



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

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



1-0047804

(51)¹⁹ A61K 39/00; C07K 16/28; C07K 16/22 (13) B

(21) 1-2019-06782

(22) 11/05/2018

(86) PCT/EP2018/062251 11/05/2018

(87) WO 2018/206790 15/11/2018

(30) 1707561.5 11/05/2017 GB

(45) 25/06/2025 447

(43) 27/04/2020 385A

(73) 1. ARGENX BV (BE)

Building C, Industriepark Zwijnaarde 7, 9052 Gent, Belgium

2. UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN (BE)

Place de L'Université 1, 1348, Louvain-la-Neuve, Belgium

(72) VAN DER WONING, Sebastian (BE); BORGIONS, Filip (BE); DREIER, Torsten (BE); MARIËN, Lore (BE); DE BOECK, Gitte (BE); LIENART, Stéphanie (BE); LUCAS, Sophie (BE); COULIE, Pierre (BE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ GARP-TGF- β TÁI TỔ HỢP HOẶC MẢNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ, ĐƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2019-06782

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp của GARP (Glycoprotein A Repetitions Predominant - glycoprotein A có các trình tự lặp chiếm ưu thế) và TGF- β 1 (Transforming growth factor β 1 - Yếu tố tăng trưởng biến đổi β 1), cụ thể là phức hợp GARP của người và TGF- β 1 của người. Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này thể hiện tập hợp các đặc điểm có lợi bao gồm gắn kết kháng nguyên ái lực cao và khả năng ức chế sự giải phóng TGF- β hoạt tính từ tế bào T điều hòa. Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế tương đối bền với sự khử amin, đồng phân hóa và oxy hóa, do đó chúng cho thấy tính ổn định được cải thiện. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit, hệ biểu hiện tế bào chủ hoặc phi tế bào chứa vectơ biểu hiện này, được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

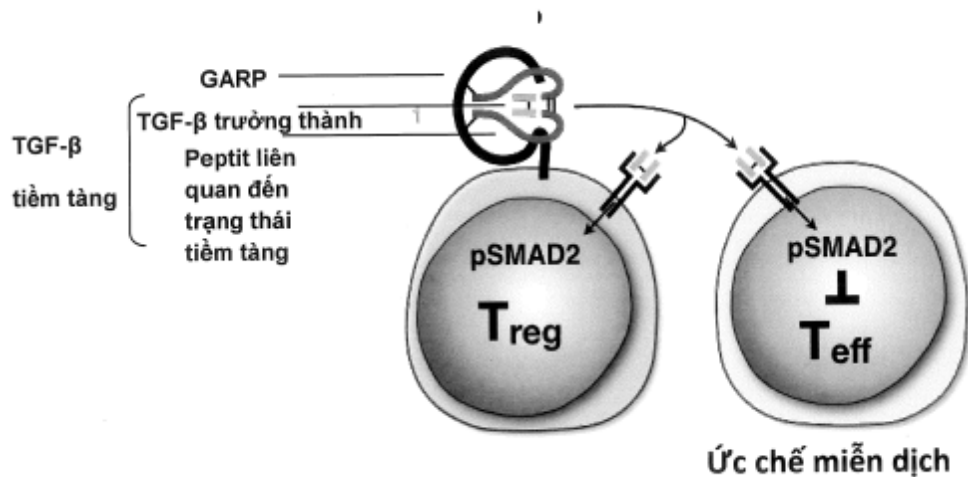


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1, cụ thể là phức hợp GARP của người và TGF- β 1 của người. Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên này thể hiện tập hợp các đặc điểm có lợi bao gồm khả năng gắn kết kháng nguyên ái lực cao và ức chế sự giải phóng TGF- β hoạt tính từ tế bào T điều hòa. Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được cải thiện so với kháng thể trong trạng kỹ thuật về khả năng gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1. Cụ thể, các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế tương đối bền với quá trình khử amin, đồng phân hóa và oxy hóa, nhờ đó chúng cho thấy tính ổn định được cải thiện so với kháng thể GARP-TGF- β 1 được mô tả trong tình trạng kỹ thuật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào T điều hòa (còn được gọi là “Treg” hoặc tế bào điều hòa T Foxp3⁺) là thành phần quan trọng của hệ miễn dịch. Cụ thể, các Treg đóng vai trò quan trọng trong sự cân bằng nội môi miễn dịch bằng cách ức chế các khía cạnh khác nhau của đáp ứng miễn dịch. Như một hệ quả về vai trò của chúng trong việc phối hợp đáp ứng miễn dịch, hoạt tính Treg bị rối loạn có thể dẫn đến việc phát triển các bệnh và tình trạng bệnh lý khác nhau. Cụ thể, chức năng Treg không đủ có thể dẫn đến bệnh lý tự miễn, trong khi đó hoạt tính Treg quá mức được liên quan đến việc ức chế đáp ứng kháng u ở các bệnh nhân ung thư.

