khác nhau, như IgG (ví dụ, kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "mAb" và "kháng thể đơn dòng" đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó mà thu được từ nhóm kháng thể tương đồng mức độ cao, nghĩa là từ nhóm phân tử kháng thể tương đồng, ngoại trừ đột biến tự nhiên mà có thể xảy ra tức thời. Kháng thể đơn dòng là rất đặc hiệu đối với epitop đơn nhất trên kháng nguyên. Kháng thể đa dòng, so với kháng thể đơn dòng, nói chung bao gồm ít nhất hai hoặc nhiều kháng thể khác nhau mà nói chung nhận biết epitop khác nhau trên kháng nguyên. Kháng thể đơn dòng nói chung có thể thu được bằng kỹ thuật tế bào lai lần đầu tiên được Kohler et al. báo cáo (*Nature*, 256:495, 1975), và cũng có thể thu được bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp (ví dụ, xem Patent Mỹ số

4,816,567).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể được làm giống như của người" đề cập đến kháng thể hoặc mảnh kháng thể thu được khi tất cả hoặc một phần của vùng CDR của globulin miễn dịch của người (kháng thể thụ thể) được thay thế bằng vùng CDR của kháng thể không phải của người (kháng thể cho), trong đó kháng thể cho có thể là kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ) có tính phản ứng, ái lực hoặc tính đặc hiệu kỳ vọng. Ngoài ra, một vài gốc axit amin trong vùng khung (FR) của kháng thể thụ thể cũng có thể được thay thế bằng gốc axit amin của kháng thể không phải của người tương ứng hoặc bằng gốc axit amin của kháng thể khác để cải thiện hơn nữa hoặc làm tối ưu tính năng của kháng thể. Thông tin chi tiết hơn về kháng thể được làm giống như của người, xem, ví dụ, Jones et al., *Nature*, 321:522–525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323–329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593–596 (1992); và Clark, *Immunol. Today*, 21:397–402 (2000).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được phân lập" đề cập đến việc thu được bằng cách nhân tạo từ trạng thái tự nhiên. Nếu một thành phần hoặc chất "được phân lập" có mặt trong tự nhiên, thì có thể là thay đổi xảy ra trong môi trường tự nhiên của nó, hoặc là nó được phân lập từ môi trường tự nhiên, hoặc cả hai. Ví dụ, nếu polynucleotit hoặc polypeptit không được phân lập nhất định tồn tại một cách tự nhiên ở động vật sống nhất định, như polynucleotit hoặc polypeptit có độ tinh khiết cao hơn được phân lập từ trạng thái tự nhiên đó được gọi là polynucleotit hoặc polypeptit được phân lập. Thuật ngữ "được phân lập" không loại trừ sự hiện hữu của chất tự nhiên hoặc tổng hợp hoặc tạp chất khác mà không ảnh hưởng đến hoạt tính của chất này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vectơ" đề cập đến chất dẫn axit nucleic mà polynucleotit có thể cài xen vào đó. Khi vectơ cho phép biểu hiện của protein được mã hoá bởi polynucleotit đã cài xen, thì vectơ này được gọi là vectơ biểu hiện. Vectơ có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách biến nạp, tải nạp, hoặc chuyển nhiễm sao cho yếu tố chất di truyền được mang bởi vectơ có thể được biểu hiện ở tế bào chủ. Vectơ là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không giới hạn ở: plasmid; phagemid; cosmid; nhiễm sắc thể nhân

tạo, như nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (BAC), hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo thu được từ-P1 (PAC); thể thực khuẩn như thể thực khuẩn lambda hoặc thể thực khuẩn M13; và virut động vật. Virut động vật mà có thể được sử dụng làm vectơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở retrovirut (bao gồm lentivirut), adenovirut, virut kèm theo-adeno, virut herpes (như herpes simplex), poxvirut, baculovirut, papillomavirut, và papovavirut (như SV40). Vectơ này có thể bao gồm các yếu tố khác nhau mà kiểm soát biểu hiện, bao gồm, nhưng không giới hạn ở trình tự gen khởi đầu, trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự tăng cường, yếu tố chọn lọc, và gen báo cáo. Ngoài ra, vectơ có thể còn bao gồm vị trí khởi đầu sao chép.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào chủ" đề cập đến tế bào mà vectơ có thể được đưa vào đó, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào nhân rải rác như *E. coli* hoặc *bacillus subtilis*, tế bào nấm như tế bào nấm men hoặc *aspergillus*, tế bào côn trùng như tế bào drosophila S2 hoặc Sf9, hoặc tế bào động vật như nguyên bào sợi, tế bào CHO, tế bào COS, tế bào NSO, tế bào HeLa, tế bào BHK, tế bào HEK 293, hoặc tế bào của người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" đề cập đến phản ứng gắn kết không ngẫu nhiên giữa hai phân tử, như phản ứng giữa kháng thể và kháng nguyên nó hướng đích. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (hoặc kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên) nghĩa là kháng thể gắn kết kháng nguyên với ái lực (K_D) nhỏ hơn khoảng 10^{-5} M, ví dụ, nhỏ hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "K_D" đề cập đến hằng số cân bằng phân ly đối với một tương tác kháng nguyên-kháng thể đặc hiệu, mà được sử dụng để mô tả ái lực gắn kết giữa kháng thể và kháng nguyên. Hằng số phân ly cân bằng nhỏ hơn cho thấy sự gắn kết kháng nguyên-kháng thể mạnh hơn và ái lực cao hơn giữa kháng thể và kháng nguyên. Nói chung, kháng thể gắn kết kháng nguyên (*ví dụ*, protein PD-1) với hằng số cân bằng phân ly (K_D) là nhỏ hơn khoảng 10^{-5} M, như nhỏ hơn khoảng 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn. K_D có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng thệ thống Fortebio.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" và "mAb" có nghĩa giống nhau và có thể được sử dụng hoán đổi lẫn nhau; thuật ngữ "kháng thể đa dòng" và "pAb" có nghĩa giống nhau và có thể được sử dụng hoán đổi lẫn nhau; thuật ngữ "polypeptit" và "protein" có nghĩa giống nhau và có thể được sử dụng hoán đổi lẫn nhau. Bên cạnh đó, axit amin nói chung được biểu thị bằng cách viết tắt một chữ cái và viết tắt ba chữ cái trong lĩnh vực. Ví dụ, alanin có thể được biểu thị bằng A hoặc Ala.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tá dược và/hoặc chất mang dược dụng" đề cập đến chất mang và/hoặc tá dược mà tương hợp về mặt dược lý và/hoặc sinh lý với đối tượng và hoạt chất. Tá dược và/hoặc chất mang này là đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edited by Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania, Mack Publishing Company, 1995), bao gồm nhưng không giới hạn ở: chất điều chỉnh độ pH, chất hoạt động bề mặt, chất phụ trợ, và chất tăng cường nồng độ ion. Ví dụ, chất điều chỉnh độ pH bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đệm phosphat; chất hoạt động bề mặt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất hoạt động bề mặt cation, anion, hoặc không ion như Tween-80; chất tăng cường nồng độ ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, natri clorua.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất phụ trợ" đề cập đến chất tăng cường miễn dịch không đặc hiệu, mà có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch của sinh vật với kháng nguyên hoặc thay đổi kiểu đáp ứng miễn dịch khi được vận chuyển đến sinh vật cùng với kháng nguyên hoặc trước đó. Có nhiều chất phụ trợ khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất phụ trợ nhôm (ví dụ, nhôm hydroxit), chất phụ trợ Freund (ví dụ, chất phụ trợ Freund hoàn chỉnh và chất phụ trợ Freund không hoàn chỉnh), *Corynebacterium parvum*, lipopolysacarit, xytokin, v.v. Chất phụ trợ Freund là chất phụ trợ hay được sử dụng nhất trong thí nghiệm ở động vật. Chất phụ trợ nhôm hydroxit được sử dụng thường xuyên hơn trong thử nghiệm lâm sàng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" đề cập đến lượng đủ để thu được hoặc thu được ít nhất một phần tác dụng mong muốn. Ví dụ, lượng hữu hiệu phòng bệnh đối với một bệnh (ví dụ, RA) đề cập đến lượng đủ để ngăn ngừa, ngừng, hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh (ví dụ, RA); lượng hữu hiệu trị liệu đề cập đến lượng chữa khỏi hoặc làm ngừng ít nhất một phần bệnh và biến chứng của nó ở bệnh

nhân mắc bệnh này. Chắc chắn là trong khả năng của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này để xác định lượng hữu hiệu này. Ví dụ, lượng hữu hiệu cho mục đích trị liệu sẽ tuỳ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh sẽ điều trị, tình trạng tổng thể của hệ miễn dịch của bệnh nhân, tình trạng nói chung của bệnh nhân như tuổi tác, cân nặng, và giới tính, đường dùng, và các điều trị khác dùng đồng thời, v.v.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm mất hoàn toàn" đề cập đến không có tín hiệu gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết rất yếu như được phát hiện bằng thiết bị hiện có (ví dụ, hệ thống Fortebio Octet). Theo một phương án của sáng chế, không có tín hiệu gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết rất yếu đề cập đến tín hiệu gắn kết (nghĩa là, đáp ứng) nhỏ hơn 0,1 nm.

Bệnh ung thư "tái phát" là bệnh tái phát ở vị trí ban đầu hoặc vị trí cách xa sau khi đáp ứng với điều trị trước đó (ví dụ, phẫu thuật). Bệnh ung thư "tái phát tại chỗ" là bệnh mà xuất hiện ở cùng vị trí như bệnh ung thư được điều trị trước đó sau khi điều trị.

Bệnh ung thư "di căn" đề cập đến bệnh mà lây lan từ một phần của cơ thể (ví dụ, phổi) đến một vùng khác.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đạt được một hoặc nhiều hiệu quả kỹ thuật trong số các hiệu quả kỹ thuật từ (1) đến (9) dưới đây:

(1) Kháng thể được đề cập ở đây, cụ thể là 14C12H1L1(hG1TM) và 14C12H1L1(hG1WT), có thể phong bế hiệu quả sự ức chế miễn dịch của tế bào miễn dịch được gây cảm ứng bởi sự gắn kết PD-1/PDL1, và gây cảm ứng tiết IFN-γ và IL-2 ở tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người.

(2) Sáng chế làm mất hoàn toàn hoạt tính gắn kết của kháng thể, cụ thể là 14C12H1L1(hG1TM), với thụ thể Fc, nghĩa là, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIIa_F158, nhờ đó loại bỏ hoạt tính ADCC hoặc hoạt tính ADCP.

(3) Sáng chế làm mất hoàn toàn hoạt tính gắn kết của kháng thể, cụ thể là

14C12H1L1(hG1TM), với C1q bổ thể, nhờ đó làm mất hoạt tính CDC.

(4) Sáng chế làm giảm đáng kể hoạt tính gắn kết của kháng thể, ví dụ, 14C12H1L1 (hG1DM), với thụ thể Fc, nghĩa là, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIa_R131 và/hoặc FcγRIIIa_V158 và hoàn toàn làm mất khả năng gắn kết với FcγRIIIa_F158 và/hoặc FcγRIIb, nhờ đó làm giảm đáng kể hoạt tính ADCC.

(5) Sáng chế hoàn toàn làm mất hoạt tính gắn kết của kháng thể, cụ thể là 14C12H1L1(hG1DM), với C1q bổ thể, nhờ đó làm mất hoạt tính CDC.

(6) Kháng thể đơn dòng của sáng chế, cụ thể là 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1WT), có thể gắn kết tốt và gắn kết đặc hiệu với PD-1, và có thể phong bế hiệu quả sự gắn kết của PD-1 với PDL1, nhờ đó giảm nhẹ hiệu quả sự ức chế miễn dịch bởi PD-1 ở sinh vật và hoạt hoá lympho bào T. Trong số này, kháng thể PD-1 14C12H1L1(hG1TM) có tác dụng gây cảm ứng mạnh hơn đáng kể so với tác dụng của kháng thể kháng PD-1 đối chứng nivolumab và kháng thể kháng PDL1 đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt đối với sự tiết IFN-γ và IL-2, cho thấy có tiềm năng để sử dụng để điều chế thuốc nhằm ngăn ngừa và điều trị khối u.

(7) Kháng thể được đề cập ở đây có khả năng ngăn ngừa và điều trị hiệu quả khối u nêu trên.

(8) Kháng thể được đề cập ở đây có ít tác dụng phụ và độc tính.

(9) Kháng thể kháng PD-1 được đề cập ở đây hoặc kháng thể kháng PD-1 trong tổ hợp trị liệu được đề cập ở đây có tác dụng hiệp đồng với chất hoá trị liệu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với FcγRI. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM và 3,12 nM.

FIG. 2: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với FcγRI. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM và 3,12 nM.

FIG. 3: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với FcγRI. Nồng

độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM và 3,12 nM.

FIG. 4: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRI. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM và 3,12 nM.

FIG. 5: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRI. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM và 3,12 nM.

FIG. 6: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với FcγRIIIa_V158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 7: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với FcγRIIIa_V158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 8: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với FcγRIIIa_V158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 9: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_V158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 10: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIIa_V158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 11: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với FcγRIIIa_F158. Nồng độ kháng nguyên cho cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 12: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với FcγRIIIa_F158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 13: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với FcγRIIIa_F158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 14: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_F158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 15: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIa_F158. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM và 31,25 nM.

FIG. 16: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với FcγRIIa_H131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 17: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với FcγRIIa_H131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 18: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với FcγRIIa_H131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 19: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_H131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 20: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIa_H131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 21: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với FcγRIIa_R131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 22: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với FcγRIIa_R131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 23: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với FcγRIIa_R131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 24: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_R131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 25: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIa_R131. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 26: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với FcγRIIb. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 27: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với FcγRIIb. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 28: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với FcγRIIb. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 29: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIb. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 30: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIb. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM.

FIG. 31: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM) với C1q. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM và 1,25 nM.

FIG. 32: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG4) với C1q. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM và 1,25 nM.

FIG. 33: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1WT) với C1q. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM và 1,25 nM.

FIG. 34: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1TM) với C1q. Nồng độ kháng thể đối với cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM và 1,25 nM.

FIG. 35: Thử nghiệm hằng số ái lực của 5C10H2L2-IgG1mt với C1q. Nồng độ kháng nguyên cho cặp đường cong từ trên xuống dưới lần lượt là 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM và 1,25 nM.

FIG. 36: thử nghiệm tiết IFN-γ bằng cách thêm 14C12H1L1 (hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) vào phản ứng lympho bào hỗn hợp.

FIG. 37: thử nghiệm tiết IL-2 bằng cách thêm 14C12H1L1 (hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) vào phản ứng lympho bào hỗn hợp.

FIG. 38: thử nghiệm tác dụng ADCP của 14C12H1L1(hG1WT), nivolumab, và 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 39: Thử nghiệm tác dụng tiêu diệt của 14C12H1L1(hG1TM) + anlotinib đối với tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ của người.

FIG. 40: Sự tăng sinh bị ức chế của tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của chuột MC38 bởi 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 41: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư dạ dày KATO III bởi 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 42: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư mũi họng CNE-2Z bởi 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 43: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào u trung biểu mô NCI-H2452 bởi 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 44: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ của người NCI-H446 bởi 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 45: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư mũi họng CNE-2Z bởi 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib hydroclorua.

FIG. 46: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường đáng kể của tế bào miễn dịch đối với tế bào khối u SW48 có kiểu hình MSI-H/dMMR bởi 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib.

FIG. 47: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường đáng kể của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng SW837 kiểu hình không phải là MSI-H/dMMR (nghĩa là, MSS) bởi 14C12H1L1(hG1TM).

FIG. 48: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường đáng kể của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người SW837 kiểu hình không phải là MSI-H/dMMR (nghĩa là, MSS) bởi 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây dựa vào các ví dụ. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được là ví dụ dưới đây chỉ để minh hoạ sáng chế, và không nên hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Trong trường hợp trong đó không có quy định cụ thể về kỹ thuật hoặc điều kiện, thì ví dụ được thực hiện theo kỹ thuật hoặc điều kiện được mô tả trong lĩnh vực này (ví dụ, xem, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, của J. Sambrook et al., và được dịch bởi Huang Peitang et al., Third Edition, Science Press) hoặc theo hướng dẫn sử dụng của sản phẩm. Thuốc thử hoặc dụng cụ sử dụng là sản phẩm thông thường có bán sẵn nếu nhà sản xuất không quy định cụ thể.

Trong thí nghiệm dưới đây của sáng chế:

Chuột BALB/c được mua của Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

Kháng thể kháng PDL1 5C10H2L2-IgG1mt được điều chế bằng phương pháp đã mô tả trong WO2017148424A1.

Kháng thể kháng PD-1 nivolumab (tên thương mại: Opdivo) được mua của Bristol-Myers Squibb.

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người được phân lập và điều chế ở Akeso

Biopharma, Inc., với sự đồng ý của người cho sau khi được giải thích.

Raji-PDL1 là tế bào biểu hiện PD-L1 của người được xây dựng cấu trúc bởi Akeso Biopharma dựa trên tế bào B của người Raji bằng cách chuyển nhiễm.

Ficoll-Paque™ PLUS (hoặc Ficoll-Paque PLUS) được mua của GE Healthcare.

Kit IL-2 ELISA của người được mua của Dakewe Biotech Co., Ltd.

Môi trường RPMI 1640, môi trường DMEM, Trypsin-EDTA (0,25%) phenol đỏ và Blastidin được mua của Gibco.

Staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB) được mua của Dianotech.

FBS được mua của Excell bio.

Mitomycin C (MMC) được mua của Stressmarq.

Trình tự của đối chứng isotyp, IgG của người kháng-lysozym trứng gà (kháng thể kháng HEL, hoặc IgG của người, được viết tắt là hIgG) thu được từ trình tự vùng biến đổi của trình tự Fab F10.6.6 trong nghiên cứu được báo cáo bởi Acierno et al., tiêu đề "Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" (Acierno et al., *J Mol Biol.*, 2007; 374(1):130–146).

Anlotinib được sử dụng trong ví dụ là muối hydroclorua của anlotinib dưới tên thương mại Fukewei® và tên chung anlotinib hydroclorua, và được mua của CTTQ Pharma.

Ví dụ điều chế 1: Thiết kế trình tự của kháng thể kháng PD-1 14C12 và kháng thể được làm giống như của người của nó 14C12H1L1(hG1WT)

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit mã hoá của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD-1 14C12 và kháng thể được làm giống như của người của nó 14C12H1L1(hG1WT) lần lượt đồng nhất với trình tự của 14C12 và 14C12H1L1 trong công bố Patent Trung quốc số CN106967172A (hoặc số CN106977602A).

(1) Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 14C12

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của 14C12: (354 bp)

GAGGTCAAACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGG

TCACTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCT
ACTATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAG
GGAGATTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCA
GATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAAC
CGGTACGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCACCCTGGTGA
CAGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 1)

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của 14C12: (118 aa)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYG
EAWFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 2)

Trình tự nucleotit mã hoá vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 14C12: (321 bp)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCG
AGCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCT
GTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTAC
CGGGCCAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTG
GCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGA
CATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTG
GAGCAGGCACAAAACTGGAACTGAAG (SEQ ID NO: 3)

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 14C12: (107 aa)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
RLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKL
ELK (SEQ ID NO: 4)

(2) Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và trình tự nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người 14C12H1L1(hG1WT)

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng của 14C12H1L1(hG1WT): (354 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGG
TCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCT

ACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGG
GCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCA
GATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAAC
CGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGA
CAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 5)

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của 14C12H1L1(hG1WT): (118 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRY
GEAWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Trình tự nucleotit mã hoá vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 14C12H1L1(hG1WT): (321 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCG
ACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCT
GAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTA
CCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCA
GGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGG
ACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTT
GGCGCCGGGACAAAACTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 7)

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 14C12H1L1(hG1WT): (107 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
RLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKL
ELK (SEQ ID NO: 8)

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1WT): (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGG
TCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCT
ACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGG
GCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCA

GATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAAC
CGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGA
CAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCC
TCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGA
AGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCT
GACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTC
TATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCC
AGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGA
CAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCC
TGTCCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCC
CAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGT
GTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGT
ATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGG
AACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAA
GGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAA
CCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAG
CGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTA
CAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACA
GCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCT
CCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAG
CCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 9)

Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1WT): (448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRY
GEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1WT): (642 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCG
ACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCT
GAGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTA
CCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCA
GGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGG
ACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTT
GGCGCCGGGACAAAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCC
GTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAG
CGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAG
TGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTG
ACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGA
CTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGT
GACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGC
GAATGT (SEQ ID NO: 11)

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1WT): (214 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
RLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKL
ELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO:12)

<u>Ví dụ điều chế 2: Thiết kế trình tự của kháng thể được làm giống như của người 14C12H1L1(hG4)</u>

Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đồng nhất với vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 14C12H1L1(hG1WT). Vùng chuỗi C Ig gamma-4 (ACCESSION: P01861.1) được sử dụng làm vùng ổn định chuỗi nặng, và vùng chuỗi C Ig kappa (ACCESSION: P01834) được sử dụng làm vùng ổn định chuỗi nhẹ, từ đó

tạo ra kháng thể 14C12H1L1(hG4). Trình tự của 14C12H1L1(hG4) như sau:

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG4): (1335 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGG
TCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCT
ACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGG
GCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCA
GATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAAC
CGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGA
CAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCGCC
CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACG
AAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAG
CACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGG
TGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGG
ATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
TCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT
CCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA
CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGG
CTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCTGGGTAAA (SEQ ID NO: 13)

Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG4): (445 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRY
GEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 14)

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG4) đồng nhất với SEQ ID NO: 11.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG4) đồng nhất với SEQ ID NO: 12.

Ví dụ điều chế 3: Thiết kế trình tự của kháng thể được làm giống như của người 14C12H1L1(hG1TM)

Dựa trên 14C12H1L1(hG1WT) đã thu được trong Ví dụ điều chế 1, thu được thể đột biến được làm tương thích với người 14C12H1L1(hG1TM) bằng cách đưa vào đột biến điểm leuxin-thành-alanin ở vị trí 234 (L234A), đột biến điểm leuxin-thành-alanin ở vị trí 235 (L235A), và đột biến điểm glyxin-thành-alanin ở vị trí 237 (G237A) ở vùng bản lề của chuỗi nặng theo hệ đánh số EU.

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1TM): (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGG
TCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCT
ACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGG
GCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCA
GATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAAC
CGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGA
CAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCC
CTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTG

AAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTC
TGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACT
CTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACC
CAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCC
CCTGTCCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCT
CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCT
GTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTG
GTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGA
GGAACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTC
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCC
AACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACT
CACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAAC
TACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTA
CAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTT
CTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAA
AGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 15)

Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1TM): (448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRY
GEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
16)

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1TM) đồng nhất với SEQ ID

NO: 11.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1TM) đồng nhất với SEQ ID NO: 12.

Ví dụ điều chế 4: Thiết kế trình tự của kháng thể được làm giống như của người 14C12H1L1(hG1DM)

Dựa vào 14C12H1L1(hG1WT), kháng thể đột biến được làm tương thích với người 14C12H1L1(hG1DM) thu được bằng cách đưa vào đột biến điểm leuxin-thành-alanin ở vị trí 234 (L234A) và đột biến điểm leuxin-thành-alanin ở vị trí 235 (L235A) ở vùng bản lề của chuỗi nặng.

Trình tự nucleotit của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1DM): (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGG
TCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCT
ACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGG
GCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCA
GATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAAC
CGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGA
CAGTCTCTAGTGCTAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCC
TCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGA
AGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCT
GACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTC
TATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCC
AGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGA
CAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCC
TGTCCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCC
CAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGT
GTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGT
ATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGG
AACAGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCA
CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAA
GGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAA

CCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTCA
CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAG
CGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTA
CAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACA
GCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCT
CCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAG
CCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 17)

Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1DM): (448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRY
GEAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
18)

Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1DM) đồng nhất với SEQ ID NO: 11.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1DM) đồng nhất với SEQ ID NO: 12.

Ví dụ thí nghiệm 1: Thử nghiệm ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với thụ thể Fc FcγRI

Thụ thể Fc FcγRI, còn gọi là CD64, có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG và tham gia vào độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Khả năng gắn kết của kháng thể đơn dòng trị liệu với thụ thể Fc sẽ ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của kháng thể. Hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và

14C12H1L1(hG1TM) với FcγRI được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá hoạt tính ADCC của kháng thể.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của kháng thể với FcγRI bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng mẫu là dung dịch chứa 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. Dung dịch 1 µg/mL FcγRI (của Sinobio) được thêm vào bộ cảm biến HIS1K để cố định FcγRI trên bề mặt cảm biến trong 50 giây. Hằng số kết hợp và hằng số phân ly của kháng thể với FcγRI đều được xác định trong dịch đệm với nồng độ kháng thể là 3,12–50 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần). Cảm biến với kháng nguyên cố định được để cân bằng trong dịch đệm trong 60 giây, và tiếp đó sự gắn kết của FcγRI cố định trên bộ cảm biến với kháng thể được xác định trong 120 giây; sự phân ly của FcγRI từ kháng thể được xác định trong 120 giây. Nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,3 Hz. Khớp dữ liệu và phân tích bằng mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực với FcγRI đối với kháng thể.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRI được thể hiện trong bảng 1 và FIG. 1–FIG. 5.

Bảng 1: Động học gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRI

Kháng thể	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	5,80E-09	6,37E+05	2,21E+04	3,69E-03	1,05E-04	0,45-0,54
14C12H1L1(hG1WT)	2,52E-09	6,94E+05	2,19E+04	1,75E-03	9,14E-05	0,50-0,55
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả cho thấy là cả 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT) đều gắn kết với FcγRI với hằng số ái lực lần lượt là 5,80E-09 M và 2,52E-09 M; 14C12H1L1(hG1TM) và 5C10H2L2-IgG1mt không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với FcγRI, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả gợi ý là hoạt tính gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRI được loại bỏ một cách hiệu quả so với 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT).

Ví dụ thí nghiệm 2: Thử nghiệm ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với thụ thể Fc FcγRIIIa và kiểu phụ của chúng

(1) Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_V158

Thụ thể Fc FcγRIIIa_V158 (còn gọi là CD16a_V158), có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG và điều tiết hiệu ứng ADCC. Hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_V158 được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá hoạt tính ADCC của kháng thể.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của kháng thể và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIIa_V158 bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng mẫu là dung dịch chứa 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. 5 µg/mL FcγRIIIa_V158 được cố định trên bộ cảm biến HIS1K trong 120 giây. Cân bằng bộ cảm biến trong dịch đệm trong 60 giây, và gắn kết của FcγRIIIa_V158 cố định trên bộ cảm biến với kháng thể ở nồng độ 31,25–500 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần) được xác định trong 60 giây. Kháng thể được phân ly trong dịch đệm trong 60 giây. Làm mới bộ cảm biến 4 lần trong 10 mM glyxin pH 1,5, mỗi lần trong 5 giây. Nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,3 Hz. Phân tích dữ liệu bằng cách khớp dữ liệu mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối

chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIIa_V158 được thể hiện trong bảng 2 và FIG. 6–FIG. 10.

Bảng 2: Động học gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIIa_V158

Kháng thể	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	6,12E-07	1,35E+05	3,74E+04	8,24E-02	8,34E-03	0,33-0,41
14C12H1L1(hG4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG1WT)	6,54E-08	2,61E+05	2,10E+04	1,71E-02	6,47E-04	0,80-1,17
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả cho thấy là cả 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1WT) đều gắn kết với FcγRIIIa_V158 với hằng số ái lực lần lượt là 6,21E-07M và 6,54E-08M; 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1TM) và 5C10H2L2-IgG1mt không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với FcγRIIIa_V158, và do đó không phân tích kết quả.

Kết quả gợi ý là hoạt tính gắn kết của 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγR IIIa_V158 được loại bỏ một cách hiệu quả so với 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1WT).

(2) Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_F158

Thụ thể Fc FcγRIIIa_F158 (còn gọi là CD16a_F158), có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG và điều tiết hiệu ứng ADCC. Hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT),

14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng với FcγRIIIa_F158 được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá hoạt tính ADCC của kháng thể.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_F158 bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng mẫu là dung dịch chứa 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. 5 μg/mL FcγRIIIa_F158 được cố định trên bộ cảm biến HIS1K trong 120 giây. Cân bằng bộ cảm biến trong dịch đệm trong 60 giây, và gắn kết của FcγRIIIa_F158 cố định trên bộ cảm biến với kháng thể ở nồng độ 31,25–500 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần) được xác định trong 60 giây. Kháng thể được phân ly trong dịch đệm trong 60 giây. Làm mới bộ cảm biến 4 lần trong 10 mM glyxin pH 1,5, mỗi lần trong 5 giây. Nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,3 Hz. Phân tích dữ liệu bằng cách khớp dữ liệu mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIIa_F158 được thể hiện trong bảng 3 và FIG. 11–FIG. 15.

Bảng 3: Động học gắn kết của kháng thể 14C12H1L1 và isotyp của nó với FcγRIIIa_F158

Kháng thể	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG1WT)	1,02E-07	2,52E+05	2,93E+04	2,56E-02	1,12E-03	0,34-0,57
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương

ứng.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1WT) gắn kết với FcγRIIIa_F158 với hằng số ái lực là 1,02E-07M; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1TM) và 5C10H2L2-IgG1mt không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với FcγRIIIa_F158, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả gợi ý là hoạt tính gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIIa_F158 được loại bỏ một cách hiệu quả so với 14C12H1L1(hG1WT).

Ví dụ thí nghiệm 3: Thử nghiệm ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với thụ thể Fc FcγRIIa và kiểu phụ của chúng

(1) Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_H131

Thụ thể Fc FcγRIIa_H131, còn gọi là CD32a_H131, có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG và tham gia vào độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Khả năng gắn kết của kháng thể đơn dòng trị liệu với thụ thể Fc sẽ ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của kháng thể. Hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_H131 được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể với thụ thể Fc.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_H131 bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng cố định là dung dịch chứa PBS, 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA, pH 7,4, và đệm pha loãng chất phân tích là dung dịch chứa 0,02% Tween-20, 0,02% casein và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. 5 μg/mL FcγRIIa_H131 được cố định trên bộ cảm biến NTA ở độ cao cố định khoảng 1,0 nm. Cân bằng bộ cảm biến trong dịch đệm chứa 0,02% Tween-20, 0,02% casein và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4 trong 300 giây

phong bế, và sự gắn kết của FcγRIIa_H131 cố định trên bộ cảm biến với kháng thể ở nồng độ 12,5–200 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần) được xác định trong 60 giây. Kháng thể được phân ly trong dịch đệm trong 60 giây. Làm mới bộ cảm biến trong 10 mM glyxin pH 1,7 và 10 nM nicken sulfat. Nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,6 Hz. Phân tích dữ liệu bằng cách khớp dữ liệu mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIa_H131 được thể hiện trong bảng 4 và FIG. 16–FIG. 20.

Bảng 4: Động học gắn kết của kháng thể 14C12H1L1 và isotyp của nó với FcγRIIa_H131

Mẫu ID	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	5,07E-08	2,57E+05	2,37E+04	1,30E-02	6,47E-04	0,18-0,35
14C12H1L1(hG1WT)	5,74E-08	4,65E+05	5,99E+04	2,67E-02	1,24E-03	0,82-1,12
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả cho thấy là cả 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT) đều gắn kết với FcγRIIa_H131 với hằng số ái lực lần lượt là 5,07E-08M và 5,74E-08M; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG1TM) và 5C10H2L2-IgG1mt không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với FcγRIIa_H131, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả gợi ý là hoạt tính gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_H131 được loại bỏ một cách hiệu quả so với 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT).

(2) Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_R131

Thụ thể Fc FcγRIIa_R131, còn gọi là CD32a_R131, có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG và tham gia vào độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Khả năng gắn kết của kháng thể đơn dòng trị liệu với thụ thể Fc sẽ ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của kháng thể. Hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_R131 được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể với thụ thể Fc.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIa_R131 bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng cố định là dung dịch chứa PBS, 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA, pH 7,4, và đệm pha loãng chất phân tích là dung dịch chứa 0,02% Tween-20, 0,02% casein và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. 5 μg/mL FcγRIIa_R131 được cố định trên bộ cảm biến NTA ở độ cao cố định khoảng 1,0 nm. Cân bằng bộ cảm biến trong dịch đệm chứa 0,02% Tween-20, 0,02% casein và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4 trong 300 giây phong bế, và sự gắn kết của FcγRIIa_R131 cố định trên bộ cảm biến với kháng thể ở nồng độ 12,5–200 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần) được xác định trong 60 giây. Kháng thể được phân ly trong dịch đệm trong 60 giây. Làm mới bộ cảm biến trong 10 mM glyxin pH 1,7 và 10 nM nicken sulfat. Nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,6 Hz. Phân tích dữ liệu bằng cách khớp dữ liệu mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIa_R131 được thể hiện trong bảng 5 và FIG. 21–FIG. 25.

Bảng 5: Động học gắn kết của kháng thể 14C12H1L1 và isotyp của nó với FcγRIIa_R131

Kháng thể	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	3,13E-08	3,50E+05	3,05E+04	1,10E-02	6,43E-04	0,21-0,46
14C12H1L1(hG1WT)	3,46E-08	6,60E+05	9,46E+04	2,28E-02	1,33E-03	0,39-0,83
14C12H1L1(hG1TM)	2,32E-07	4,04E+05	9,45E+04	9,38E-02	4,89E-03	0,19-0,35
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) gắn kết với FcγRIIa_R131 với hằng số ái lực lần lượt là 3,13E-08M, 3,46E-08M và 2,32E-07M; 14C12H1L1(hG1DM) và 5C10H2L2-IgG1mt không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với FcγRIIa_R131, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả gợi ý là trong số kháng thể có hoạt tính gắn kết, 14C12H1L1(hG1TM) có khả năng gắn kết yếu nhất và hoạt tính gắn kết thấp nhất với FcγRIIa_R131 so với 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT).

Ví dụ thí nghiệm 4: Thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIb

Thụ thể Fc FcγRIIb (còn gọi là CD32b), có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG, điều hoà giảm chức năng của tế bào miễn dịch, ức chế sự hoạt hoá và tăng sinh của tế bào miễn dịch và ức chế tiết xytokin. Hằng số ái lực của kháng thể với FcγRIIb được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá khả năng gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với thụ thể Fc.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIb

bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng cố định là dung dịch chứa PBS, 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA, pH 7,4, và đệm pha loãng chất phân tích là dung dịch chứa 0,02% Tween-20, 0,02% casein và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. 5 µg/mL hFcγRIIb-his được cố định trên bộ cảm biến NTA ở độ cao cố định khoảng 1,0 nm. Cân bằng bộ cảm biến trong dịch đệm chứa 0,02% Tween-20, 0,02% casein và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4 trong 300 giây phong bế, và sự gắn kết của hFcγRIIb-his cố định trên bộ cảm biến với kháng thể ở nồng độ 12,5–200 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần) được xác định trong 60 giây. Kháng thể được phân ly trong dịch đệm trong 60 giây. Làm mới bộ cảm biến trong 10 mM glyxin pH 1,7 và 10 nM nicken sulfat. Nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,6 Hz. Phân tích dữ liệu bằng cách khớp dữ liệu mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và kháng thể đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt với FcγRIIb được thể hiện trong bảng 6 và FIG. 26–FIG. 30.

Bảng 6: Động học gắn kết của kháng thể 14C12H1L1 và isotyp của nó với FcγRIIb

Kháng thể	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	5,62E-08	2,88E+05	2,94E+04	1,62E-02	7,63E-04	0,22-0,33
14C12H1L1(hG1WT)	6,13E-08	3,18E+05	3,48E+04	1,95E-02	8,96E-04	0,16-0,37
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả cho thấy là cả 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT) đều gắn kết với FcγRIIb với hằng số ái lực lần lượt là 5,62E-08M và 6,13E-08M; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG1TM) và 5C10H2L2-IgG1mt không có khả

năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với FcγRIIb, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả gợi ý là hoạt tính gắn kết của 14C12H1L1(hG1DM) và 14C12H1L1(hG1TM) với FcγRIIb được loại bỏ một cách hiệu quả so với 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1WT).

Ví dụ thí nghiệm 5: Thử nghiệm ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với C1q

C1q bổ thể trong huyết thanh có thể gắn kết với mảnh Fc của kháng thể IgG và điều tiết hiệu ứng CDC. Khả năng gắn kết của kháng thể đơn dòng trị liệu với C1q sẽ ảnh hưởng đến tính an toàn và hiệu lực của kháng thể. Hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) với C1q được đo trong thí nghiệm này bằng cách sử dụng hệ thống Fortebio Octet để đánh giá hoạt tính CDC của kháng thể.

Phương pháp xác định hằng số ái lực của kháng thể với C1q bằng hệ thống Fortebio Octet được mô tả vắn tắt như sau: đệm pha loãng mẫu là dung dịch chứa 0,02% Tween-20 và 0,1% BSA trong PBS, pH 7,4. 50 µg/mL kháng thể được cố định trên bộ cảm biến FAB2G ở độ cao cố định khoảng 2,0 nm. Cân bằng bộ cảm biến trong dịch đệm trong 60 giây để phong bế, và sự gắn kết của kháng thể cố định trên bộ cảm biến với kháng nguyên C1q ở nồng độ 1,25–20 nM (dịch pha loãng theo bậc hai lần) được xác định trong 60 giây. Kháng nguyên và kháng thể được phân ly trong dịch đệm trong 60 giây. Làm mới bộ cảm biến 4 lần trong 10 mM glyxin pH 1,7, mỗi lần trong 5 giây. Tốc độ lắc đĩa mẫu là 1000 vòng/phút, nhiệt độ là 30°C và tần số là 0,6 Hz. Phân tích dữ liệu bằng cách khớp dữ liệu mô hình 1:1 để thu được hằng số ái lực. Phần mềm thu được dữ liệu là Fortebio Data Acquisition 7.0, và phần mềm phân tích dữ liệu là Fortebio Data Analysis 7.0.

Kết quả của thử nghiệm hằng số ái lực của 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4), 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) và 5C10H2L2-IgG1mt đối chứng với C1q được thể hiện trong bảng 7 và FIG. 31–FIG. 35.

Bảng 7: Động học gắn kết của kháng thể 14C12H1L1 và isotyp của nó với C1q

Kháng thể	K_D (M)	kon (1/Ms)	SE (kon)	kdis (1/s)	SE (kdis)	Rmax (nm)
14C12H1L1(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG4)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14C12H1L1(hG1WT)	1,35E-09	4,83E+06	4,24E+05	6,54E-03	5,33E-04	0,32-0,53
14C12H1L1(hG1TM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5C10H2L2-IgG1mt	4,43E-09	2,38E+06	4,21E+05	1,05E-02	1,10E-03	0,19-0,26

N/A chỉ ra là kháng thể không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với kháng nguyên, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1WT) gắn kết với C1q với hằng số ái lực là 1,35E-09M; 14C12H1L1(hG1DM), 14C12H1L1(hG4) và 14C12H1L1(hG1TM) không có khả năng gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết cực kỳ thấp với C1q, và do đó không phân tích kết quả và không thu được dữ liệu tương ứng.

Kết quả này cũng chứng tỏ là 5C10H2L2-IgG1mt gắn kết với C1q với hằng số ái lực là 4,43E-09, cho thấy là nó có hoạt tính gắn kết với C1q và có thể gây hiệu ứng CDC.

Ví dụ thí nghiệm 6: Hoạt tính dược lực học của 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) ở hệ đồng nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi và tế bào Raji-PDL1

Trong thí nghiệm này, hoạt tính dược lực học của kháng thể kháng PD-1 14C12H1L1 (hG1WT) và 14C12H1L1 (hG1TM), và kháng thể kháng PD-L1 đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt và nivolumab làm giảm nhẹ sự ức chế miễn dịch được điều tiết bởi PD-1/PD-L1 được phát hiện trong hệ đồng nuôi cấy tế bào đơn nhân máu ngoại vi và tế bào Raji-PDL1.

Trong phản ứng lympho bào hỗn hợp, khi tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập (chứa tế bào miễn dịch biểu hiện PD-1 có hiệu lực miễn dịch) và tế bào Raji-PDL1 biểu hiện PD-L1 được đồng nuôi cấy, tương tác của PD-1 và PD-L1 có thể điều tiết sự ức chế chức năng của tế bào miễn dịch, cho thấy giảm tiết xytokin IFN-γ và IL-2. Kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1 có thể làm giảm nhẹ sự

ức chế miễn dịch này của tế bào miễn dịch, dẫn đến sự tiết xytokin gia tăng. Raji là dòng tế bào B. Như mô tả ở trên, tế bào B có thể được sử dụng làm tế bào trình diện kháng nguyên để điều tiết đáp ứng miễn dịch của tế bào miễn dịch đối với tế bào khối u. Theo sáng chế, hệ đồng nuôi cấy Raji-PDL1 và PBMC được sử dụng để đánh giá hoạt tính dược lý của kháng thể kháng PD-1, và hệ đồng nuôi cấy tế bào khối u và Raji-PDL1, PBMC được sử dụng để đánh giá hoạt tính dược lý của kháng thể kháng PD-1 ở các khối u khác nhau.

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân lập bằng Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Cat No.:171440-02), và tiếp đó được kích thích bằng SEB (0,5 μg/mL) trong 2 ngày. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi trưởng thành đã được kích thích (1×10^5 tế bào/giếng) và tế bào Raji-PDL1 (1×10^5 tế bào/giếng) đã điều trị bằng MMC (Mitomycin C với nồng độ điều trị là 2 μg/mL) trong 1 giờ được thêm vào đĩa 96 giếng trước khi thêm 14C12H1L1(hG1WT), 14C12H1L1(hG1TM), kháng thể đối chứng nivolumab hoặc kháng thể kháng PD-L1 đối chứng 5C10H2L2-IgG1mt vào. Hỗn hợp được trộn kỹ và ủ. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy và phát hiện tiết IFN-γ và tiết IL-2 bằng kit ELISA (mua của Dakewe Biotech Co., Ltd.).

Kết quả của việc tiết IFN-γ trong phản ứng lympho bào hỗn hợp được thể hiện trên FIG. 36. Kết quả cho thấy là trong hệ đồng nuôi cấy PBMC và Raji-PDL1, 14C12H1L1(hG1TM) gây cảm ứng tiết IFN-γ cao hơn đáng kể so với hệ được gây cảm ứng bằng 14C12H1L1(hG1WT), nivolumab hoặc 5C10H2L2-IgG1mt ở mức liều dùng giống nhau.

Kết quả việc tiết IL-2 trong phản ứng lympho bào hỗn hợp được thể hiện trên FIG. 37. Kết quả cho thấy là trong hệ đồng nuôi cấy PBMC và Raji-PDL1, 14C12H1L1(hG1TM) gây cảm ứng tiết IL-2 cao hơn đáng kể so với hệ được gây cảm ứng bằng 14C12H1L1(hG1WT), nivolumab hoặc 5C10H2L2-IgG1mt ở mức liều dùng giống nhau.

Kết quả gợi ý là hoạt tính dược lực học của 14C12H1L1(hG1TM) làm giảm nhẹ sự ức chế miễn dịch bởi PD-1/PD-L1 là cao hơn đáng kể so với hoạt tính của nivolumab, 14C12H1L1(hG1WT) hoặc 5C10H2L2-IgG1mt.

Ví dụ thí nghiệm 7: Hoạt tính thực bào được điều tiết bởi kháng thể của Nivolumab, 14C12H1L1(hG1WT) và 14C12H1L1(hG1TM) đối với CHO-K1-PD1

Để phát hiện hoạt tính thực bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), đại thực bào của chuột được sử dụng làm tế bào hiệu ứng và dòng tế bào biểu hiện quá mức PD1 được sử dụng làm tế bào đích. Tuỷ xương đùi của chuột Blab/c (mua của Guangdong Medical Laboratory Animal Center) trước tiên được lấy mẫu vô trùng và phân giải bằng đệm phân giải hồng cầu trên đá trong 5 phút. Ngừng phân giải bằng môi trường hoàn chỉnh DMEM (chứa 10% FBS), và ly tâm dịch phân giải ở 1000 vòng/phút và rửa hai lần. Tái tạo hỗn dịch pellet tế bào trong 10 mL môi trường hoàn chỉnh DMEM và M-CSF được thêm vào ở nồng độ phản ứng 100 ng/mL. Nuôi cấy tế bào trong 7 ngày ở 37°C và 5% CO_2 trong buồng nuôi cấy tế bào để gây cảm ứng. Một nửa môi trường được hoán đổi và M-CSF được thêm vào vào ngày 3 và ngày 5. Hoàn thành việc gây cảm ứng tế bào vào ngày 7. Thuỷ phân tế bào bằng 0,05% trypsin. Thu gom đại thực bào, và ly tâm ở 750× g trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và tạo hỗn dịch tế bào trong môi trường hoàn chỉnh DMEM (chứa 10% FBS) và đếm số lượng. Tế bào được điều chỉnh đến mật độ thích hợp và nạp đầy vào ống nghiệm EP vô khuẩn để sử dụng tiếp.

Tế bào CHO-K1-PD1 (dòng tế bào CHO-K1 biểu hiện quá mức PD1) được ly tâm ở 170× g trong 5 phút, rửa một lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch và đếm số lượng. Xác định khả năng sống. Carboxyfloresxein diaxetat sucxinimidyl este (CFSE) được pha loãng đến 2,5 μM bằng PBS để tái tạo hỗn dịch tế bào (mật độ nhuộm màu: 10 triệu tế bào/mL). Ủ lượng thích hợp của tế bào trong thiết bị ủ tế bào trong 20 phút. 6 mL môi trường hoàn chỉnh DMEM được thêm vào để dừng nhuộm màu. Tế bào được ly tâm ở 170× g trong 5 phút, và loại bỏ dịch nổi. 1 mL môi trường hoàn chỉnh DMEM được thêm vào. Ủ tế bào trong thiết bị ủ trong 10 phút, và điều chỉnh đến mật độ thí nghiệm. Tế bào được ký hiệu là CHO-K-PD1-CFSE.