Protein GARP (Glycoprotein A Repetitions Predominant - glycoprotein A có các trình tự lặp chiếm ưu thế) được xác định là dấu chuẩn được biểu hiện nhiều trên bề mặt của Treg, đặc biệt là Treg hoạt động. GARP là protein xuyên màng 80kDa với vùng ngoại bào bao gồm 20 đoạn lặp giàu leuxin. Nó còn được gọi là LRRC32. GARP dùng làm thụ thể đối với TGF- β , đặc biệt là dạng tiềm tàng của TGF- β , và cần cho sự

biểu hiện của TGF- β tiềm tàng trên tế bào Treg (EM Shevach. *Expert Opin Ther Targets* (2016) 21(2), 191-200).

TGF- β là xytokin được biết là đóng vai trò trong nhiều quy trình bao gồm tăng sinh và biệt hóa tế bào, tạo hình mô, quá trình viêm và chết theo chương trình. Nó cũng đã được xác định là một yếu tố tăng trưởng quan trọng liên quan đến sự phát triển ung thư, và khá bất thường, đã được xác định là một xytokin với đặc tính thúc đẩy khối u và ức chế khối u.

Việc sản xuất và hoạt hóa TGF- β là quy trình gồm nhiều bước, mà được điều hòa ở các mức khác nhau. TGF- β được tổng hợp dưới dạng tiền chất dime pro-TGF- β , mỗi chuỗi polypeptit chứa peptit liên quan đến trạng thái tiềm tàng (latency-associated peptide - LAP) và vùng TGF- β trưởng thành. Pro-TGF- β trải qua sự phân cắt bởi enzym furin để tạo thành “TGF- β tiềm tàng”, một dạng bất hoạt trong đó LAP vẫn được liên kết phi cộng hóa trị với vùng TGF- β trưởng thành của mỗi chuỗi polypeptit (xem Fig. 1). GARP được định vị trên màng sử dụng để vận chuyển và neo giữ TGF- β tiềm tàng với bề mặt tế bào của Treg, và nó là từ phức hợp TGF- β tiềm tàng-GARP được gắn kết với màng mà dạng hoạt động của TGF- β được giải phóng. Nhiều cơ chế đã được đề xuất để giải thích cách TGF- β hoạt tính được giải phóng từ phức hợp GARP-TGF- β tiềm tàng trên bề mặt của Treg. Tuy nhiên, các integrin, đặc biệt là $\alpha v \beta 6$ và $\alpha v \beta 8$, hiện nay được cho là đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển lực trượt cần cho việc giải phóng dime TGF- β trưởng thành.

Khi được giải phóng, dime TGF- β hoạt tính có thể hoạt động như chất điều hòa tự tiết hoặc cận tiết của con đường truyền tín hiệu xuôi chiều. Trong phạm vi hệ miễn dịch, TGF- β giải phóng từ các tế bào Treg được coi là ảnh hưởng đến hoạt tính của các tế bào T tác động khác nhau và cả chính các Treg (xem Fig. 1). Do Treg đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế miễn dịch, người ta cho rằng TGF- β được giải phóng từ Treg và hoạt động theo cách tự tiết có thể tham gia vào việc điều tiết ức chế Treg. Cụ thể, TGF- $\beta 1$ được điều khiển bởi Treg được coi là đóng vai trò đáng kể trong việc ức chế qua trung gian Treg của tính miễn dịch khối u.

Cho rằng vai trò của TGF- β được điều khiển bởi Treg trong việc ức chế đáp ứng miễn dịch trong vi môi trường khối u, người ta quan tâm đến việc hướng đích con đường này như là một cách tiếp cận thay thế cho liệu pháp miễn dịch ung thư. Ví dụ, các tác nhân trị liệu có khả năng làm giảm con đường này có thể đóng vai trò là công cụ hữu ích để cải thiện hiệu quả của vacxin ung thư hoặc các phác đồ liệu pháp miễn dịch ung thư khác được thiết kế để khai thác sức mạnh của hệ miễn dịch của cơ thể để điều trị ung thư.

Cuende *et al.* (Sci Transl Med. 2015 Apr 22;7(284):284ra56) mô tả việc sản xuất và mô tả đặc điểm của hai kháng thể đơn dòng (MHG-8 và LHG10), mà gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β trên Treg và ức chế sản xuất TGF- β . Hai kháng thể này cũng được mô tả và được mô tả đặc điểm trong các đơn quốc tế số WO2015/015003 và WO2016/125017. Các kháng thể này đã thể hiện là có khả năng ức chế hoạt tính ức chế miễn dịch của Treg người trong mô hình chuột có bệnh do mô ghép chống lại vật chủ ghép khác loài. Công việc này nhằm xác nhận phức hợp GARP-TGF- β là đích điều trị quan tâm nhằm mục đích điều biến chức năng Treg và do đó điều trị các bệnh như ung thư và bệnh tự miễn trong đó mức độ hoạt động của Treg đóng vai trò quan trọng. Tuy nhiên vẫn có nhu cầu đối với kháng thể GARP-TGF- β cải tiến có khả năng ức chế sự giải phóng TGF- β và do đó điều biến hoạt tính của Treg. Sáng chế khắc phục được vấn đề này như được mô tả trong bản mô tả này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế cải thiện tình trạng kỹ thuật bằng cách đề xuất kháng thể mới và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1 của người. Các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế thu được từ kháng thể GARP-TGF- β 1 “LHG-10”, được mô tả trong các đơn sáng chế quốc tế số WO2015/015003 và WO2016/125017. Các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của LHG-10 được thể hiện ở các SEQ ID NO: 1 và 2, tương ứng, và miền biến đổi chuỗi nhẹ của biến thể được xáo trộn chuỗi, LHG-10.6 (cũng được mô tả trong WO2015/015003 và WO2016/125017), được thể hiện ở SEQ ID NO: 3. Kháng thể theo sáng chế đặc biệt khác biệt đối với các trình tự CDR nhất định so với

LHG-10 và LHG-10.6, cụ thể là đối với các trình tự CDR2 và CDR3 của miền biến đổi chuỗi nặng. Các kháng thể LHG-10 và LHG-10.6 GARP-TGF- β có trình tự CDR2 chuỗi nặng: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 5); và trình tự CDR3 chuỗi nặng: NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 6), trong khi đó các kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự CDR2 chuỗi nặng: RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12); và trình tự CDR3 chuỗi nặng: YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13).

Sự khác biệt trong các trình tự CDR2 và CDR3 chuỗi nặng được thông báo ở đây dẫn đến các kháng thể này cải tiến so với kháng thể trong tình trạng kỹ thuật nhờ tính ổn định được cải thiện của chúng. Cụ thể hơn, các kháng thể theo sáng chế tương đối bền đối với sự khử amin, đồng phân hóa và oxy hóa, do đó chúng thể hiện tính ổn định được cải thiện. Bất ngờ là việc thay thế đặc hiệu trong các vùng CDR2 và CDR3 chuỗi nặng mà dẫn đến tính ổn định được cải thiện không làm giảm đáng kể ái lực gắn kết của các kháng thể này đối với phức hợp GARP-TGF- β 1. Tính ổn định được cải thiện được kết hợp với việc gắn kết đích ái lực cao tạo cho các kháng thể theo sáng chế đặc biệt thích hợp để phát triển lâm sàng làm các tác nhân trị liệu, ví dụ các tác nhân trị liệu bệnh ung thư.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) trong đó:

VH CDR3 bao gồm trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12), và

VH CDR1 bao gồm trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1 của người, trong đó

kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) trong đó:

VH CDR3 gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),
và

VH CDR1 gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4).

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể còn bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong đó:

VL CDR3 bao gồm trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể còn bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong đó:

VL CDR3 gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm

miền biến đổi chuỗi nặng (VH), trong đó:

VH CDR3 bao gồm trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),
và

VH CDR1 bao gồm trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4); và

miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

VL CDR3 bao gồm trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm

miền biến đổi chuỗi nặng (VH), trong đó:

VH CDR3 gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12), và

VH CDR1 gồm có trình tự axit amin SYID (SEQ ID NO: 4); và

miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

VL CDR3 gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và/hoặc ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) là biến thể được làm giống của người, được tạo dòng mầm hoặc biến thể ái lực của miền VH hoặc VL thu được từ lạc đà.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP của người và TGF- β 1 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ các miền dưới đây:

(i) VH bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14; hoặc

(ii) VH bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với SEQ ID NO:14.

Theo một phương án khác hoặc ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được chọn từ các miền dưới đây:

- (i) VL bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15; hoặc
- (ii) VL bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với SEQ ID NO: 15.

Đối với các phương án trong đó các miền của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được xác định bằng độ đồng nhất trình tự theo tỷ lệ % cụ thể với trình tự tham chiếu, các miền VH và/hoặc miền VL có thể giữ lại các trình tự CDR đồng nhất với các miền có mặt trong trình tự tham chiếu sao cho biến thể này chỉ có mặt trong vùng khung làm việc.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền CH1, vùng bản lề, miền CH2 và miền CH3 của kháng thể người, cụ thể IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể bao gồm vùng CH3 của IgG4 người và bao gồm phép thế S228P trong miền CH3.