Pha loãng kháng thể thử nghiệm trong môi trường hoàn chỉnh DMEM đến 20, 2 và 0,2 μg/mL (nồng độ phản ứng là 10, 1 và 0,1 μg/mL). Kháng thể IgG1 kháng HEL và môi trường được sử dụng làm nhóm đối chứng isotyp và nhóm đối chứng mẫu trắng. Theo thiết kế nghiên cứu, kháng thể đã pha loãng và tế bào CHO-K1-PD1-CFSE được thêm vào ống nghiệm 1,5-mL EP có chứa đại thực bào (thể tích cuối cùng là 100 μL và tỷ lệ tế bào hiệu ứng-so với tế bào đích là 50000:150000). Trộn kỹ hỗn hợp để tái tạo hỗn dịch và ủ trong thiết bị ủ ở 37°C trong 2 giờ. 800 μL PBS có

chứa1% albumin huyết thanh bò (BSA) được thêm vào mỗi ống nghiệm ở nhiệt độ phòng. Ly tâm hỗn hợp ở 500× g trong 5 phút, và loại bỏ dịch nổi. Rửa tế bào một lần bằng 800 µL 1% PBSA. Kháng thể kháng-CD11b của chuột/người APC (Biolegend, Cat. No.: 101212) được pha loãng 400 lần bằng PBSA và thêm vào mẫu tương ứng ở 100 µL/mẫu. Trộn kỹ hỗn hợp, ủ trên đá trong 40 phút, và rửa bằng 800 µL 1% PBSA và ly tâm ở 1200× g trong 5 phút hai lần, và loại bỏ dịch nổi. 200 µL 1% PBSA được thêm vào mỗi ống nghiệm để tái tạo hỗn dịch tế bào. Chuyển tế bào sang ống nghiệm tải nạp và phân tích bằng thiết bị đếm tế bào dòng chảy BD FACS Calibur. Đại thực bào trong hệ thống là APC^+ dương tính, và đại thực bào tham gia vào quá trình thực bào là APC và CFSE dương tính kép. Tỷ lệ thực bào được xác định là tỷ lệ số lượng tế bào dương tính kép so với số lượng tế bào dương tính APC, và hoạt tính ADCP được điều tiết bởi kháng thể được đánh giá. Hoạt tính ADCP của mỗi nhóm, được biểu thị bằng P%, được tính theo công thức dưới đây:

$$P\% = \frac{số\ lượng\ đại\ thực\ bào\ tham\ gia\ vào\ quá\ trình\ thực\ bào}{tổng\ số\ lượng\ đại\ thực\ bào} \times 100\%$$

Kết quả được thể hiện trên FIG. 38.

Kết quả cho thấy là ở nồng độ giống nhau, tỷ lệ thực bào của 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab lần lượt gấp 3,94 và 4,26 lần so với tỷ lệ của kháng thể kháng HEL đối chứng isotyp, cho thấy là 14C12H1L1 (hG1WT) và nivolumab có hiệu ứng ADCP; và ở nồng độ như nhau, tỷ lệ thực bào của 14C12H1L1(hG1TM) được so sánh với tỷ lệ này của kháng thể đối chứng isotyp, cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) không có hiệu ứng ADCP.

Kết quả gợi ý là đột biến axit amin của 14C12H1L1(hG1TM) có thể làm mất đi một cách hiệu quả hiệu ứng ADCP, và đạt được hiệu quả kỹ thuật bất ngờ.

Ví dụ thí nghiệm 8: Đánh giá dược lực học của 14C12H1L1(hG1TM) + anlotinib hydroclorua ở mô hình chuột suy giảm miễn dịch Scid/beige mang khối u ghép khác loài dưới da HCC827 ung thư phổi không tế bào nhỏ của người

Chuột suy giảm miễn dịch, Scid/beige, giống cái (mua của Vital River) được chia thành 8 nhóm. 0,2 µg/mL độc tố ruột B của *Staphylococcus aureus* (SEB) được thêm vào hỗn dịch PBMC 1 triệu/mL. PBMC được ủ trong 3 ngày để hoạt hoá làm tăng biểu hiện của PD1 ở PBMC. Chuột được ghép dưới da bằng hỗn hợp 800000

PBMC đã hoạt hoá bởi SEB và 6000000 tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ của người HCC827 (mua của GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) vào ngày 0, và được phân thành 2 nhóm, nhóm kháng thể đối chứng isotyp (nghĩa là, kháng thể kháng HEL, được điều chế bởi Zhongshan Akeso Biopharma như mô tả ở trên) và nhóm 14C12H1L1(hG1TM) + anlotinib hydroclorua. 14C12H1L1(hG1TM) được sử dụng qua tĩnh mạch đuôi một lần hàng tuần (liều dùng thứ nhất được sử dụng đồng thời dưới da với tế bào), và anlotinib được sử dụng qua đường miệng qua ống xông hàng ngày trong 30 ngày. Quy trình cụ thể được thể hiện trong Bảng 8. Đo kích thước khối u liên tục trong thí nghiệm, và tính toán thể tích theo công thức: a (chiều dài khối u) × b (chiều rộng khối u) × b (chiều rộng khối u)/2.

Bảng 8: Phân nhóm và sơ đồ thí nghiệm

Nhóm	n	Mô hình	Thông tin liều lượng
Đối chứng isotyp	7	6000000 tế bào HCC827 + 800000 PBMC (được hoạt hoá bởi-SEB trong 3 ngày) Mảnh ghép khác loài dưới da (d0)	kháng thể kháng HEL, 10 mg/kg, được sử dụng qua tĩnh mạch đuôi một lần/tuần 9 liều dùng (liều dùng thứ nhất được sử dụng đồng thời dưới da với tế bào)
14C12H1L1(hG1TM) + anlotinib	8		14C12H1L1(hG1TM), 10 mg/kg, được sử dụng qua tĩnh mạch đuôi một lần/tuần 9 liều dùng (liều dùng thứ nhất được sử dụng đồng thời dưới da với tế bào) Anlotinib hydroclorua, 3 mg/kg, được sử dụng qua đường miệng qua ống xông hàng ngày trong 30 ngày

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên FIG. 39.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) + anlotinib hydroclorua ức chế đáng kể mức gia tăng thể tích khối u của tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ của người, chỉ ra tác dụng tiêu diệt khối u tốt.

Ví dụ thí nghiệm 9: Đánh giá dược lực học của 14C12H1L1(hG1TM) ở mô hình chuột C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73 mang khối u ghép dưới da ung thư đại tràng MC38-hPDL1/hCD73

Dòng tế bào của chuột MC38 là dòng tế bào ung thư đại tràng-trực tràng ở

chuột. Đã chứng tỏ là dòng tế bào MC38 là mô hình hữu ích để nghiên cứu khối u MSI-H/dMMR của người (Efremova M et al., *Nat Commun.*, 2018; 9(1):32).

Chuột cái C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73 (mua của Nanjing GemPharmatech Co., Ltd.) được phân thành 8 nhóm và ghép dưới da tế bào ung thư đại tràng MC38-hPDL1/hCD73 (mua của Nanjing GemPharmatech Co., Ltd.) (2×10^6 tế bào/100 µL/chuột) vào chân trước, bên phải. Xác định ngày ghép là D0. Thể tích liều dùng được điều chỉnh theo trọng lượng cơ thể: 10 µL/g thể trọng chuột (g). Kháng thể kháng HEL (chế phẩm và nguồn gốc là giống như trong Ví dụ thí nghiệm 8) hoặc 14C12H1L1(hG1TM) được sử dụng trong màng bụng hai lần hàng tuần trong 3 tuần, tổng cộng 6 liều dùng. Quy trình cụ thể được thể hiện trong Bảng 9. Đo kích thước khối u liên tục trong thí nghiệm, và thể tích khối u được tính toán theo công thức sau: thể tích khối u (mm^3) = (chiều dài khối u × (chiều rộng)^2)/2.

Bảng 9: Quy trình và phân nhóm

Nhóm	N	Liều dùng (mg/kg)	Tuần suất	Chu trình
Đối chứng isotyp	8	10	BIW* 3	Tổng cộng 6 liều dùng
14C12H1L1 (hG1TM)	8	1	BIW*3	Tổng cộng 6 liều dùng

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên FIG. 40.

Kết quả cho thấy là so với kháng thể đối chứng isotyp, tăng trưởng khối u bị ức chế, cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) có thể ức chế đáng kể sự tăng sinh của tế bào MC38, và có thể điều trị hiệu quả khối u rắn có kiểu hình MSI-H/dMMR, như bệnh ung thư đại tràng và/hoặc trực tràng.

Ví dụ thí nghiệm 10: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư dạ dày của người KATO III bởi 14C12H1L1(hG1TM)

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của người khoẻ mạnh theo hướng dẫn sử dụng Ficoll-Paque™ Plus, và đếm số lượng PBMC đã phân lập và làm đông lạnh. Nuôi cấy tế bào Raji-PDL1 trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS, và tế bào KATO III (mua của Chinese Academy of Sciences Shanghai Cell Bank) được

nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh DMEM + 10% FBS. Làm rã đông PBMC và hoạt hoá bằng 0,5 μg/mL SEB trong hai ngày. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng 2 μg/mL MMC trong 1 giờ. Thu gom PBMC đã hoạt hoá bằng SEB và tế bào Raji-PDL1 đã điều trị bằng MMC, rửa hai lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và đếm số lượng. Nhân giống tế bào Raji-PDL1 và PBMC trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào KATO III ở pha tăng trưởng logarit được thu gom và nhân giống trên đĩa 96 giếng ở 5×10^4 tế bào/giếng. Thêm vào kháng thể đã pha loãng theo thiết kế nghiên cứu. Trộn đều hỗn hợp và ủ trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào và phân tích IL-2 theo hướng dẫn sử dụng của kit ELISA. Môi trường trong thí nghiệm này là 10% FBS + RPMI 1640.

Kết quả thí nghiệm được trình bày trên FIG. 41.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) được đồng nuôi cấy với tế bào ung thư dạ dày của người KATO III thể hiện hoạt tính được lý cao hơn so với 14C12H1L1(hG1WT) hoặc nivolumab. 14C12H1L1(hG1TM) có thể kích thích PBMC tiết nhiều IL-2 hơn ở mức nồng độ giống nhau, cho thấy tiềm năng để điều trị bệnh ung thư dạ dày.

<u>Ví dụ thí nghiệm 11: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư mũi họng CNE-2Z bởi 14C12H1L1(hG1TM)</u>

Raji-PDL1, tế bào CNE-2Z (mua của GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) và PBMC được rã đông, trong đó PBMC được kích thích bằng SEB (0,5 μg/mL) trong hai ngày sau 2 giờ rã đông. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng MMC (Mito-mycin C với nồng độ điều trị là 2 μg/mL và mật độ điều trị tế bào là 200×10^4 tế bào/mL) trong 1 giờ. Thu gom PBMC, và rửa tế bào Raji-PDL1 đã điều trị hai lần bằng PBS. Thêm PBMC và tế bào Raji-PDL1 vào đĩa tế bào ở nồng độ 10×10^4 tế bào/giếng, và thêm tế bào CNE-2Z ở 3×10^4 tế bào/giếng. Kháng thể (với nồng độ cuối cùng là 300 nM và thể tích cuối cùng là 200 μL) được thêm vào theo thiết kế thí nghiệm, và được đồng nuôi cấy với tế bào trong 3 ngày. Thu gom dịch nổi nuôi cấy và phân tích IL-2. Môi trường trong thí nghiệm này là 10% FBS + RPMI 1640.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 42.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) được đồng nuôi cấy với tế bào ung thư mũi họng CNE-2Z thể hiện hoạt tính được lý cao hơn so với 14C12H1L1(hG1WT). 14C12H1L1(hG1TM) có thể kích thích PBMC tiết nhiều IL-2 hơn ở mức nồng độ giống nhau, cho thấy tiềm năng để điều trị bệnh ung thư mũi họng.

Ví dụ thí nghiệm 12: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào u trung biểu mô NCI-H2452 bởi 14C12H1L1(hG1TM)

Tế bào Raji-PDL1, NCI-H2452 (mua của Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences) và PBMC được rã đông, trong đó PBMC được kích thích bằng SEB (0,5 μg/mL) trong hai ngày sau 2 giờ rã đông. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng MMC (Mito-mycin C với nồng độ điều trị là 2 μg/mL và mật độ điều trị tế bào là 200×10^4 tế bào/mL) trong 1 giờ. Thu gom PBMC, và rửa tế bào Raji-PDL1 đã điều trị hai lần bằng PBS. Thêm PBMC và tế bào Raji-PDL1 vào đĩa tế bào ở nồng độ 10×10^4 tế bào/giếng, và tế bào NCI-H2452 được thêm vào ở nồng độ 3×10^4 tế bào/giếng. Kháng thể (với nồng độ cuối cùng là 300 nM và thể tích cuối cùng là 200 μL) được thêm vào theo thiết kế thí nghiệm, và được đồng nuôi cấy với tế bào trong 3 ngày. Thu gom dịch nổi nuôi cấy và phân tích IL-2. Môi trường trong thí nghiệm này là 10% FBS + RPMI 1640.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 43.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) được đồng nuôi cấy với tế bào u trung biểu mô của người NCI-H2452 thể hiện hoạt tính được lý cao hơn so với hoạt tính của 14C12H1L1(hG1WT). 14C12H1L1(hG1TM) có thể kích thích PBMC tiết nhiều IL-2 hơn ở mức nồng độ giống nhau, cho thấy tiềm năng để điều trị u trung biểu mô.

Ví dụ thí nghiệm 12: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư phổi tế bào nhỏ NCI-H446 bởi 14C12H1L1(hG1TM)

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của người khoẻ mạnh theo hướng dẫn sử dụng Ficoll-Paque™ Plus, và đếm số lượng PBMC đã phân lập và làm đông lạnh. Tế bào Raji-PDL1 và NCI-H446 (mua của Chinese Academy of Sciences, Shanghai

Institutes for Biological Sciences) được nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS. Làm rã đông PBMC và hoạt hoá bằng 0,5 µg/mL SEB trong hai ngày. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng 2 µg/mL MMC trong 1 giờ. Thu gom PBMC đã hoạt hoá bằng SEB và tế bào Raji-PDL1 đã điều trị bằng MMC, rửa hai lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và đếm số lượng. Nhân giống tế bào Raji-PDL1 và PBMC trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào NCI-H446 ở pha tăng trưởng logarit được thu gom và nhân giống trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 8×10^4 tế bào/giếng. Thêm vào kháng thể đã pha loãng theo thiết kế nghiên cứu. Trộn đều hỗn hợp và ủ trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào và phân tích IL-2 theo hướng dẫn sử dụng của kit ELISA. Môi trường trong thí nghiệm này là 10% FBS + RPMI 1640.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 44.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM) được đồng nuôi cấy với tế bào ung thư phổi tế bào nhỏ của người NCI-H446 thể hiện hoạt tính dược lý tương đương hoặc cao hơn so với 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab dựa vào hoạt tính ADCC, CDC và ADCP được loại bỏ một cách hiệu quả. 14C12H1L1(hG1TM) có thể kích thích PBMC tiết IL-2 ở mức tương đương hoặc cao hơn ở mức nồng độ giống nhau, cho thấy tiềm năng để điều trị bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ.

Ví dụ thí nghiệm 13: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường một cách hiệu quả của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư mũi họng của người CNE-2Z bởi 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib hydroclorua

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của người khoẻ mạnh theo hướng dẫn sử dụng Ficoll-Paque™ Plus, và đếm số lượng PBMC đã phân lập và làm đông lạnh. Tế bào Raji-PDL1 và CNE-2Z (mua của GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) được nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS. Làm rã đông PBMC và hoạt hoá bằng 0,5 µg/mL SEB trong hai ngày. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng 2 µg/mL MMC trong 1 giờ. Thu gom PBMC đã hoạt hoá bằng SEB và tế bào Raji-PDL1 đã điều trị bằng MMC, rửa hai lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và đếm số lượng. Nhân giống tế bào Raji-PDL1 và PBMC trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào

CNE-2Z ở pha tăng trưởng logarit được thu gom và nhân giống trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 3×10^4 tế bào/giếng. Kháng thể đã pha loãng và anlotinib được thêm vào theo thiết kế nghiên cứu. Trộn đều hỗn hợp và ủ trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào và phân tích IL-2 theo hướng dẫn sử dụng của kit ELISA. Môi trường trong thí nghiệm này là 10% FBS + RPMI 1640.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 45. So với kháng thể kháng HEL và liệu pháp đơn anlotinib, 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab làm tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư mũi họng của người CNE-2Z được đặc trưng bởi mức tiết IL-2 gia tăng đáng kể. 14C12H1L1(hG1TM) có hoạt tính dược lý ưu việt hơn so với hoạt tính của 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab.

Hơn nữa, hoạt tính dược lý của 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib trong việc kích thích hoạt hoá tế bào miễn dịch là ưu việt hơn hoạt tính của liệu pháp đơn 14C12H1L1(hG1TM), liệu pháp đơn 14C12H1L1(hG1WT), và liệu pháp đơn nivolumab và cũng ưu việt hơn hoạt tính của 14C12H1L1(hG1WT) kết hợp với anlotinib và nivolumab kết hợp với anlotinib.

Kết quả trên chỉ ra là 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib có tiềm năng để điều trị bệnh ung thư mũi họng ở người.

Ví dụ thí nghiệm 14: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường đáng kể của tế bào miễn dịch đối với tế bào khối u SW48 có kiểu hình MSI-H/dMMR bởi 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với Anlotinib

SW48 là dòng tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người và được nhận diện với kiểu hình MSI-H/dMMR (Branch P et al., (1995), *Cancer Res*, 55(11): 2304–2309.). Nó được sử dụng để phát hiện đáp ứng tăng cường của tế bào miễn dịch đối với khối u có kiểu hình MSI-H/dMMR bởi 14C12H1L1(hG1TM).

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của người khoẻ mạnh theo hướng dẫn sử dụng Ficoll-Paque™ Plus, và đếm số lượng PBMC đã phân lập và làm đông lạnh. Nuôi cấy tế bào Raji-PDL1 trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS, và tế bào SW48 (mua của GuangZhou Jennio Biotech Co., Ltd.) được nuôi cấy trong

môi trường hoàn chỉnh DMEM + 10% FBS. Làm rã đông PBMC và hoạt hoá bằng 0,5 μg/mL SEB trong hai ngày. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng 2 μg/mL MMC trong 1 giờ. Thu gom PBMC đã hoạt hoá bằng SEB và tế bào Raji-PDL1 đã điều trị bằng MMC, rửa hai lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và đếm số lượng. Nhân giống tế bào Raji-PDL1 và PBMC trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào SW48 ở pha tăng trưởng logarit được thu gom và nhân giống trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng. Thêm kháng thể đã pha loãng và anlotinib vào theo thiết kế nghiên cứu. Trộn đều hỗn hợp và ủ trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào và phân tích IL-2 theo hướng dẫn sử dụng của kit ELISA. Môi trường trong thí nghiệm này là 10% FBS + RPMI 1640.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 46.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab làm tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người SW48 có kiểu hình MSI-H/dMMR được đặc trưng bởi mức tiết IL-2 gia tăng đáng kể so với kháng thể kháng HEL. 14C12H1L1(hG1TM) có hoạt tính dược lý ưu việt hơn hoạt tính của 14C12H1L1(hG1WT).

Hơn nữa, hoạt tính dược lý của 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib trong việc kích thích hoạt hoá tế bào miễn dịch là ưu việt hơn hoạt tính của liệu pháp đơn 14C12H1L1(hG1WT), liệu pháp đơn 14C12H1L1(hG1TM), và liệu pháp đơn nivolumab và cũng ưu việt hơn hoạt tính của 14C12H1L1(hG1WT) kết hợp với anlotinib và nivolumab kết hợp với anlotinib.

Kết quả trên chứng tỏ là 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib có tiềm năng để điều trị khối u rắn có kiểu hình MSI-H/dMMR, cụ thể là bệnh ung thư đại tràng và/hoặc bệnh ung thư trực tràng có kiểu hình MSI-H/dMMR.

Ví dụ thí nghiệm 15: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường đáng kể của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người SW837 có kiểu hình MSI-H/dMMR bởi 14C12H1L1(hG1TM)

SW837 là dòng tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người có kiểu hình

không phải là MSI-H/dMMR (nghĩa là, MSS) (Guo J et al., *Cancer Res.*, 2011;71(8):2978-2987.), và được sử dụng để phát hiện đáp ứng tăng cường của tế bào miễn dịch đối với khối u không phải là kiểu hình MSI-H/dMMR (nghĩa là, MSS) bởi 14C12H1L1(hG1TM) trong ví dụ này.

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của người khoẻ mạnh theo hướng dẫn sử dụng Ficoll-Paque™ Plus, và đếm số lượng PBMC đã phân lập và làm đông lạnh. Nuôi cấy tế bào Raji-PDL1 trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS, và tế bào SW837 (mua của Shanghai Honsun Biological Technology Co., Ltd) được nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh 10% FBS + Leibovitz's L-15 (mua của Gibco). Làm rã đông PBMC và hoạt hoá bằng 0,5 μg/mL SEB trong hai ngày. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng 2 μg/mL MMC trong 1 giờ. Thu gom PBMC đã hoạt hoá bằng SEB và tế bào Raji-PDL1 đã điều trị bằng MMC, rửa hai lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và đếm số lượng. Nhân giống tế bào Raji-PDL1 và PBMC trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào SW837 ở pha tăng trưởng logarit được thu gom và nhân giống trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 5×10^4 tế bào/giếng. Thêm vào kháng thể đã pha loãng theo thiết kế nghiên cứu. Trộn đều hỗn hợp và ủ trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào và phân tích IL-2 theo hướng dẫn sử dụng của kit ELISA.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 47.

Kết quả cho thấy là 14C12H1L1(hG1TM), 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab làm tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người SW837 có kiểu hình phông phải là MSI-H/dMMR. Hoạt tính dược lý của 14C12H1L1(hG1TM) trong nhóm liều dùng trung bình và cao là ưu việt hơn hoạt tính của 14C12H1L1(hG1WT), đặc trưng bởi mức tiết IL-2 gia tăng đáng kể.

Kết quả trên chứng tỏ là 14C12H1L1(hG1TM) có hoạt tính dược lý tốt hơn hoặc tương đương với 14C12H1L1(hG1WT) và nivolumab dựa vào việc làm mất đi một cách hiệu quả hiệu ứng ADCC, CDC hoặc ADCP, cho thấy tiềm năng để điều trị khối u rắn có kiểu hình không phải là MSI-H/dMMR (nghĩa là, MSS), cụ thể là bệnh ung thư đại tràng và/hoặc bệnh ung thư trực tràng có kiểu hình không phải là MSI-

H/dMMR.