Kháng thể gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1 có thể bao gồm ít nhất là một chuỗi nặng globulin miễn dịch chiều dài đầy đủ và/hoặc ít nhất là một chuỗi nhẹ lambda hoặc kappa chiều dài đầy đủ. Theo các phương án nhất định, kháng thể bao gồm chuỗi nặng gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 17. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nặng với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể

đơn dòng bao gồm chuỗi nhẹ với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 17. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nặng với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16, và chuỗi nhẹ với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 17.

Đối với các phương án trong đó các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể được xác định bằng độ đồng nhất trình tự theo tỷ lệ % cụ thể với trình tự tham chiếu, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể giữ lại trình tự CDR đồng nhất với chúng có mặt trong trình tự tham chiếu sao cho biến thể này chỉ có mặt trong các vùng CDR.

Trừ khi được quy định khác trong sáng chế này, % độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách so sánh hai trình tự được sắp thẳng hàng theo cách tối ưu và trong đó trình tự axit amin được so sánh có thể bao gồm các thêm hoặc bớt so với trình tự tham chiếu đối với việc sắp thẳng hàng tối ưu giữa hai trình tự này. Tỷ lệ % độ đồng nhất được tính bằng cách xác định số lượng vị trí đồng nhất trong đó gốc axit amin là đồng nhất giữa hai trình tự, bằng cách chia số vị trí đồng nhất cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh và nhân kết quả thu được với 100 để thu được tỷ lệ % độ đồng nhất giữa hai trình tự này. Ví dụ, có thể sử dụng chương trình BLAST, "trình tự BLAST 2" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), các thông số được sử dụng là các thông số mặc định (cụ thể đối với các thông số "điểm phạt khoảng trống hở": 5, và "điểm phạt khoảng trống mở rộng": 2; ma trận được chọn là, ví dụ, ma trận "BLOSUM 62" được đề xuất bởi chương trình), tỷ lệ % của độ đồng nhất giữa hai trình tự được so sánh được tính trực tiếp bằng chương trình.

Mỗi kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây có thể thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm/dấu hiệu sau:

- kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể phản ứng chéo với phức hợp GARP-TGF- β có nguồn gốc từ *Cynomolgus*;
- kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết với GARP-TGF- β 1 của người bằng ái lực cao;
- kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm miền VH và miền VL khi được thử nghiệm là mảnh Fab có tốc độ phân ly (K_{off}) đối với phức hợp TGF- β 1 và GARP của người nhỏ hơn 5×10^{-4} giây $^{-1}$;
- kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm miền VH và miền VL mà khi được thử nghiệm ở dạng mảnh Fab thể hiện tốc độ phân ly (K_{off}) đối với phức hợp GARP và TGF- β 1 của người nằm trong khoảng 1×10^{-6} giây $^{-1}$ đến 5×10^{-4} giây $^{-1}$;
- kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm miền VH và miền VL mà khi được thử nghiệm dưới dạng mAb thể hiện K_D nhỏ hơn $1,7 \times 10^{-9}$ M;
- kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể phong bế hoặc ức chế sự giải phóng TGF- β 1 từ tế bào T điều hòa.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến phân tử polynucleotit mã hóa các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên được liệt kê ở trên, ngoài vector biểu hiện bao gồm polynucleotit, tế bào chủ chứa vector này, và phương pháp biểu hiện tái tổ hợp/sản xuất kháng thể được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm bất kỳ một trong số các kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây, và chất mang hoặc tá dược được dụng.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị y tế bằng cách sử dụng các kháng thể GARP-TGF- β 1 được liệt kê ở trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, cụ thể là trong phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn liên quan đến TGF- β . Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bằng cách sử dụng kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được điều trị được chọn từ nhóm bao

gồm bệnh viêm, lây nhiễm mạn tính, ung thư, chứng xơ hóa, bệnh tim mạch, bệnh mạch máu não và bệnh thoái hóa thần kinh. Theo các phương án nhất định, kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được dùng kết hợp với phương pháp điều trị khác như là một phần của phương pháp điều trị kết hợp. Ví dụ, kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân trị liệu miễn dịch, tùy ý kháng thể kích thích miễn dịch hoặc vaccin khối u.