Ví dụ thí nghiệm 16: Đáp ứng miễn dịch được tăng cường đáng kể của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người SW837 có kiểu hình MSI-H/dMMR bởi 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với Anlotinib

PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của người khoẻ mạnh theo hướng dẫn sử dụng Ficoll-Paque™ Plus, và đếm số lượng PBMC đã phân lập và làm đông lạnh. Nuôi cấy tế bào Raji-PDL1 trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và tế bào SW837 được nuôi cấy trong môi trường hoàn chỉnh Leibovitz's L-15 + 10% FBS. Làm rã đông PBMC và hoạt hoá bằng 0,5 μg/mL SEB trong hai ngày. Vào ngày thí nghiệm, điều trị tế bào Raji-PDL1 bằng 2 μg/mL MMC trong 1 giờ. Thu gom PBMC đã hoạt hoá bằng SEB và tế bào Raji-PDL1 đã điều trị bằng MMC, rửa hai lần bằng PBS, tái tạo hỗn dịch trong môi trường hoàn chỉnh RPMI 1640 + 10% FBS và đếm số lượng. Nhân giống tế bào Raji-PDL1 và PBMC trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào SW837 ở pha tăng trưởng logarit được thu gom và nhân giống trên đĩa 96 giếng ở nồng độ 5×10^4 tế bào/giếng. Thêm vào kháng thể đã pha loãng theo thiết kế nghiên cứu. Trộn đều hỗn hợp và ủ trong thiết bị ủ 5% CO_2 ở 37°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thu gom dịch nổi nuôi cấy tế bào và phân tích IL-2 theo hướng dẫn sử dụng của kit ELISA.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 48.

Kết quả chứng tỏ là so với 14C12H1L1(hG1WT) kết hợp với anlotinib và nivolumab kết hợp với anlotinib, 14C12H1L1(hG1TM) kết hợp với anlotinib làm tăng cường đáng kể đáp ứng miễn dịch của tế bào miễn dịch đối với tế bào ung thư đại tràng-trực tràng của người SW837 có kiểu hình không phải là MSI-H/dMMR được đặc trưng bởi mức tiết IL-2 gia tăng đáng kể, cho thấy tác dụng trị liệu ưu việt đối với khối u rắn có kiểu hình không phải là MSI-H/dMMR, cụ thể là bệnh ung thư đại tràng và/hoặc bệnh ung thư trực tràng có kiểu hình không phải là MSI-H/dMMR.

Mặc dù phương án cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu là nhiều cải biến và thay thế có thể thực hiện đối với thông tin chi tiết đã đề cập, và thay đổi này sẽ thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Phạm vi đầy đủ của sáng chế được đưa ra trong yêu cầu bảo hộ kèm theo và phương án tương đương bất kỳ của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể, trong đó:

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm HCDR1-HCDR3 có trình tự axit amin được đưa ra tương ứng trong SEQ ID NO: 19–SEQ ID NO: 21, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm LCDR1-LCDR3 có trình tự axit amin được đưa ra tương ứng trong SEQ ID NO: 22–SEQ ID NO: 24;

vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin được đưa ra trong SEQ ID NO: 8;

kháng thể này có kiểu phụ IgG1 của người;

trong đó, theo hệ đánh số EU, vùng ổn định chuỗi nặng của kháng thể bao gồm các đột biến sau đây: L234A, L235A và G237A.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng được đưa ra trong SEQ ID NO: 16, và chuỗi nhẹ được đưa ra trong SEQ ID NO: 12.

3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-7} M.

4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-6} M.

6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-5} M.

8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác

định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-4} M.

10. Kháng thể theo điểm 9, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-3} M hoặc lớn hơn.

12. Kháng thể theo điểm 11, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

13. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này không có tín hiệu gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết nhỏ hơn 0,1 nm với FcγRIIIa_F158, FcγRI, FcγRIIa_H131, FcγRIIIa_V158 và/hoặc FcγRIIb.

14. Kháng thể theo điểm 13, trong đó tín hiệu gắn kết đề cập đến đáp ứng được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

15. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với C1q ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-9} M.

16. Kháng thể theo điểm 15, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

17. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với C1q ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-8} M.

18. Kháng thể theo điểm 17, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

19. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với C1q ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-7} M.

20. Kháng thể theo điểm 19, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

21. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với C1q ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-6} M.

22. Kháng thể theo điểm 21, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

23. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này gắn kết với C1q ở hằng số cân bằng phân ly lớn hơn 10^{-5} M hoặc lớn hơn.

24. Kháng thể theo điểm 23, trong đó hằng số cân bằng phân ly được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

25. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này không có tín hiệu gắn kết hoặc tín hiệu gắn kết nhỏ hơn 0,1 nm với C1q.

26. Kháng thể theo điểm 13, trong đó tín hiệu gắn kết đề cập đến đáp ứng được đo bằng công cụ xác định sự tương tác phân tử Fortebio Octet.

27. Phân tử axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26.

28. Vectơ, chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 27.

29. Tế bào chủ, chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 27 hoặc vectơ theo điểm 28.

30. Thể liên hợp, bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và phần được liên hợp, trong đó phần được liên hợp là chất đánh dấu có thể phát hiện.

31. Thể liên hợp theo điểm 30, trong đó phần được liên hợp là chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, hoặc enzym.

32. Thể liên hợp theo điểm 30, trong đó phần được liên hợp là chất tạo màu.

33. Thể liên hợp theo điểm 30, trong đó phần được liên hợp là chất phát quang.

34. Kit, bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26 hoặc thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 33.

35. Kit theo điểm 34, trong đó kit còn bao gồm kháng thể thứ hai, nhận biết đặc hiệu kháng thể.

36. Kit theo điểm 35, trong đó kit còn bao gồm chất đánh dấu có thể phát hiện.

37. Kit theo điểm 36, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện là chất đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang hoặc enzym.

38. Kit theo điểm 36, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện là chất tạo màu.

39. Kit theo điểm 36, trong đó chất đánh dấu có thể phát hiện là chất phát quang.

40. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26 hoặc thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 33.

41. Dược phẩm theo điểm 40, dược phẩm này còn bao gồm chất mang dược dụng.

42. Dược phẩm theo điểm 40, dược phẩm này còn bao gồm tá dược dược dụng.

43. Dược phẩm theo điểm 40, dược phẩm này còn bao gồm một hoặc nhiều chất hóa trị liệu chống khối u.

44. Dược phẩm theo điểm 43, trong đó chất hóa trị liệu chống khối u là chất ức chế tyrosin kinaza.

45. Dược phẩm theo điểm 43, trong đó chất hóa trị liệu chống khối u là anlotinib hoặc muối dược dụng của nó, hoặc lenvatinib hoặc muối dược dụng của nó.

46. Dược phẩm theo điểm 45, trong đó muối dược dụng của anlotinib là muối hydroclorua của anlotinib.

47. Dược phẩm theo điểm 45, trong đó muối dược dụng của lenvatinib là muối mesylat của lenvatinib.

48. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 47, trong đó liều đơn vị của dược phẩm là 100mg-1000mg tính theo khối lượng của kháng thể.

49. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 47, trong đó liều đơn vị của dược phẩm là 200mg-800mg tính theo khối lượng của kháng thể.

50. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 47, trong đó liều đơn vị của dược phẩm là 200mg-500mg tính theo khối lượng của kháng thể.

51. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 47, trong đó liều đơn vị của dược phẩm là 300mg-600mg tính theo khối lượng của kháng thể.

52. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 47, trong đó liều đơn vị của dược phẩm là 400mg-500mg tính theo khối lượng của kháng thể.

53. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 47, trong đó liều đơn vị của dược phẩm là 450mg tính theo khối lượng của kháng thể.

54. Tổ hợp dược chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, và ít nhất một chất hóa trị liệu chống khối u.

55. Tổ hợp dược theo điểm 54, bao gồm 1, 2 hoặc 3 chất hóa trị liệu chống khối u.

56. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó chất hóa trị liệu chống khối u là chất ức chế tyrosin kinaza.

57. Tổ hợp dược theo điểm 55, trong đó chất hóa trị liệu chống khối u là anlotinib hoặc muối dược dụng của nó, hoặc lenvatinib hoặc muối dược dụng của nó.

58. Tổ hợp dược theo điểm 57, trong đó muối dược dụng của anlotinib là muối hydroclorua của anlotinib.

59. Tổ hợp dược theo điểm 57, trong đó muối dược dụng của lenvatinib là muối mesylat của lenvatinib.

60. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của kháng thể là 100mg-1000mg.

61. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của kháng thể là 200mg-800mg.

62. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của kháng thể là 200mg-500mg.

63. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của kháng thể là 300mg-600mg.

64. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của kháng thể là 400mg-500mg.

65. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của kháng thể là 450mg.

66. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của chất hóa trị liệu chống khối u là 0,1mg-100mg.

67. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của chất hóa trị liệu chống khối u là 0,5mg-50mg.

68. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của chất hóa trị liệu chống khối

u là 1mg-20mg.

69. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của chất hóa trị liệu chống khối u là 2mg-15mg.

70. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của chất hóa trị liệu chống khối u là 4mg-12mg.

71. Tổ hợp dược theo điểm 54, trong đó liều đơn vị của chất hóa trị liệu chống khối u là 8mg-12mg.

72. Tổ hợp dược theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 54 đến 71, trong đó tổ hợp dược này là tổ hợp cố định; hoặc tổ hợp dược này là tổ hợp không cố định.

73. Tổ hợp dược theo điểm 72, trong đó tổ hợp dược này ở dạng dược phẩm rắn hoặc dược phẩm lỏng.

74. Tổ hợp dược theo điểm 72, trong đó kháng thể kháng PD-1 và chất hóa trị liệu chống khối u trong tổ hợp không cố định, mỗi loại ở dạng dược phẩm.

75. Sản phẩm kit, bao gồm dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 53 hoặc tổ hợp dược theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 54 đến 74, và tờ hướng dẫn sử dụng sản phẩm.

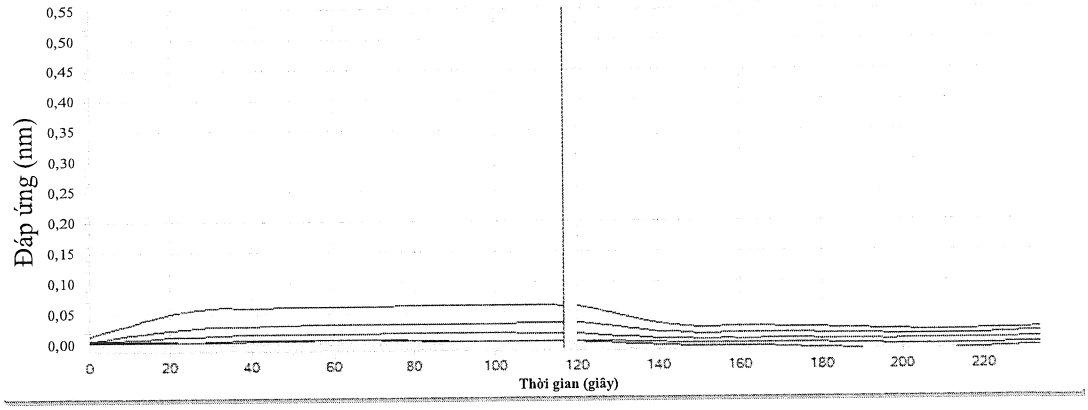

Đáp ứng (nm)
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Thời gian (giây)

FIG. 1

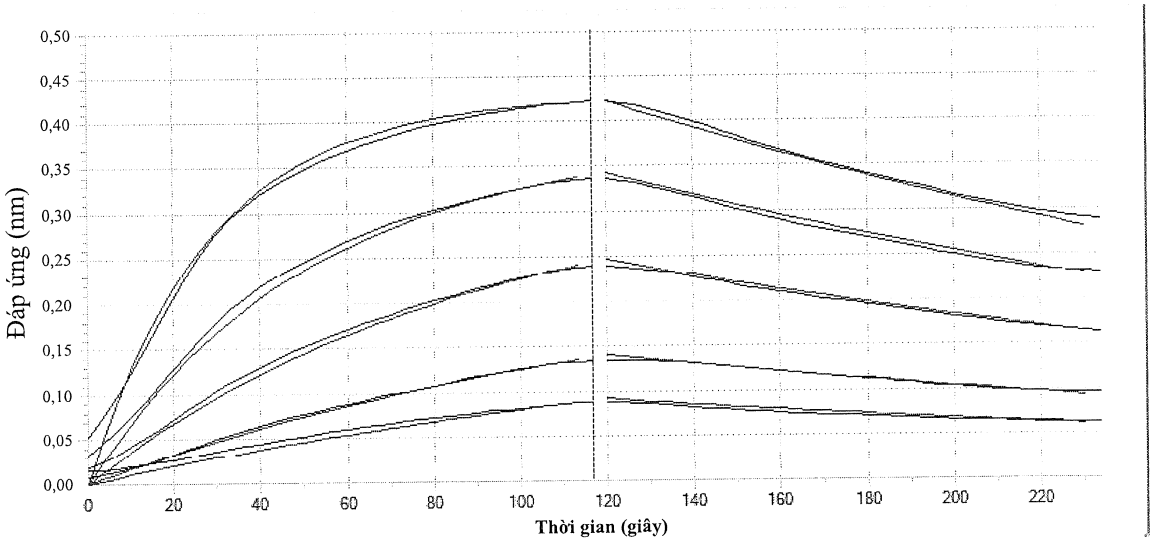

Đáp ứng (nm)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Thời gian (giây)

FIG. 2

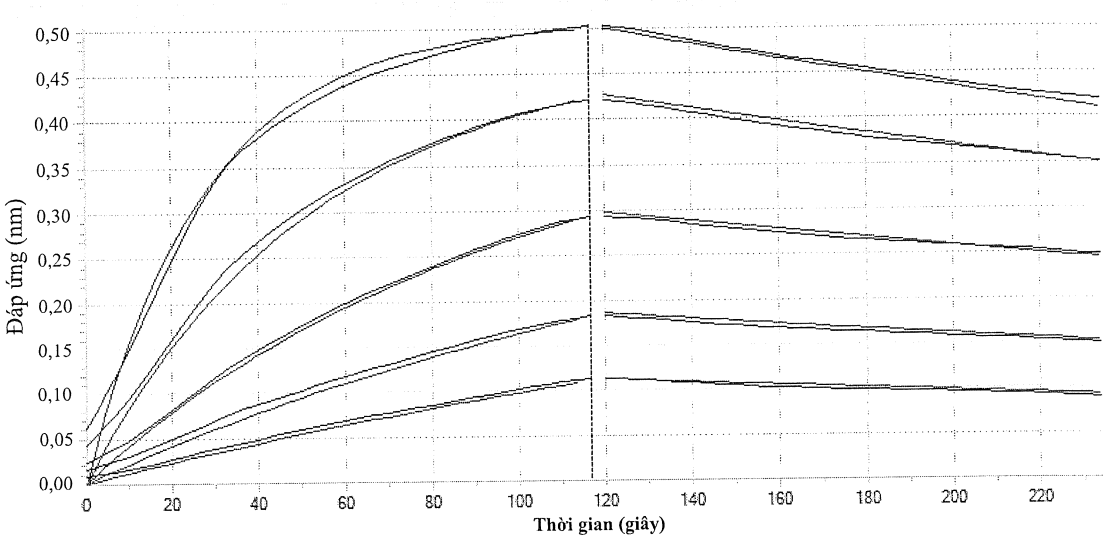

Đáp ứng (nm)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
Thời gian (giây)

FIG. 3

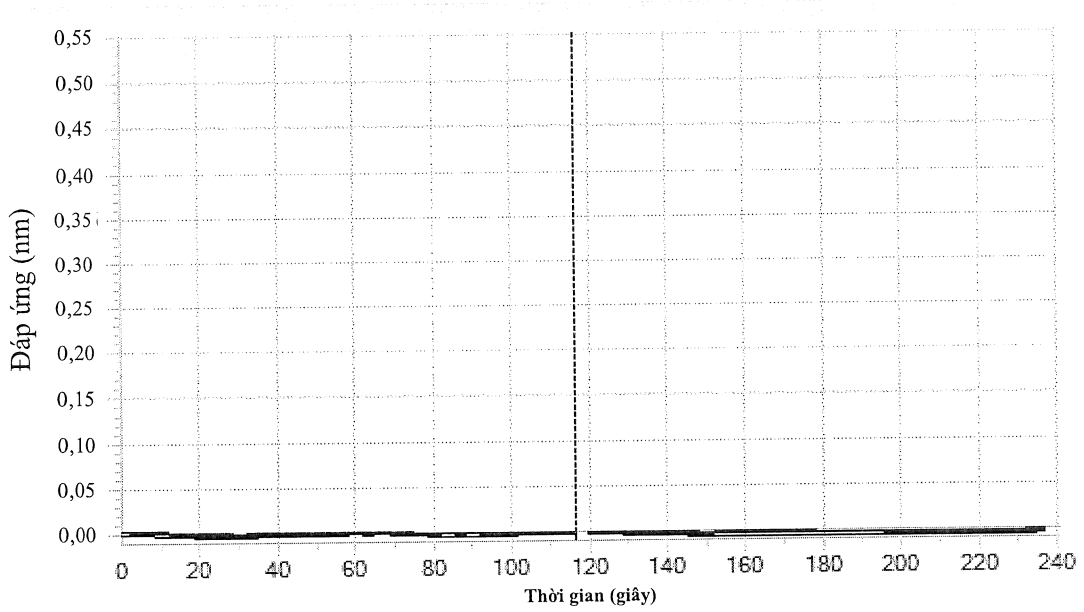

Đáp ứng (nm)
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Thời gian (giây)

FIG. 4

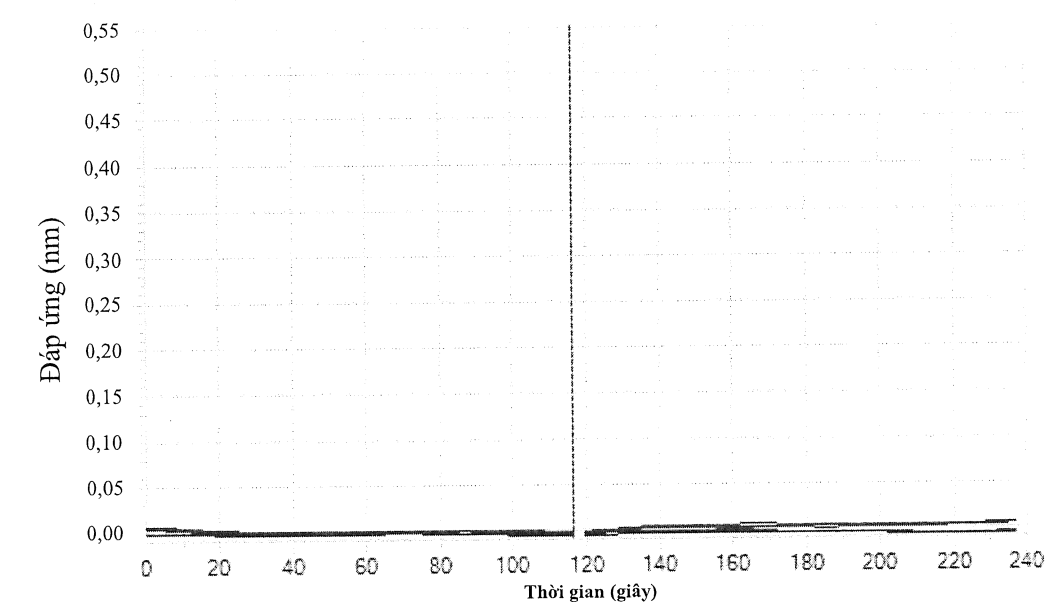

0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Đáp ứng (nm)
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240
Thời gian (giây)

FIG. 5

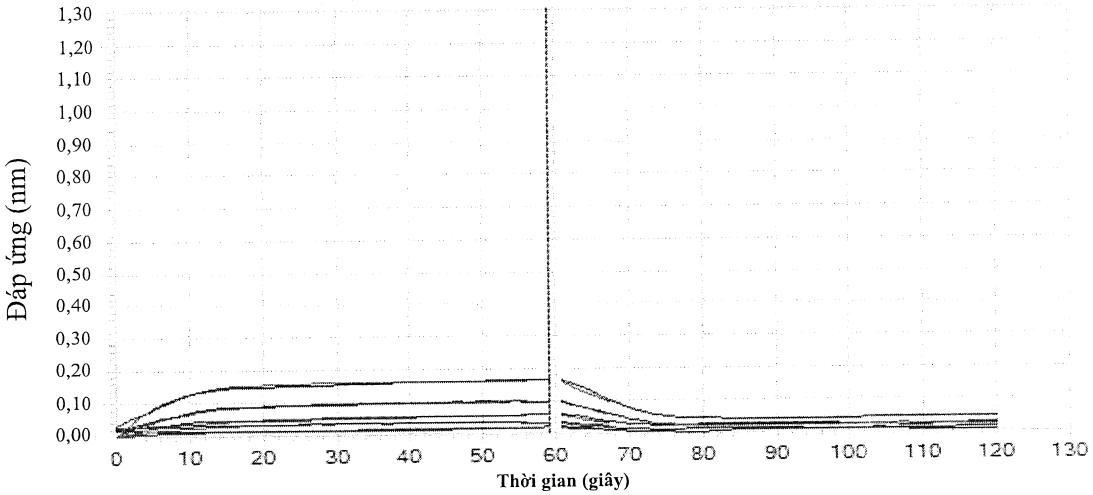

1,30
1,20
1,10
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 6

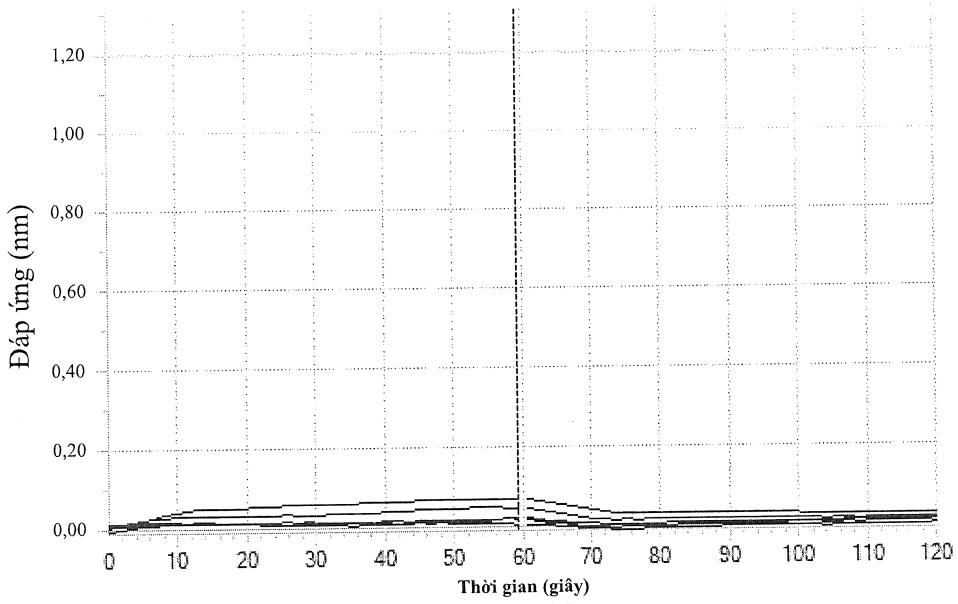

Đáp ứng (nm)
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Thời gian (giây)