Các phương án này và các phương án khác của sáng chế sẽ được đánh giá và được hiểu rõ hơn khi được xem xét kết hợp với phần mô tả chi tiết dưới đây và phần hình vẽ kèm theo. Tuy nhiên, cần hiểu rằng mô tả sau đây, phần mô tả chi tiết dưới đây, trong khi chỉ ra các phương án khác nhau của sáng chế và các chi tiết cụ thể của chúng, được nêu nhằm mục đích minh họa và không giới hạn. Nhiều thay thế, cải biến, bổ sung và/hoặc sắp xếp lại có thể được thực hiện trong phạm vi của sáng chế mà không nằm ngoài ý tưởng của chúng, và sáng chế bao gồm tất cả các thay thế, cải biến, bổ sung và/hoặc sắp xếp lại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện việc gắn kết TGF- β tiềm tàng với GARP trên bề mặt của tế bào T điều hòa. TGF- β được sản xuất dưới dạng tiền chất, “pro-TGF- β ” và trải qua sự phân cắt để tạo ra “TGF- β tiềm tàng”, một dạng trong đó dime TGF- β trưởng thành duy trì liên kết phi cộng hóa trị với vùng peptit liên quan đến trạng thái tiềm tàng (LAP) của mỗi polypeptit. Chính dạng tiềm tàng này gắn kết với GARP trên bề mặt của tế bào Treg. Các integrin $\alpha\beta$ 6 và $\alpha\beta$ 8 được coi là chịu trách nhiệm điều tiết sự giải phóng của “TGF- β hoạt tính” hoặc trưởng thành từ bề mặt tế bào. Dạng hoạt động này có thể hoạt động theo kiểu cận tiết để mang lại hiệu ứng trong nhiều loại tế bào đích hoặc có thể hoạt động như một chất trung gian tự động bằng cách liên kết với thụ thể TGF- β trên các tế bào Treg.

Fig. 2 thể hiện hoạt tính gắn kết với đích như được xác định bằng Biacore™ hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) đối với kháng thể 39B6 IgG1^{N297Q} và 39B6 IgG4^{S228P} trong khoảng thời gian 56 ngày đối với các mẫu được bảo quản ở -20°C, 5°C

và 37°C trong PBS hoặc PBSTween (PBSTw). Mẫu tham chiếu (-20 °C) được thiết lập ở hoạt tính gắn kết 100% ở mỗi thời điểm.

Fig. 3 thể hiện kết quả thử nghiệm các biến thể kháng thể 39B6-A trong thử nghiệm được thiết kế để theo dõi quá trình phosphoryl hóa SMAD2 xuôi chiều của sự hoạt hóa thụ thể TGF- β . Quá trình phosphoryl hóa SMAD2 sử dụng làm dấu chuẩn cho sự hoạt hóa con đường hoạt hóa TGF- β , sau khi TGF- β gắn kết với thụ thể của nó. Nếu quá trình phosphoryl hóa SMAD2 giảm, hoạt tính TGF- β bị ức chế. Fig. 3A: Thử nghiệm thẩm tách Western thể hiện mức phosphoryl hóa SMAD2 giảm với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của các kháng thể GARP-TGF- β 39B6-A, 39B6-AVE, 39B6-AEE, 39B6-AYE, 39B6-ANR và 39B6-ANK. Fig. 3B: Sự biểu diễn dưới dạng đồ thị về dữ liệu ở (A) thể hiện tỷ lệ % ức chế phosphoryl hóa SMAD2 ở các nồng độ kháng thể khác nhau.

Fig. 4 thể hiện kết quả thử nghiệm các biến thể kháng thể 39B6-A trong thử nghiệm được thiết kế để xác định hoạt tính TGF- β thông qua gen thông báo luciferaza được liên hợp với promotor SMAD. Các đồ thị thể hiện tỷ lệ % ức chế của tín hiệu phát quang với sự có mặt các nồng độ khác nhau của kháng thể GARP-TGF- β LHG-10, 39B6-A, 39B6-AVE, 39B6-AEE, 39B6-AYE, 39B6-ANR và 39B6-ANK.

Fig. 5 thể hiện tỷ lệ % tạo thành kết tụ trong khoảng thời gian 56 ngày với kháng thể 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR được bảo quản ở 5°C và 37°C. Việc tạo thành khối kết tụ được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC).

Fig. 6 thể hiện tỷ lệ % tạo thành mảnh trong khoảng thời gian 56 ngày với kháng thể 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR được bảo quản ở 37 °C. Việc tạo thành mảnh được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC).

Fig. 7 thể hiện tỷ lệ % vùng monome trong khoảng thời gian 56 ngày với các kháng thể 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR được bảo quản ở 5 °C và 37 °C. Vùng monome được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC).

Fig. 8 thể hiện kết quả phân tích SDS-PAGE các mẫu kháng thể được bảo quản trong 56 ở nhiệt độ tham chiếu (-20°C), ở 5°C và 37°C . Fig. 8A: 39B6-AVE. Fig. 8B: 39B6-AYE. Fig. 8C: 39B6-ANK. Fig. 8D: 39B6-ANR. Dấu chuẩn xuất hiện ở trung tâm của mỗi gel. Phía trái của các dấu chuẩn, 3 mẫu là các mẫu (i) Ref; (ii) 5°C ; và (iii) 37°C được thử nghiệm trong các điều kiện không khử và phía phải của các dấu chuẩn, 3 mẫu là các mẫu (i) Ref; (ii) 5°C ; và (iii) 37°C được thử nghiệm trong các điều kiện khử.

Fig. 9 thể hiện hoạt tính gắn kết với đích như được xác định bằng Biacore™ hoặc SPR đối với các kháng thể 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR trong khoảng thời gian 56 ngày đối với mẫu được bảo quản ở -20°C , 5°C và 37°C . Mẫu tham chiếu (-20°C) được thiết lập hoạt tính gắn kết 100% ở mỗi thời điểm.

Fig. 10 thể hiện nồng độ protein (mg/ml) đối với mẫu kháng thể 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR trong khoảng thời gian 56 ngày đối với các mẫu được bảo quản ở -20°C (ref), 5°C và 37°C .

Fig. 11 thể hiện kết quả phân tích SDS-PAGE đối với mẫu kháng thể sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông. Các dấu chuẩn xuất hiện ở trung tâm của gel. Bên trái của các dấu chuẩn, 4 mẫu là các mẫu được phân tích trong các điều kiện không khử: (i) Ref đối với 39B6-AVE; (ii) Mẫu đông lạnh-rã đông đối với 39B6-AVE; (iii) Ref đối với 39B6-AYE; và (iv) Mẫu đông lạnh-rã đông đối với 39B6-AYE. Bên phải các dấu chuẩn, 4 mẫu là các mẫu được phân tích được thử nghiệm trong các điều kiện khử: (i) Ref đối với 39B6-AVE; (ii) Mẫu đông lạnh-rã đông đối với 39B6-AVE; (iii) Ref đối với 39B6-AYE; và (iv) Mẫu đông lạnh-rã đông đối với 39B6-AYE.

Fig. 12 thể hiện hoạt tính gắn kết với đích như được xác định bằng Biacore™ hoặc SPR sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông đối với kháng thể 39B6-AVE và 39B6-AYE. Mẫu tham chiếu (-20°C) được thiết lập ở hoạt tính gắn kết 100% ở mỗi thời điểm.

Fig. 13 thể hiện nồng độ protein (mg/ml) đối với các mẫu kháng thể 39B6-AVE và 39B6-AYE sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông.

Fig. 14 thể hiện hoạt tính gắn kết với đích như được xác định bằng Biacore™ hoặc SPR sau thử nghiệm độ ổn định nhiệt ở các nhiệt độ nằm trong khoảng từ 54,6 °C đến 71,4 °C đối với các kháng thể 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR. Mẫu tham chiếu được thiết lập ở hoạt tính gắn kết 100%.

Fig. 15 thể hiện kết quả của phân tích SDS-PAGE đối với kháng thể mẫu sau 96 giờ quay. Các dấu chuẩn xuất hiện ở trung tâm của gel. Bên trái của các dấu chuẩn, 4 mẫu là các mẫu được phân tích trong các điều kiện không khử: (i) Ref đối với 39B6-AVE; (ii) mẫu được quay đối với 39B6-AVE; (iii) Ref đối với 39B6-AYE; và (iv) mẫu được quay đối với 39B6-AYE. Bên phải các dấu chuẩn, 4 mẫu là các mẫu được phân tích được thử nghiệm trong các điều kiện khử: (i) Ref đối với 39B6-AVE; (ii) mẫu được quay đối với 39B6-AVE; (iii) Ref đối với 39B6-AYE; và (iv) mẫu được quay đối với 39B6-AYE.

Fig. 16 thể hiện hoạt tính gắn kết với đích như được xác định bằng Biacore™ hoặc SPR theo thử nghiệm độ bền quay đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE. Mẫu tham chiếu được thiết lập ở hoạt tính gắn kết 100%.

Fig. 17 thể hiện nồng độ protein (mg/ml) đối với các mẫu mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE theo thử nghiệm độ bền quay.

Fig. 18 thể hiện lượng tương đối của việc khử amit và isome hóa vị trí N95 ở các kháng thể 39B6-ANE, 39B6-ANR và 39B6-ANK trong khoảng thời gian 56 ngày. Kháng thể 39B6-AVE và 39B6-AYE không được bao gồm do các kháng thể này có gốc “N95” được loại bỏ khỏi CDR3. Cũng được thể hiện là hoạt tính gắn kết tương đối với các mAb 39B6-ANE, 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR trong khoảng thời gian 56 ngày, đối với các mẫu được bảo quản ở 37 °C.