FIG. 7

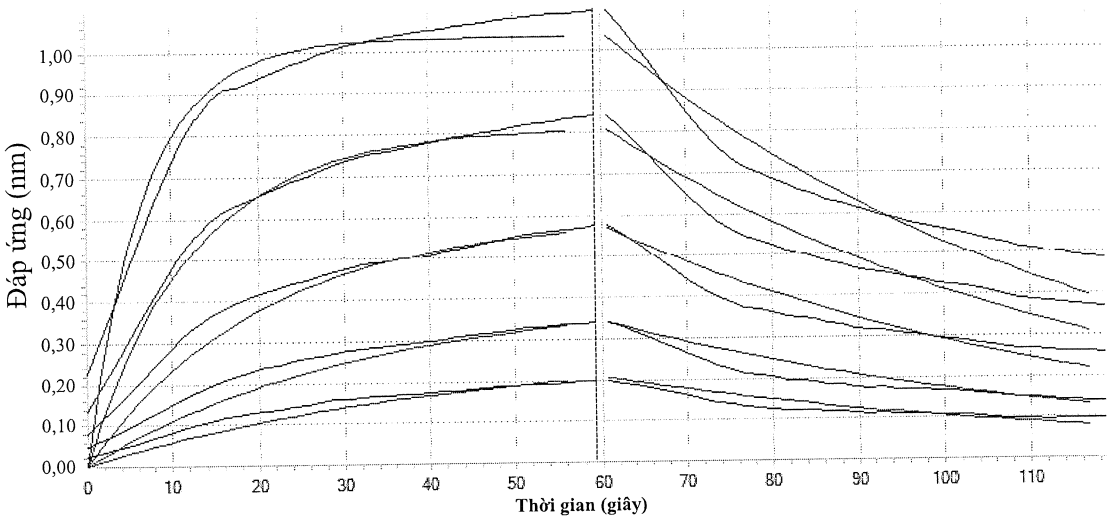

Đáp ứng (nm)
1,00
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Thời gian (giây)

FIG. 8

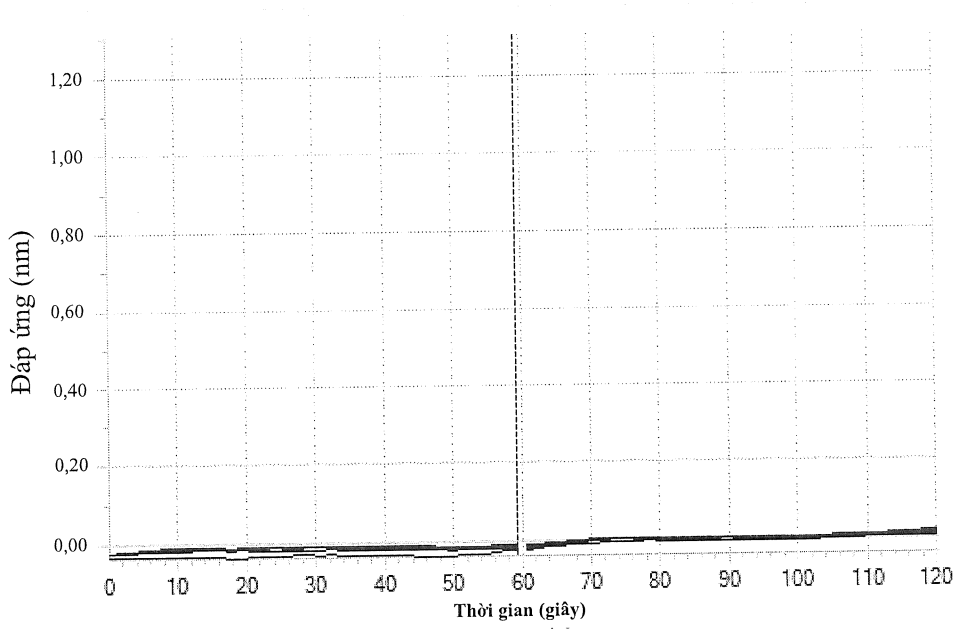

Đáp ứng (nm)
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Thời gian (giây)

FIG. 9

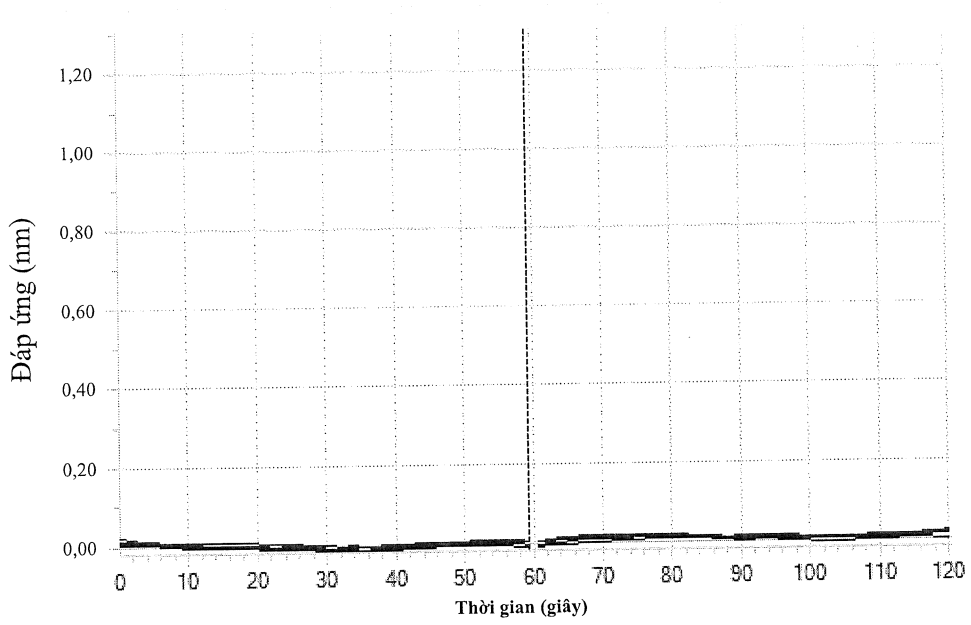

Đáp ứng (nm)
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Thời gian (giây)

FIG. 10

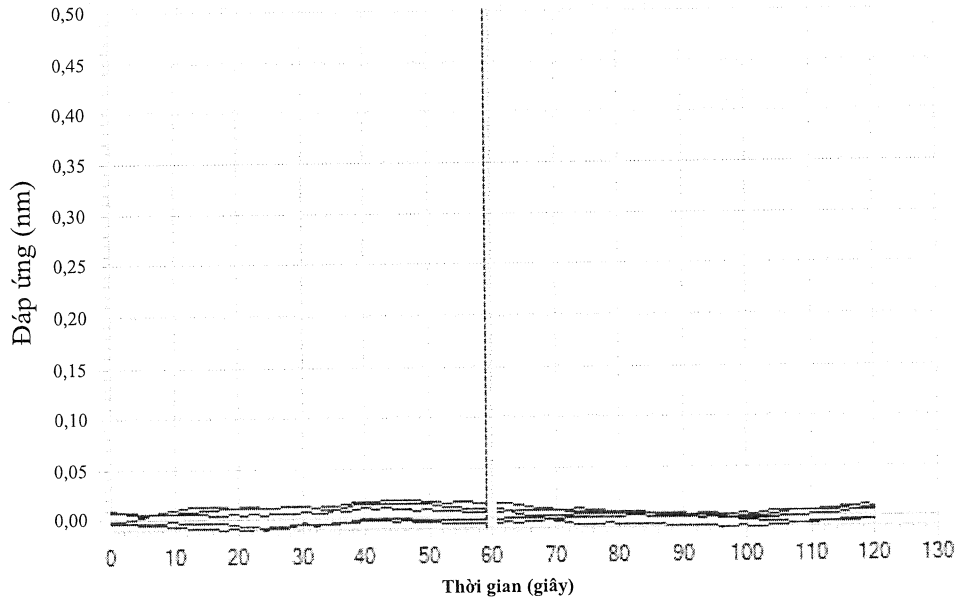

0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 11

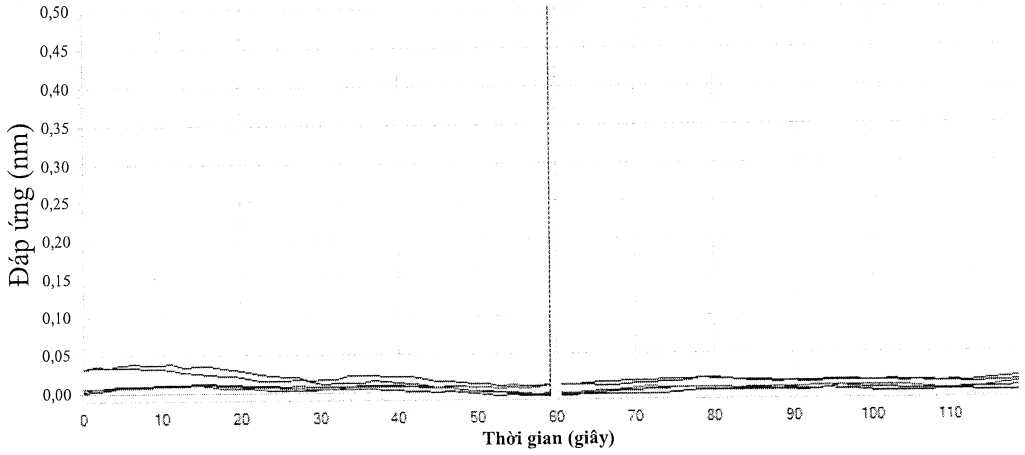

0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Thời gian (giây)

FIG. 12

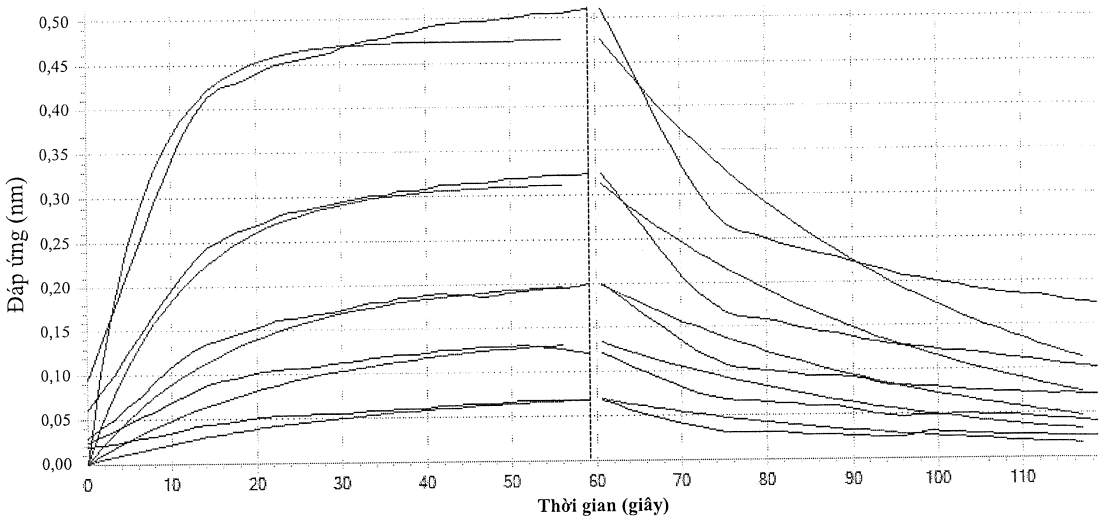

Đáp ứng (nm)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Thời gian (giây)

FIG. 13

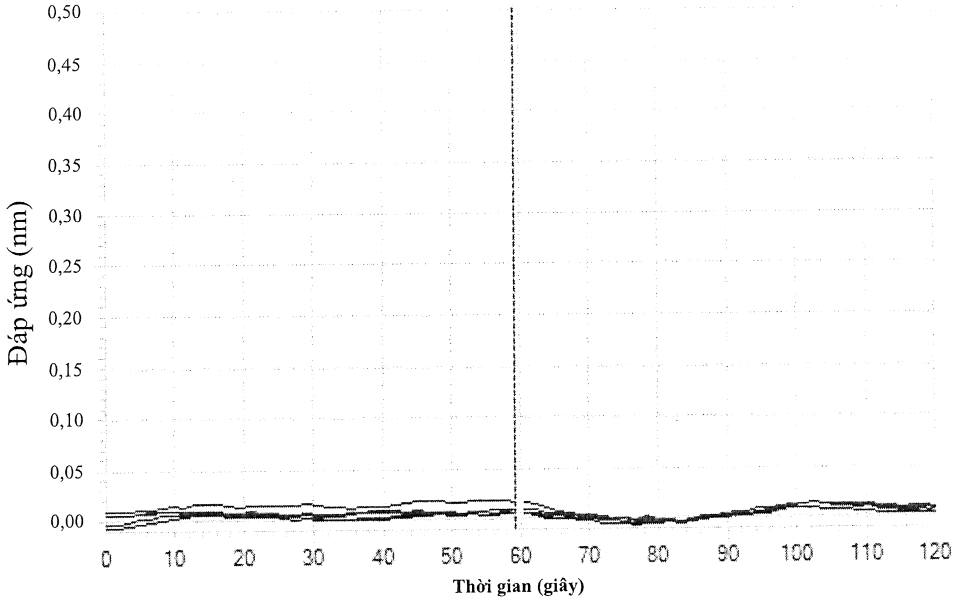

Đáp ứng (nm)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
Thời gian (giây)

FIG. 14

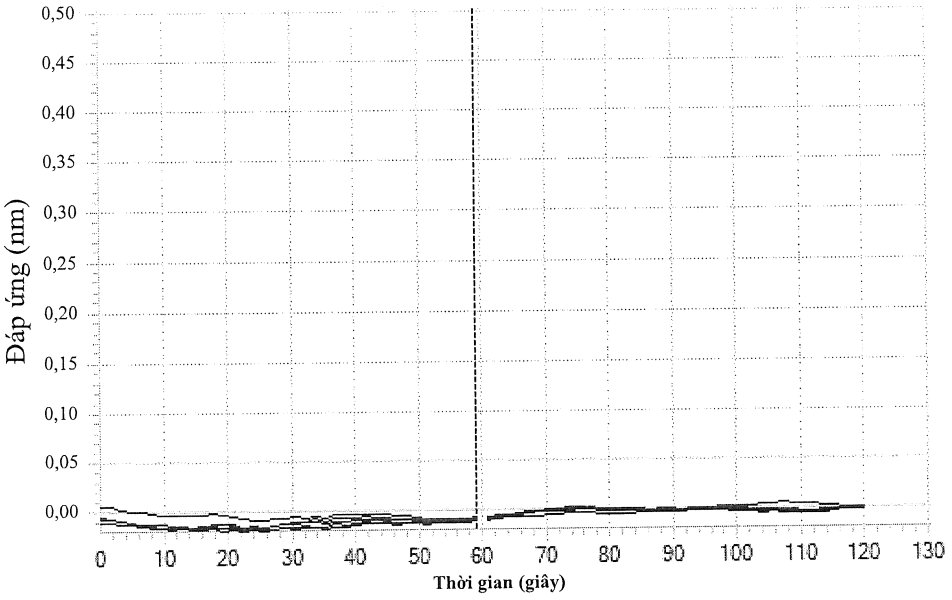

Đáp ứng (nm)
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 15

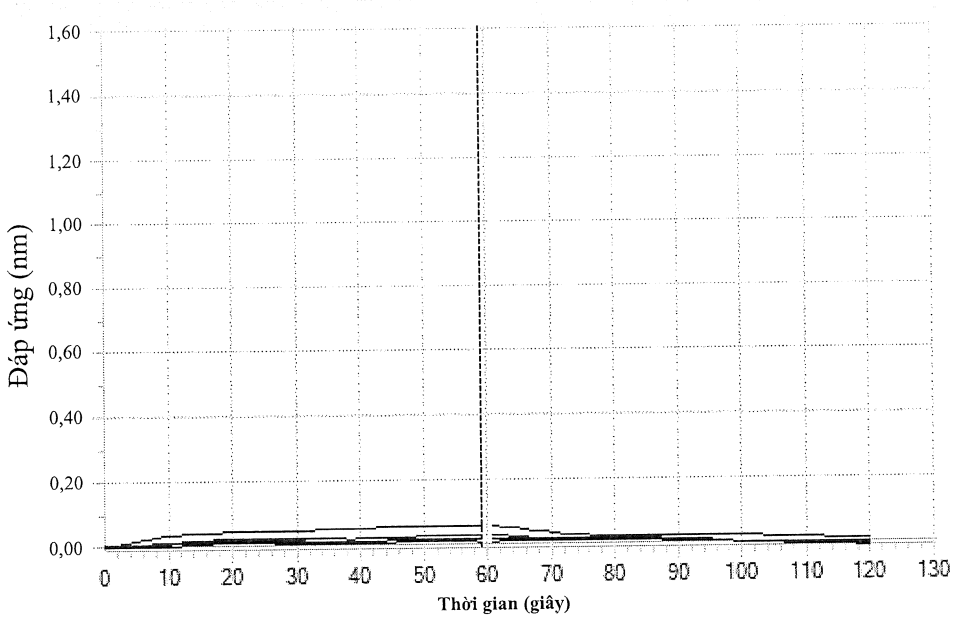

Đáp ứng (nm)
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 16

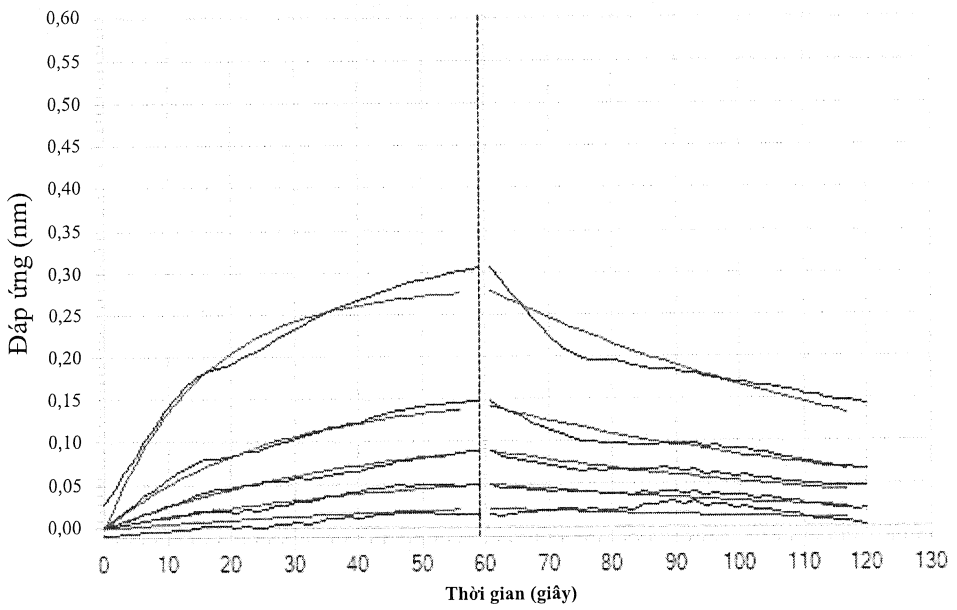

Đáp ứng (nm)
0,60
0,55
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 17

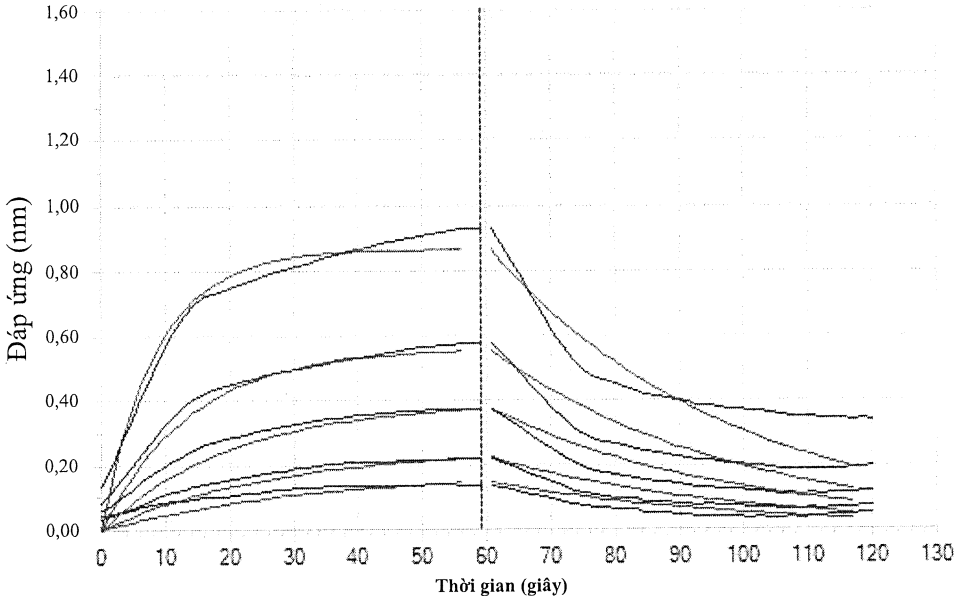

Đáp ứng (nm)
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 18

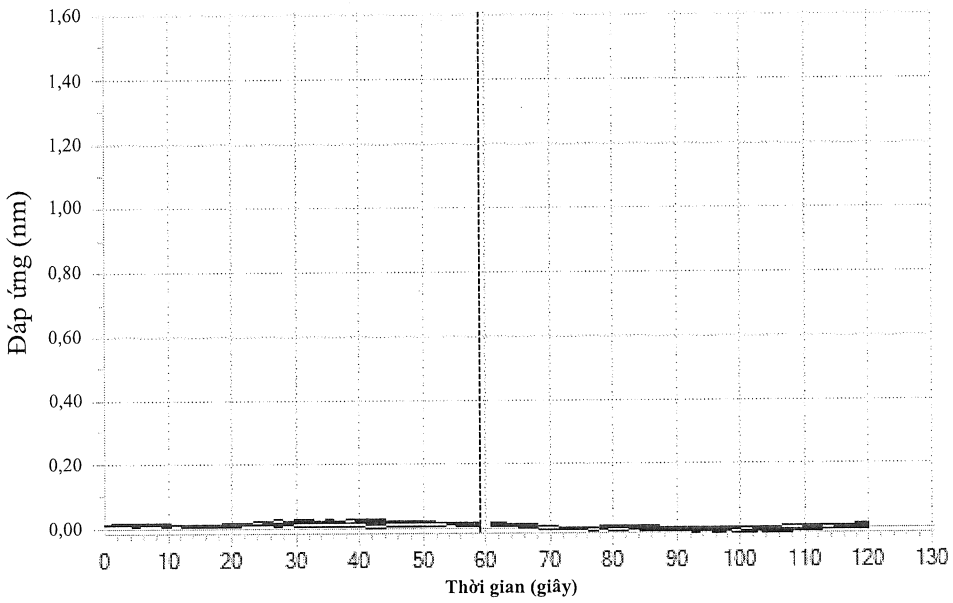

Đáp ứng (nm)
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Thời gian (giây)