Fig. 19 thể hiện tiêu chuẩn đối với TGF-β trưởng thành trong việc gắn kết 39B6-AYE (ARGX-115) với phức hợp GARP-TGF-β. Các đĩa ELISA được phủ GARP hoặc Ab ARGX-115 kháng GARP. Đối với các đĩa ELISA được phủ GARP, phức hợp với TGF-β tiềm tàng chiều dài đầy đủ (bao gồm cả các vùng LAP và TGF-β trưởng thành) hoặc phức hợp với LAP tái tổ hợp được tạo thành bằng cách bổ sung protein tái tổ hợp liên quan. Đối với các đĩa ELISA được phủ ARGX-115, GARP được

bổ sung sau đó TGF- β tiềm tàng chiều dài đầy đủ hoặc LAP được bổ sung. ARGX-115 chỉ có thể gắn kết với GARP với sự có mặt của TGF- β chiều dài đầy đủ. Việc gắn kết của ARGX-115 với phức hợp GARP-LAP không diễn ra. Ngược lại, kháng thể kháng LAP có thể gắn kết với phức hợp GARP-LAP. Điều này chứng tỏ yêu cầu đối với TGF- β trưởng thành cho sự gắn kết của ARGX-115 với phức hợp GARP-TGF- β .

Fig. 20 thể hiện khả năng của kháng thể trong việc trung hòa sự hoạt hóa TGF- β bằng phức hợp GARP-TGF- β với các dạng đột biến của TGF- β . Hoạt tính trung hòa của ARGX-115 được loại bỏ bằng đột biến R58 trong LAP và K338 ở TGF- β trưởng thành.

Mô tả chi tiết sáng chế

A. Định nghĩa

“**GARP**” – GARP (Glycoprotein A Repetitions Predominant) là thành viên thuộc họ protein có đoạn lặp giàu leuxin. Nó còn được gọi là đoạn lặp giàu leuxin chứa 32 (LRRC32). GARP là protein xuyên màng 80kDa với vùng ngoại bào chứa chủ yếu 20 đoạn lặp giàu leuxin Trình tự axit amin hoàn chỉnh của biến thể phiên mã protein GARP của người 2 (số truy cập GenBank NP_001122394,1) là:

```
MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLPPDTE
TLDLSGNQLRSILASPLGFYTALRHLDLSTNEISFLQPGAFQALTHLEHLSLAH
NRLAMATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAEN
SLTRLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCIS
DFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPR
LIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLD
LSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALE
TLELGARALGSLRTLTLQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPD
EPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGAFHTPLTELDLSSNPGLEVATG
ALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICKRLNLAENRLSHLPAAWTQAV
SLEVLDLRNNSFSLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGNGWLAAQLHQG
RVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIILTFILVSAILTT
LAACCCVRRQKFNQQYKA (SEQ ID NO: 33).
```

“**TGF- β** ” – TGF- β là xytokin thuộc siêu họ yếu tố tăng trưởng. Có ba isoform TGF- β khác nhau (TGF- β 1, TGF- β 2 và TGF- β 3) được mã hóa bởi ba gen khác nhau, nhưng cấu trúc tổng thể của các isoform TGF- β rất tương tự, với độ tương đồng về thứ tự là 70-80%. Thuật ngữ TGF- β , như được sử dụng ở đây, thường được dùng để bao gồm cả ba isoform khác nhau của xytokin TGF- β này, trừ khi được quy định khác bằng ngữ cảnh.

Cả ba isoform TGF- β này được mã hóa dưới dạng các tiền chất protein lớn; TGF- β 1 (số truy cập GenBank: NM_000660) chứa 390 axit amin, và TGF- β 2 (số truy cập GenBank: nôi NM_001135599 và NM_003238) và TGF- β 3 (số truy cập GenBank: XM_005268028) chứa 412 axit amin. Mỗi chúng có peptit tín hiệu đầu tận N gồm 20-30 axit amin cần cho việc tiết từ tế bào, vùng pro (pro-region) (được đặt tên là peptit liên quan đến trạng thái tiềm tàng hoặc LAP), và vùng đầu tận C 112-114 axit amin trở thành phân tử TGF- β trưởng thành sau khi nó giải phóng từ vùng pro bằng phân cắt kiểu phân giải protein. Sau khi phân cắt kiểu phân giải protein, LAP và TGF- β trưởng thành vẫn liên kết phi cộng hóa trị và tạo thành phân tử “TGF- β tiềm tàng”. Ở dạng tiềm tàng này, TGF- β trưởng thành được ngăn chặn việc gắn kết với thụ thể TGF- β bởi LAP. Để phát tín hiệu, TGF- β trưởng thành phải được giải phóng khỏi LAP. TGF- β trưởng thành không đi kèm với LAP được gọi là *TGF- β hoạt tính*, do nó có thể gắn kết với thụ thể TGF- β và truyền tín hiệu.