FIG. 19

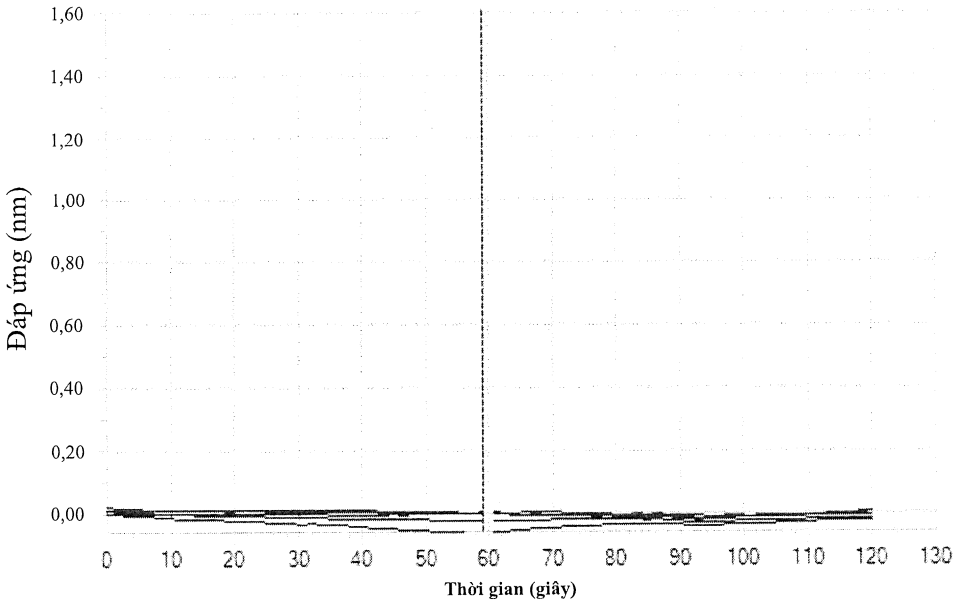

Đáp ứng (nm)
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Thời gian (giây)

FIG. 20

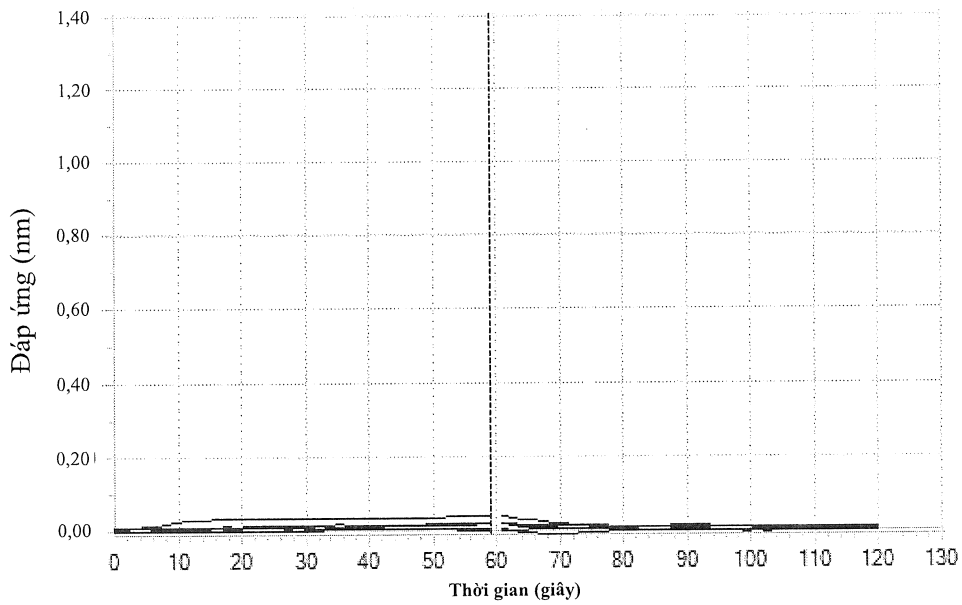

Đáp ứng (nm)
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 21

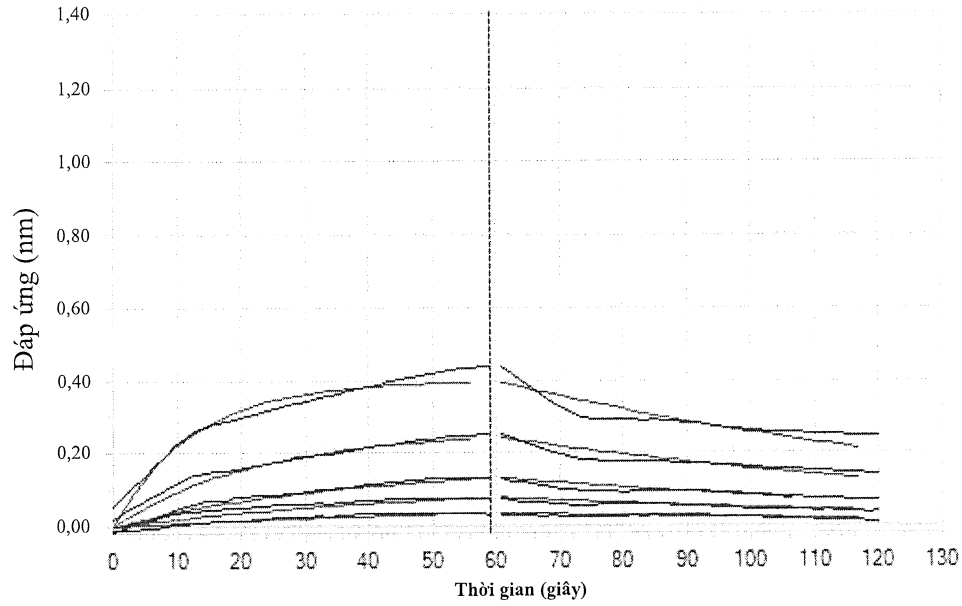

Đáp ứng (nm)
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 22

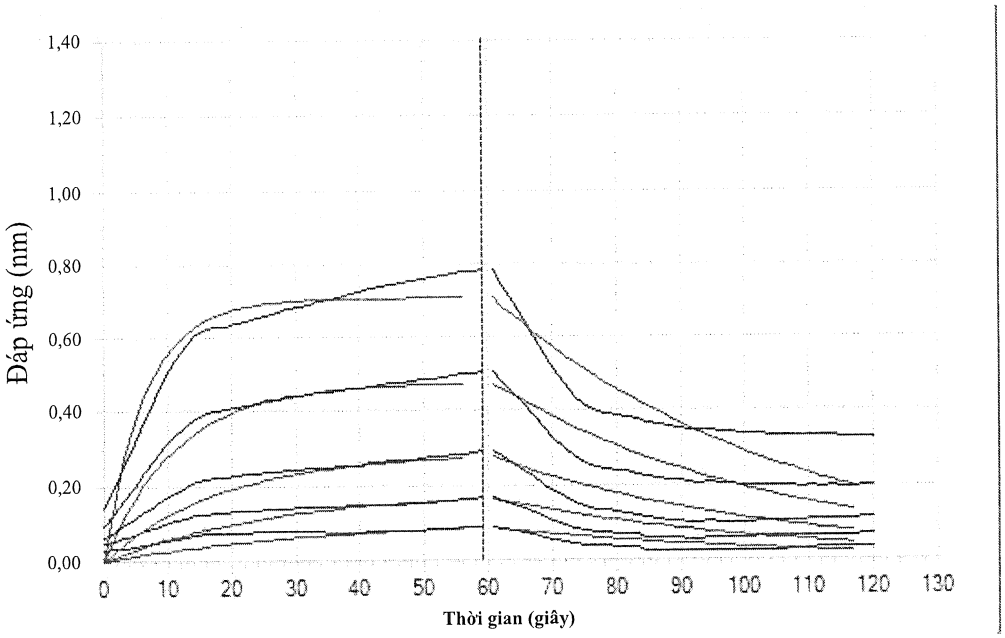

1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 23

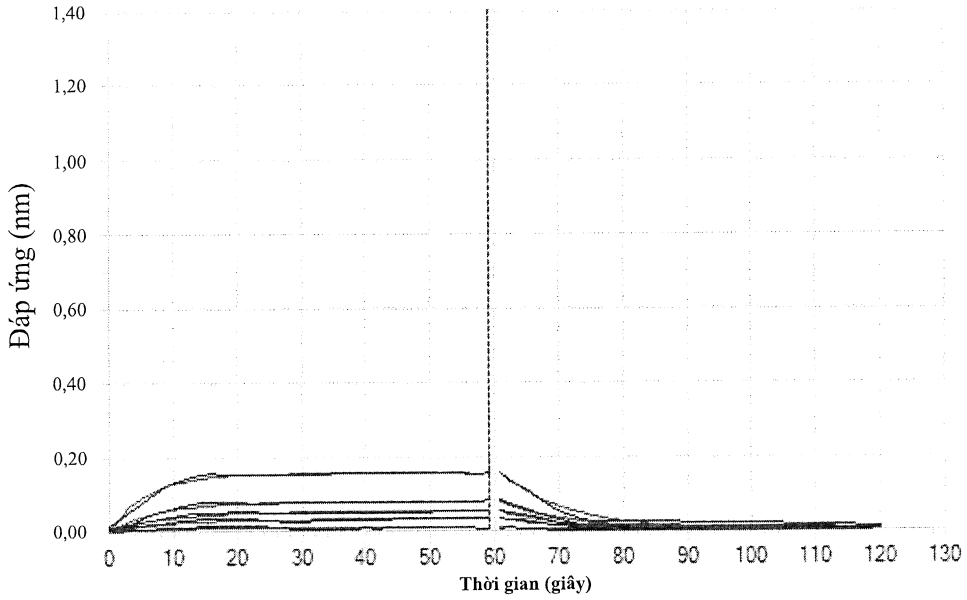

1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 24

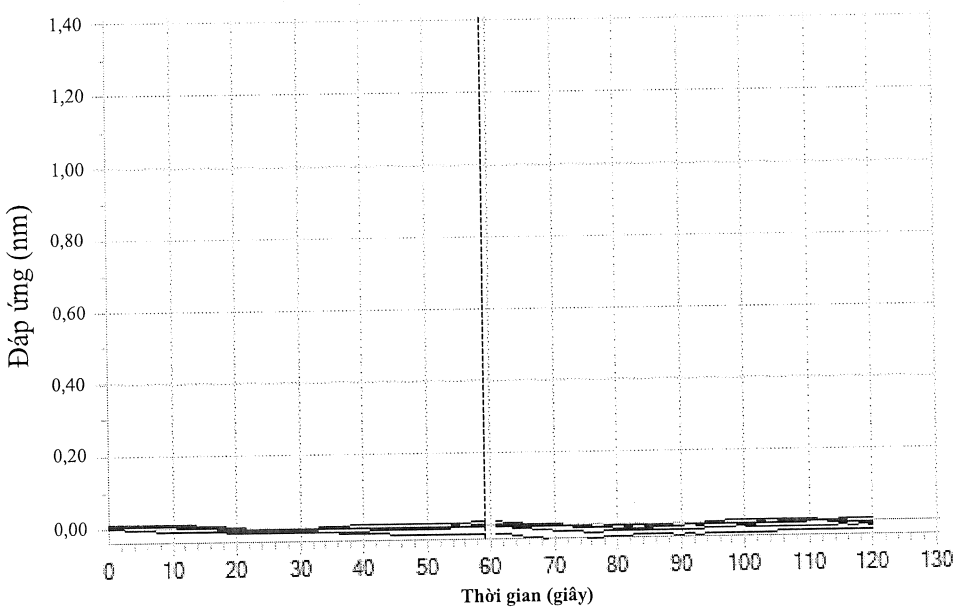

1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Đáp ứng (nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Thời gian (giây)

FIG. 25

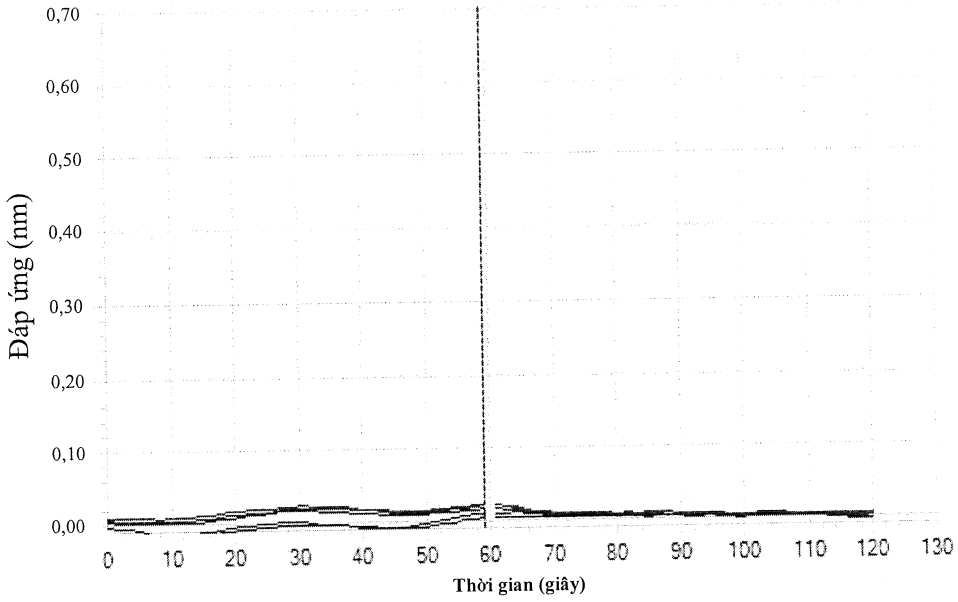

0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đáp ứng (nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Thời gian (giây)

FIG. 26

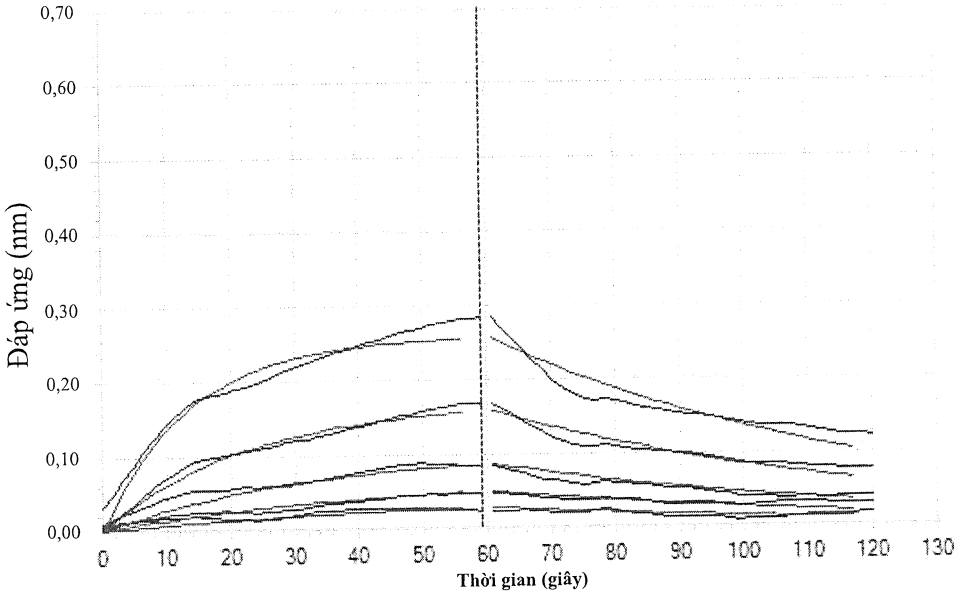

0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 27

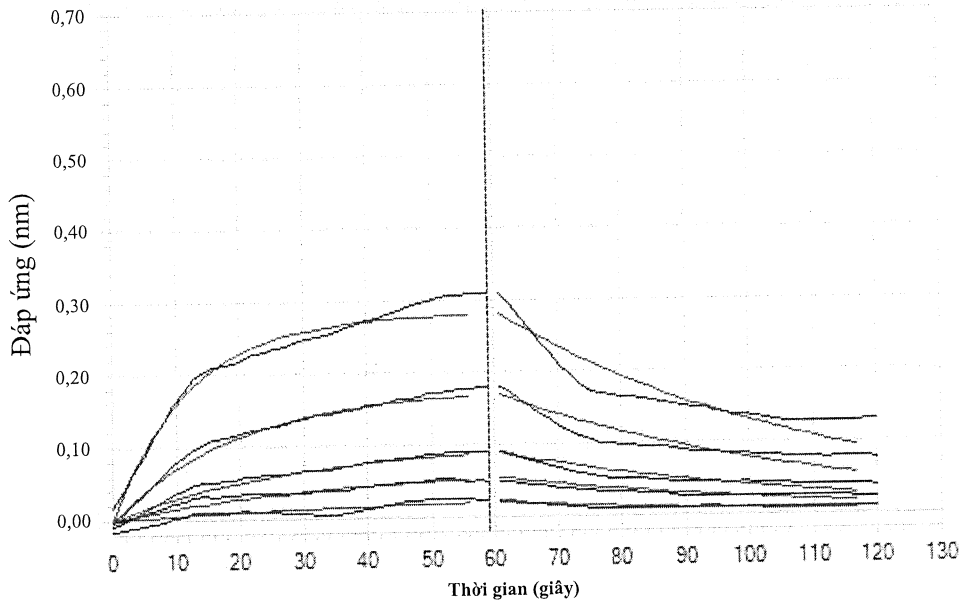

0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 28

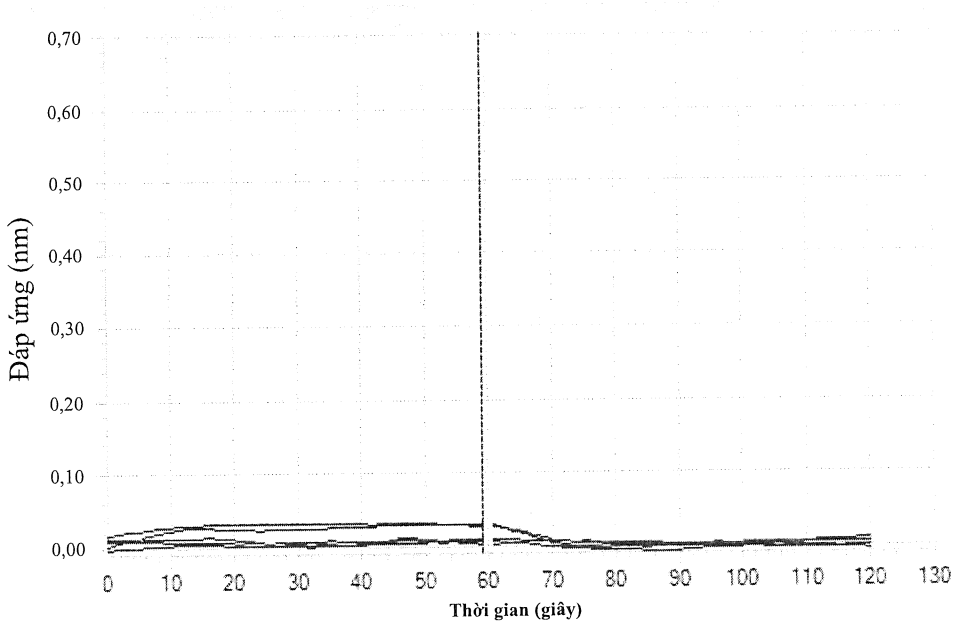

0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 29

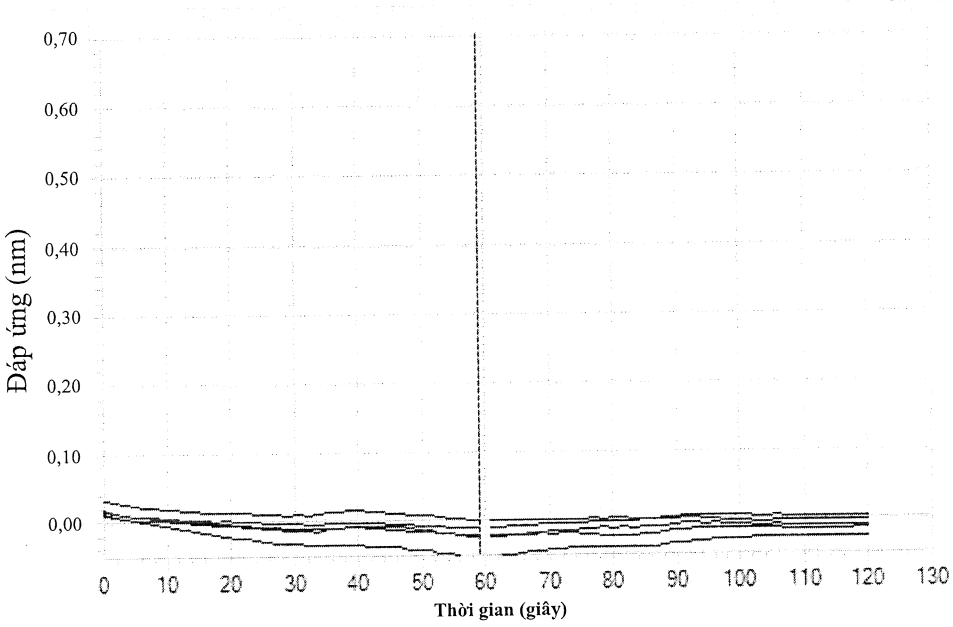

0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Đáp ứng (nm)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
Thời gian (giây)

FIG. 30

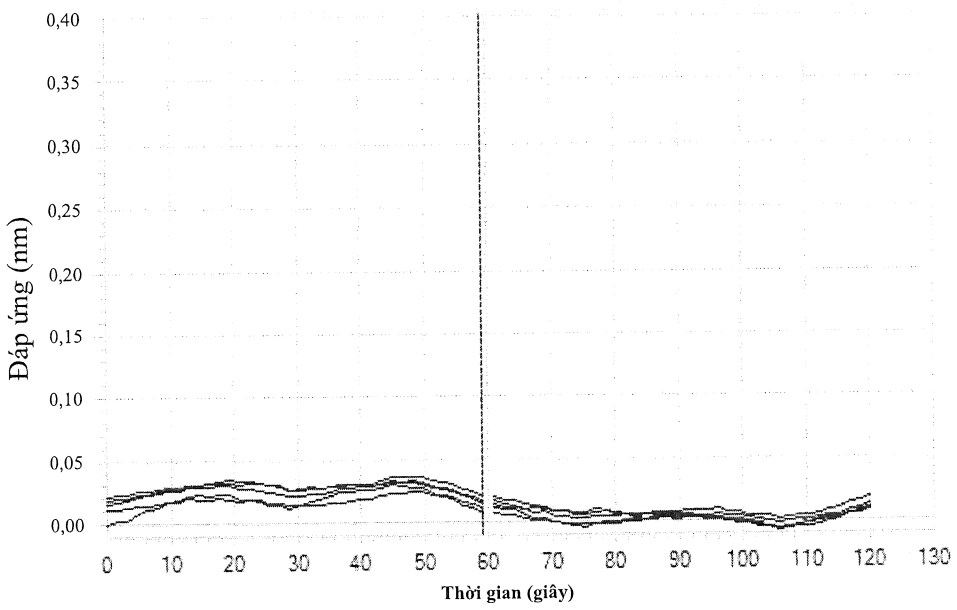

0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Đáp ứng (nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Thời gian (giây)

FIG. 31

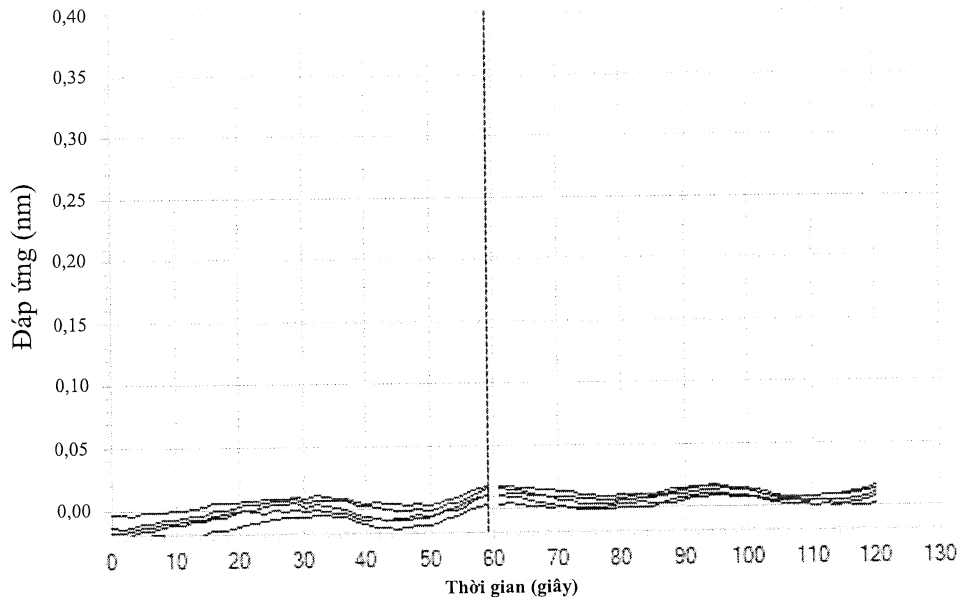
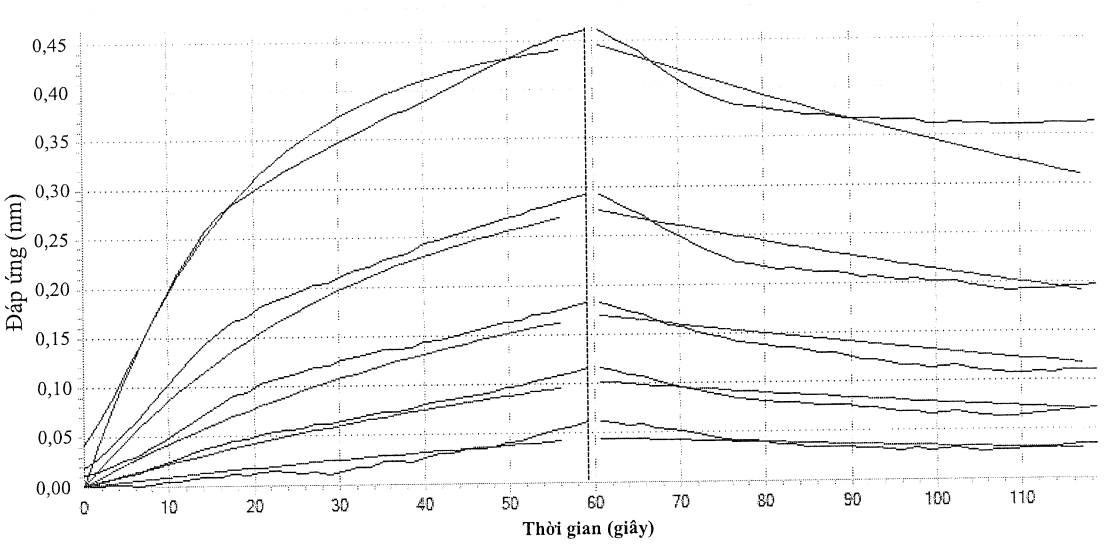

0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Đáp ứng (nm)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Thời gian (giây)

FIG. 32



1

FIG. 33

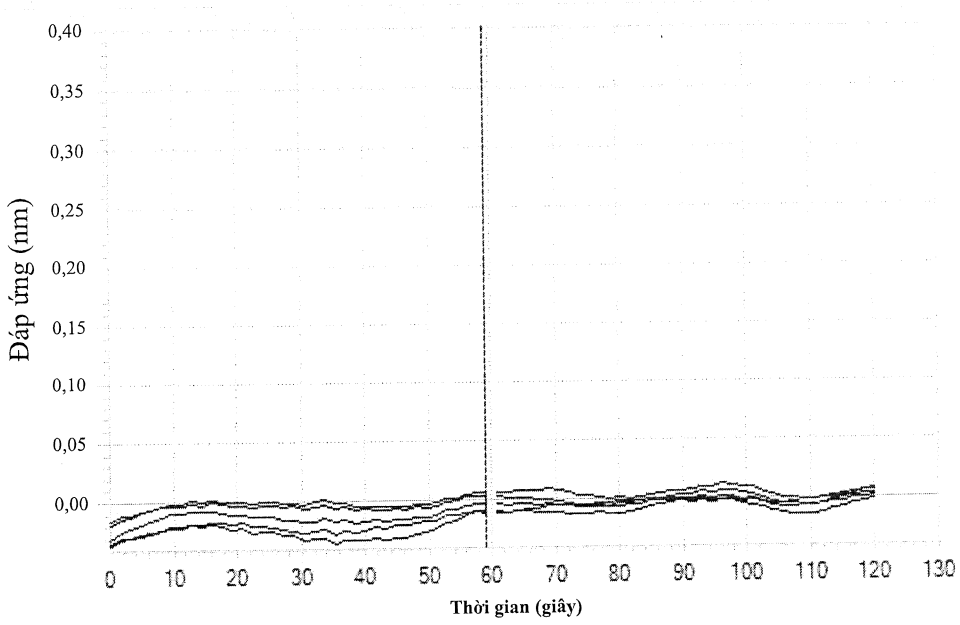


FIG. 34

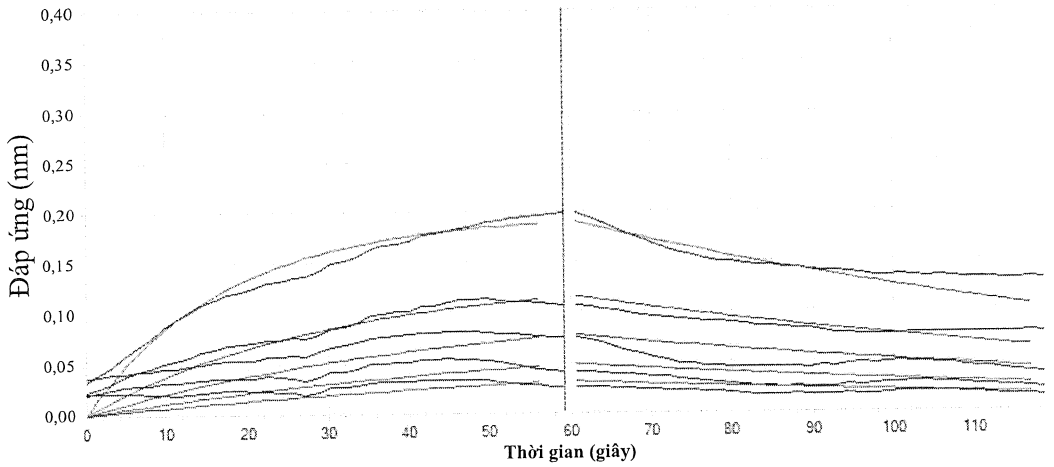

Đáp ứng (nm)
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Thời gian (giây)

FIG. 35

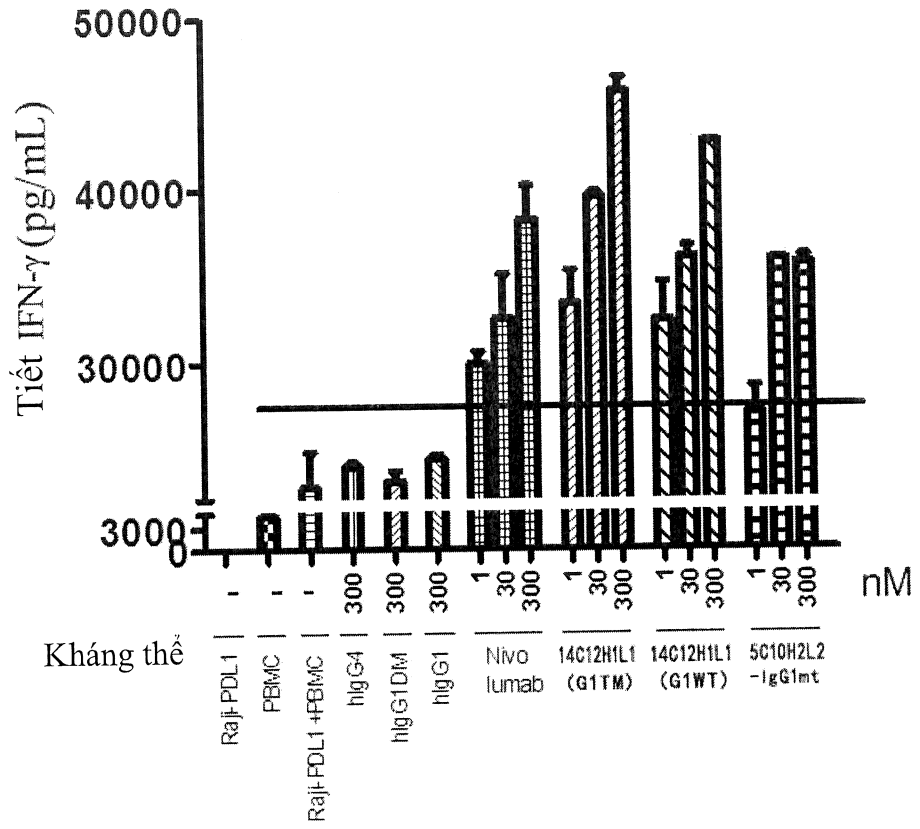

Tiết IFN-γ(pg/mL)
50000
40000
30000
3000
nM
Kháng thể
Raji-PDL1
PBMC
Raji-PDL1 +PBMC
hIgG4
hIgG1DM
hIgG1
Nivo lumab
14C12H1L1 (G1TM)
14C12H1L1 (G1WT)
5C10H2L2 -IgG1mt

FIG. 36

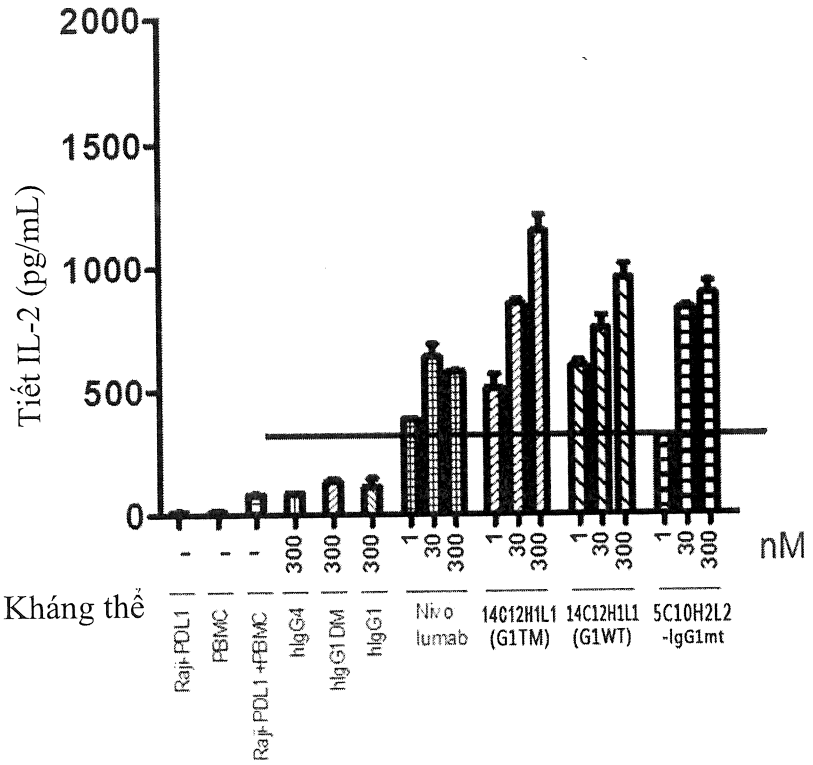

Tiết IL-2 (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
nM
Kháng thể
Raji-PDL1
PBMC
Raji-PDL1 +PBMC
hIgG4
hIgG1 DM
hIgG1
Nivo lumab
14C12H1L1 (G1TM)
14C12H1L1 (G1WT)
5C10H2L2 -IgG1mt

FIG. 37

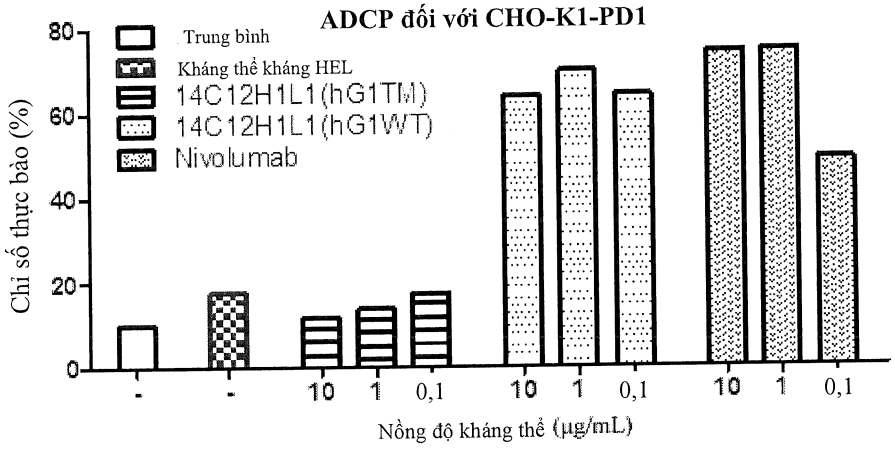

ADCP đối với CHO-K1-PD1
Trung bình
Kháng thể kháng HEL
14C12H1L1(hG1TM)
14C12H1L1(hG1WT)
Nivolumab
Chỉ số thực bào (%)
80
60
40
20
0
Nồng độ kháng thể (µg/mL)

FIG. 38

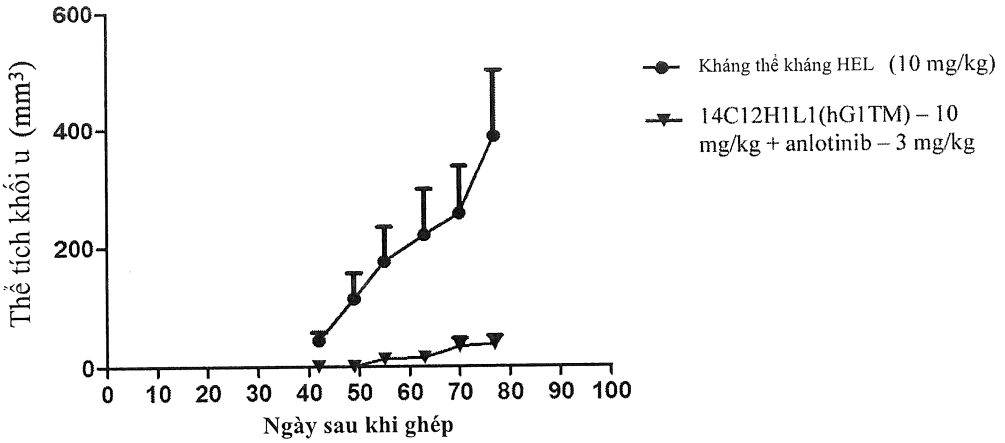

600
400
200
0
Thể tích khối u (mm3)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Ngày sau khi ghép
Kháng thể kháng HEL (10 mg/kg)
14C12H1L1(hG1TM) – 10 mg/kg + anlotinib – 3 mg/kg

FIG. 39

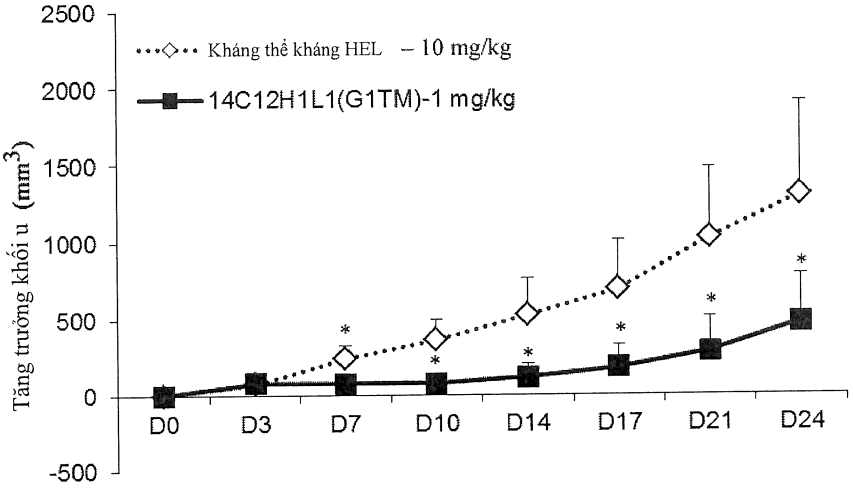

2500
2000
1500
1000
500
0
-500
Tăng trưởng khối u (mm3)
Kháng thể kháng HEL – 10 mg/kg
14C12H1L1(G1TM)-1 mg/kg
D0 D3 D7 D10 D14 D17 D21 D24

FIG. 40

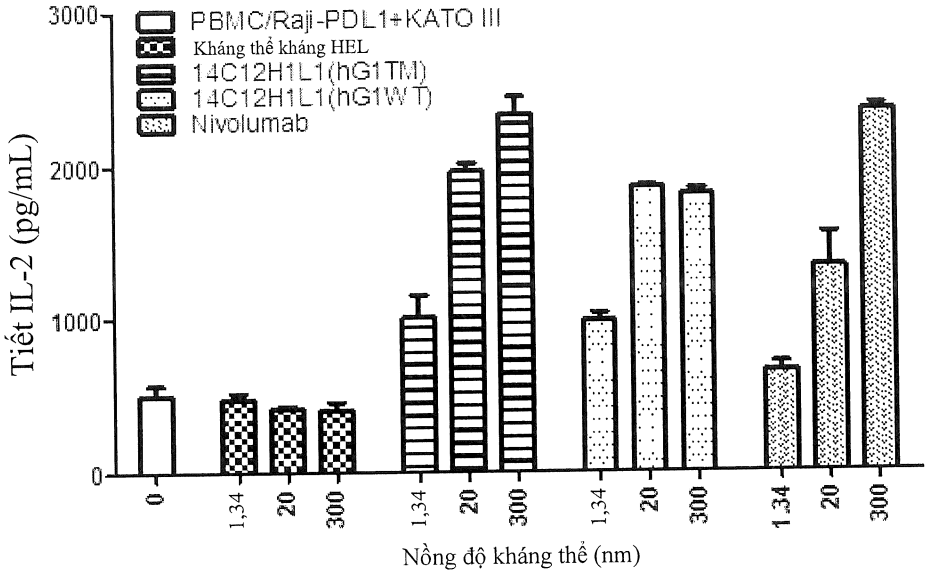

PBMC/Raji-PDL1+KATO III
Kháng thể kháng HEL
14C12H1L1(hG1TM)
14C12H1L1(hG1WT)
Nivolumab
Tiết IL-2 (pg/mL)
3000
2000
1000
0
0
1,34
20
300
1,34
20
300
1,34
20
300
1,34
20
300
Nồng độ kháng thể (nm)

FIG. 41

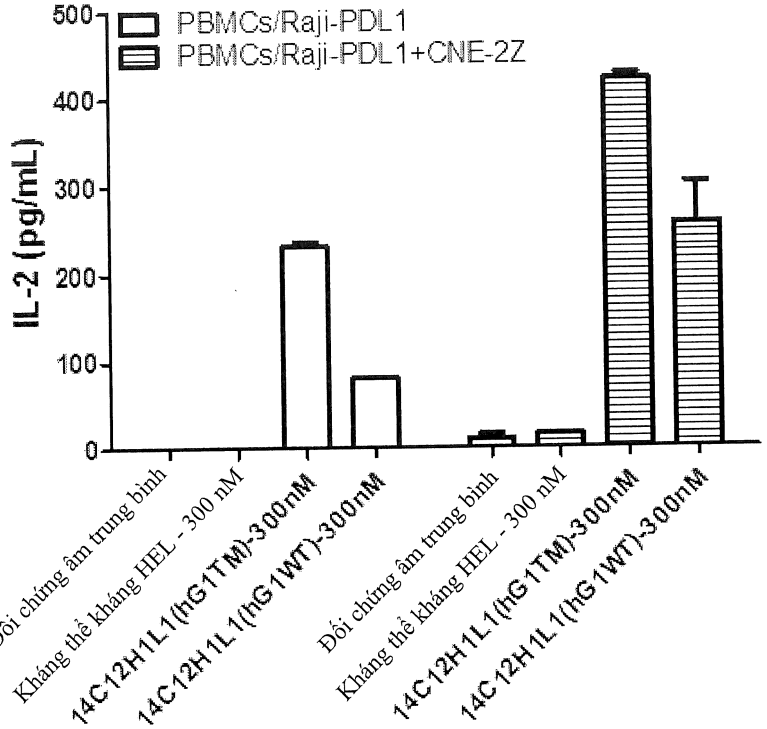

PBMCs/Raji-PDL1
PBMCs/Raji-PDL1+CNE-2Z
IL-2 (pg/mL)
500
400
300
200
100
0
Đối chứng âm trung bình
Kháng thể kháng HEL - 300 nM
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM
Đối chứng âm trung bình
Kháng thể kháng HEL - 300 nM
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM

FIG. 42

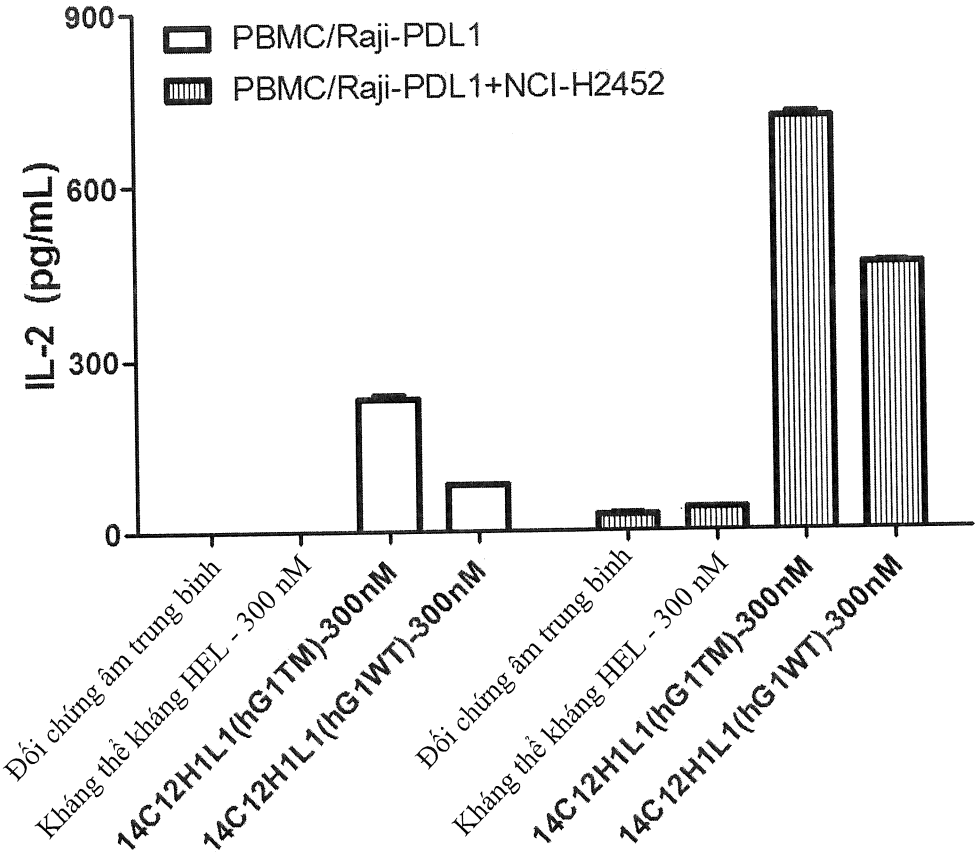

900
600
300
0
IL-2 (pg/mL)
PBMC/Raji-PDL1
PBMC/Raji-PDL1+NCI-H2452
Đối chứng âm trung bình
Kháng thể kháng HEL - 300 nM
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM
Đối chứng âm trung bình
Kháng thể kháng HEL - 300 nM
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM

FIG. 43

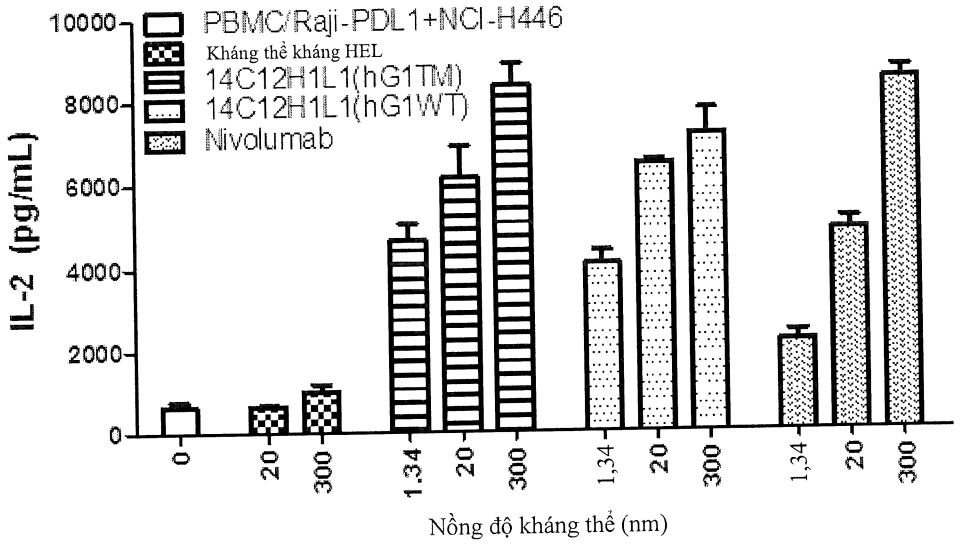

10000
8000
6000
4000
2000
0
IL-2 (pg/mL)
PBMC/Raji-PDL1+NCI-H446
Kháng thể kháng HEL
14C12H1L1(hG1TM)
14C12H1L1(hG1WT)
Nivolumab
0
20
300
1.34
20
300
1,34
20
300
1,34
20
300
Nồng độ kháng thể (nm)

FIG. 44

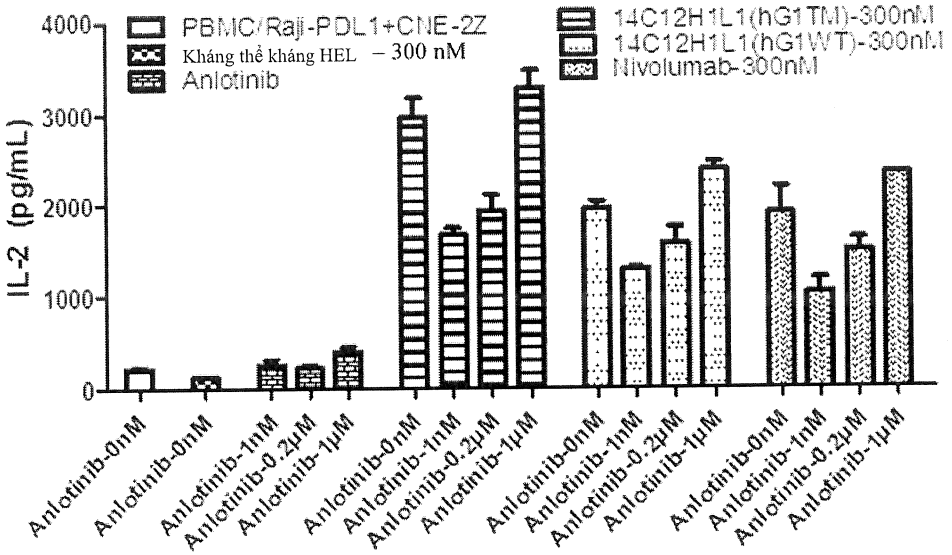

PBMC/Raji-PDL1+CNE-2Z
Kháng thể kháng HEL – 300 nM
Anlotinib
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM
Nivolumab-300nM
IL-2 (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
Anlotinib-0nM
Anlotinib-0nM
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0nM
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0nM
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0nM
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM

FIG. 45

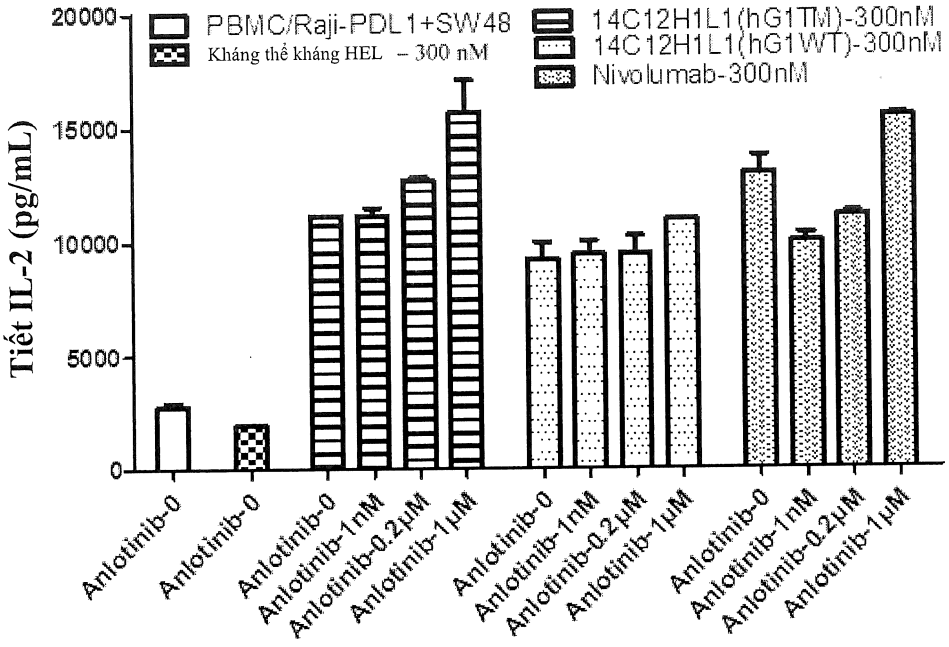

PBMC/Raji-PDL1+SW48
Kháng thể kháng HEL – 300 nM
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM
Nivolumab-300nM
Tiết IL-2 (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
Anlotinib-0
Anlotinib-0
Anlotinib-0
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0
Anlotinib-1nM
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM

FIG. 46

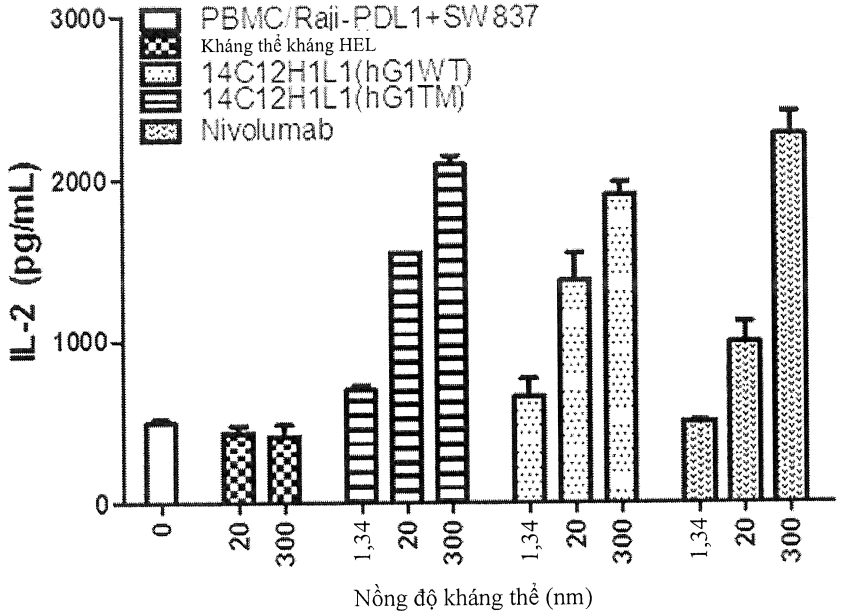

PBMC/Raji-PDL1+SW837
Kháng thể kháng HEL
14C12H1L1(hG1WT)
14C12H1L1(hG1TM)
Nivolumab
IL-2 (pg/mL)
3000
2000
1000
0
0
20
300
1,34
20
300
1,34
20
300
1,34
20
300
Nồng độ kháng thể (nm)

FIG. 47

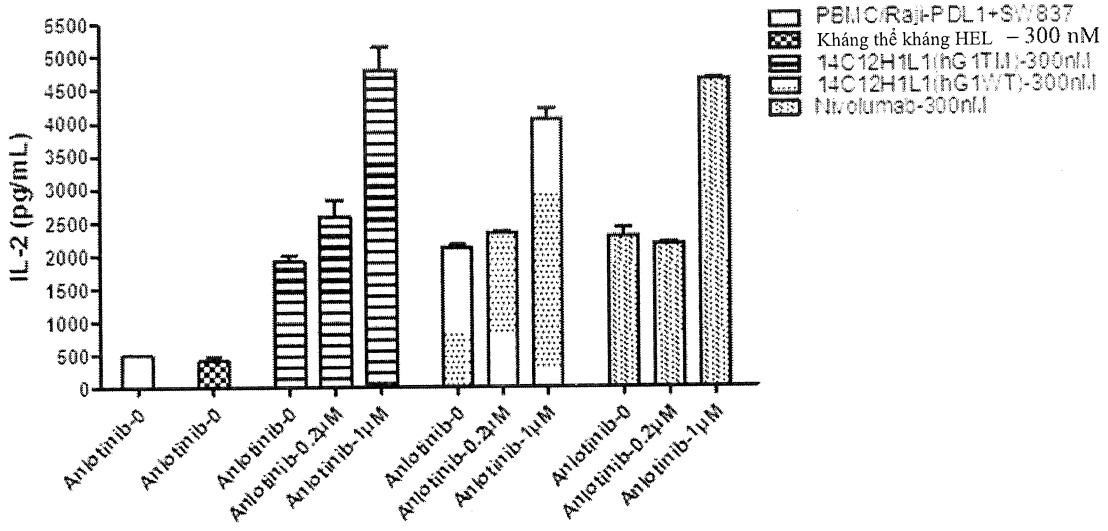

PBMC/Raji-PDL1+SW837
Kháng thể kháng HEL – 300 nM
14C12H1L1(hG1TM)-300nM
14C12H1L1(hG1WT)-300nM
Nivolumab-300nM
IL-2 (pg/mL)
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Anlotinib-0
Anlotinib-0
Anlotinib-0
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM
Anlotinib-0
Anlotinib-0.2μM
Anlotinib-1μM

FIG. 48

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CTTQ-Akeso (Shanghai) Biomed. Tech. Co., Ltd

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1, THỂ LIÊN HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130>

<150> CN201910711138.5
<151> 2019-08-02

<150> CN201911133858.4
<151> 2019-11-19

<150> CN201911105715.2
<151> 2019-11-13

<150> CN201911105711.4
<151> 2019-11-13

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 354
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của vùng thay đổi chuỗi nặng 14C12

<400> 1
gaggtcaaac tggtggagag cggcggcggg ctggtgaagc ccggcgggtc actgaaactg 60

agctgcgccg cttccggctt cgcctttagc tcctacgaca tgtcatgggt gaggcagacc 120

cctgagaagc gcctggaatg ggtcgctact atcagcggag gcgggcgata cacctactat 180

cctgactctg tcaaagggag attcacaatt agtcgggata acgccagaaa tactctgtat 240

ctgcagatgt ctagtctgcg gtccgaggat acagctctgt actattgtgc aaaccggtac 300

ggcgaagcat ggtttgccta ttggggacag ggcaccctgg tgacagtctc tgcc 354

<210> 2
<211> 118
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nặng 14C12

<400> 2

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 3
<211> 321
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của vùng thay đổi chuỗi nhẹ 14C12

<400> 3
gacattaaga tgacacagtc cccttcctca atgtacgcta gcctgggcga gcgagtgacc 60

ttcacatgca aagcatccca ggacatcaac acatacctgt cttggtttca gcagaagcca 120

ggcaaaagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaatagac tggtggacgg ggtccccagc 180

agattctccg gatctggcag tgggcaggat tactccctga ccatcagctc cctggagtat 240

gaagacatgg gcatctacta ttgcctgcag tatgatgagt tccctctgac ctttggagca 300

ggcacaaaac tggaactgaa g 321

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nhẹ 14C12

<400> 4

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 5
<211> 354
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của vùng thay đổi chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1WT)

<400> 5
gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60

agctgcgcag cttccggatt cgcctttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccaggaaagg gactggattg ggtcgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaagcat ggtttgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagt 354

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1WT)

<400> 6

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 321
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của vùng thay đổi chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1WT)

<400> 7
gacattcaga tgactcagag cccctcctcc atgtccgcct ctgtgggcga cagggtcacc 60

ttcacatgcc gcgctagtca ggatatcaac acctacctga gctggtttca gcagaagcca 120

gggaaaagcc ccaagacact gatctaccgg gctaatagac tggtgtctgg agtcccaagt 180

cggttcagtg gctcagggag cggacaggac tacactctga ccatcagctc cctgcagcct 240

gaggacatgg caacctacta ttgcctgcag tatgatgagt tcccactgac ctttggcgcc 300

gggacaaaac tggagctgaa g 321

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nhẹ 14C12H1L1(hG1WT)

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 9
<211> 1344
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của chuỗi nặng 14C12H1L1 (hG1WT)

<400> 9
gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60

agctgcgcag cttccggatt cgcctttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccaggaaagg gactggattg ggtcgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaagcat ggtttgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagtgccagc 360

accaaaggac ctagcgtgtt tcctctcgcc ccctcctcca aaagcaccag cggaggaacc 420

gctgctctcg gatgtctggt gaaggactac ttccctgaac ccgtcaccgt gagctggaat 480

agcggcgctc tgacaagcgg agtccataca ttccctgctg tgctgcaaag cagcggactc 540

tattccctgt ccagcgtcgt cacagtgccc agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgtaacgtca accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaagtgga gcccaaatcc 660

tgcgacaaga cacacacctg tccccctgt cctgctcccg aactcctcgg aggccctagc 720

gtcttcctct ttcctcccaa acccaaggac accctcatga tcagcagaac ccctgaagtc 780

acctgtgtcg tcgtggatgt cagccatgag gaccccgagg tgaaattcaa ctggtatgtc 840

gatggcgtcg aggtgcacaa cgccaaaacc aagcccaggg aggaacagta caactccacc 900

tacagggtgg tgtccgtgct gacagtcctc caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tgtccaacaa ggctctccct gcccccattg agaagaccat cagcaaggcc 1020

aaaggccaac ccagggagcc ccaggtctat acactgcctc cctccaggga cgaactcacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgcctggtc aagggctttt atcccagcga catcgccgtc 1140

gagtgggagt ccaacggaca gcccgagaat aactacaaga ccacccctcc tgtcctcgac 1200

tccgacggct ccttcttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaaaagcag gtggcagcag 1260

ggaaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaagccctcc acaaccacta cacccagaaa 1320

agcctgtccc tgagccccgg caaa 1344

<210> 10
<211> 448
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1 (hG1WT)

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 642
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của chuỗi nhẹ 14C12H1L1 (hG1WT)

<400> 11
gacattcaga tgactcagag cccctcctcc atgtccgcct ctgtgggcga cagggtcacc 60

ttcacatgcc gcgctagtca ggatatcaac acctacctga gctggtttca gcagaagcca 120

gggaaaagcc ccaagacact gatctaccgg gctaatagac tggtgtctgg agtcccaagt 180

cggttcagtg gctcagggag cggacaggac tacactctga ccatcagctc cctgcagcct 240

gaggacatgg caacctacta ttgcctgcag tatgatgagt tcccactgac ctttggcgcc 300

gggacaaaac tggagctgaa gcgaactgtg gccgctccct ccgtcttcat ttttccccct 360

tctgacgaac agctgaaatc aggcacagcc agcgtggtct gtctgctgaa caatttctac 420

cctagagagg caaaagtgca gtggaaggtc gataacgccc tgcagtccgg caacagccag 480

gagagtgtga ctgaacagga ctcaaaagat agcacctatt ccctgtctag tacactgact 540

ctgtccaagg ctgattacga gaagcacaaa gtgtatgcat gcgaagtgac acatcaggga 600

ctgtcaagcc ccgtgactaa gtcttttaac cggggcgaat gt 642

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14C12H1L1 (hG1WT)

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
        35                  40                  45

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

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

Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 1335
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG4)

<400> 13
gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60

agctgcgcag cttccggatt cgcctttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccaggaaagg gactggattg ggtcgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaagcat ggtttgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagtgccagc 360

accaaagggc cctcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420

gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600

tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660

ggtcccccat gcccaccatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720

ttcccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 780

gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320

ctgtctctgg gtaaa 1335

<210> 14
<211> 445
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG4)

<400> 14

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

```
Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 1344
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1TM)

<400> 15

gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60

agctgcgcag cttccggatt cgcctttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccaggaaagg gactggattg ggtcgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaagcat ggtttgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagtgccagc 360

accaaagggc ccagcgtgtt tcctctcgcc ccctcctcca aaagcaccag cggaggaacc 420

gctgctctcg gatgtctggt gaaggactac ttccctgaac ccgtcaccgt gagctggaat 480

agcggcgctc tgacaagcgg agtccataca ttccctgctg tgctgcaaag cagcggactc 540

tattccctgt ccagcgtcgt cacagtgccc agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgtaacgtca accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaagtgga gcccaaatcc 660

tgcgacaaga cacacacctg tccccctgt cctgctcccg aagctgctgg agcccctagc 720

gtcttcctct ttcctcccaa acccaaggac accctcatga tcagcagaac ccctgaagtc 780

acctgtgtcg tcgtggatgt cagccatgag gaccccgagg tgaaattcaa ctggtatgtc 840

gatggcgtcg aggtgcacaa cgccaaaacc aagcccaggg aggaacagta caactccacc 900

tacagggtgg tgtccgtgct gacagtcctc caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tgtccaacaa ggctctccct gcccccattg agaagaccat cagcaaggcc 1020

aaaggccaac ccagggagcc ccaggtctat acactgcctc cctccaggga cgaactcacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgcctggtc aagggctttt atcccagcga catcgccgtc 1140

gagtgggagt ccaacggaca gcccgagaat aactacaaga ccacccctcc tgtcctcgac 1200

tccgacggct ccttcttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaaaagcag gtggcagcag 1260

ggaaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaagccctcc acaaccacta cacccagaaa 1320

agcctgtccc tgagccccgg caaa 1344

<210> 16
<211> 448

<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1TM)

<400> 16

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

```
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17
<211> 1344
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nucleic của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1DM)

<400> 17
gaagtgcagc tggtcgagtc tgggggaggg ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60

agctgcgcag cttccggatt cgcctttagc tcctacgaca tgtcctgggt gcgacaggca 120

ccaggaaagg gactggattg ggtcgctact atctcaggag gcgggagata cacctactat 180

cctgacagcg tcaagggccg gttcacaatc tctagagata acagtaagaa caatctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag ggctgaggac accgcactgt actattgtgc caaccgctac 300

ggggaagcat ggtttgccta ttgggggcag ggaaccctgg tgacagtctc tagtgctagc 360

accaaagggc ccagcgtgtt tcctctcgcc ccctcctcca aaagcaccag cggaggaacc 420

gctgctctcg gatgtctggt gaaggactac ttccctgaac ccgtcaccgt gagctggaat 480

agcggcgctc tgacaagcgg agtccataca ttccctgctg tgctgcaaag cagcggactc 540

tattccctgt ccagcgtcgt cacagtgccc agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgtaacgtca accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaagtgga gcccaaatcc 660

tgcgacaaga cacacacctg tccccctgt cctgctcccg aagctgctgg aggccctagc 720

gtcttcctct ttcctcccaa acccaaggac accctcatga tcagcagaac ccctgaagtc 780

acctgtgtcg tcgtggatgt cagccatgag gaccccgagg tgaaattcaa ctggtatgtc 840

gatggcgtcg aggtgcacaa cgccaaaacc aagcccaggg aggaacagta caactccacc 900

tacagggtgg tgtccgtgct gacagtcctc caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tgtccaacaa ggctctccct gcccccattg agaagaccat cagcaaggcc 1020

aaaggccaac ccagggagcc ccaggtctat acactgcctc cctccaggga cgaactcacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgcctggtc aagggctttt atcccagcga catcgccgtc 1140

gagtgggagt ccaacggaca gcccgagaat aactacaaga ccacccctcc tgtcctcgac 1200

tccgacggct ccttcttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaaaagcag gtggcagcag 1260

ggaaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaagccctcc acaaccacta cacccagaaa 1320

agcctgtccc tgagccccgg caaa 1344

<210> 18
<211> 448
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng 14C12H1L1(hG1DM)

<400> 18

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

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

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

20

```
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> HCDR1

<400> 19

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> HCDR2

<400> 20

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr
1 5

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> HCDR3

<400> 21

Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 6
<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> LCDR1

<400> 22

Gln Asp Ile Asn Thr Tyr
1 5

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 23

Arg Ala Asn
1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> LCDR3

<400> 24

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5