TGF- β 1 chiều dài đầy đủ có trình tự axit amin:

MPPSGLRLLPLLLPLLWLLVLTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEAI RQILS
KLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEV
TRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKL
KVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEI
EGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLER
AQHLQSSRHRRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHA
NFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYYVGR
KPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 34).

LAP có trình tự axit amin sau đây:

LSTCKTIDMELVKRKRIEAI RGQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNST
RDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNT
SELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRL LAPS
DSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNTLQVDINGFTTGR
RGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRR (SEQ ID NO: 35).

TGF- β 1 trưởng thành có trình tự axit amin sau đây:

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW
SLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMI
VRSCCKCS (SEQ ID NO: 36).

“Phức hợp GARP-TGF- β ” – như được sử dụng ở đây, phức hợp GARP-TGF- β có nghĩa là phức hợp ban đầu mà tạo thành khi TGF- β tiềm tàng gắn kết với GARP, đặc biệt là GARP được nằm trên bề mặt của tế bào Treg. Mặc dù không được quy định trong bản mô tả, “phức hợp GARP-TGF- β ,” hoặc đơn giản là “GARP-TGF- β ,” như được sử dụng ở đây, được dự định để có nghĩa là phức hợp giữa GARP và TGF- β tiềm tàng. Việc gắn kết của GARP với TGF- β , đặc biệt hơn là TGF- β tiềm tàng, được mô tả ở mức phân tử, ví dụ như được thông báo trong Wang *et al.* Mol Biol Cell. 2012 Mar;23(6):1129-39. GARP tạo ra liên kết disulphua với Cys4 của TGF- β tiềm tàng và cũng liên kết với TGF- β tiềm tàng thông qua các tương tác không cộng hóa trị. Có 15 gốc Cys trong miền ngoại bào của GARP, và GARP sử dụng Cys-192 và Cys-331 để tạo ra các liên kết disulphua với hai gốc Cys4 của TGF- β tiềm tàng. Sau đó, một protein Gkv liên kết với một dime TGF- β tiềm tàng.

“Kháng thể” hoặc “globulin miễn dịch”- như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “globulin miễn dịch” bao gồm polypeptit có sự kết hợp của hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ dù cho nó có các hoạt tính miễn dịch đặc hiệu liên quan hay không. “Kháng thể” để chỉ cơ cấu như vậy mà có hoạt tính phản ứng miễn dịch đặc hiệu đã biết đáng kể với kháng nguyên quan tâm (ví dụ phức hợp GARP và TGF- β). Thuật ngữ “các kháng thể GARP-TGF- β ” được sử dụng ở đây để chỉ kháng thể thể hiện tính đặc hiệu miễn dịch đối với phức hợp GARP và TGF- β 1, cụ thể là phức hợp GARP-TGF- β 1 của người và trong số một số trường hợp các thể tương đồng loài của chúng. Các kháng

thể và globulin miễn dịch bao gồm các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng, có hoặc không có các liên kết cộng hóa trị trong chuỗi giữa chúng. Các cấu trúc globulin miễn dịch cơ bản trong hệ thống động vật có xương được hiểu tương đối rõ.

Thuật ngữ chung “globulin miễn dịch” bao gồm năm lớp kháng thể phân biệt (IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE) mà có thể được phân biệt về mặt sinh hóa. Cả năm lớp kháng thể này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Phần thảo luận dưới đây thường sẽ hướng đến lớp IgG của các phân tử globulin miễn dịch. Liên quan đến IgG, globulin miễn dịch thường bao gồm hai chuỗi polypeptit nhẹ đồng nhất có khối lượng phân tử xấp xỉ 23000 Dalton, và hai chuỗi nặng đồng nhất có khối lượng phân tử từ 53000 đến 70000. Bốn chuỗi được nối bằng các liên kết disulfua trong cấu hình "Y" trong đó chuỗi nhẹ ôm lấy các chuỗi nặng bắt đầu ở miệng của "Y" và liên tục qua vùng biến đổi.

Các chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lớp thành kappa (κ) hoặc lambda (λ). Mỗi lớp chuỗi nặng có thể được liên kết với chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Thông thường, các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng được liên kết cộng hóa trị với nhau, và các phần "đuôi" của hai chuỗi nặng được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua cộng hóa trị hoặc liên kết phi cộng hóa trị khi các globulin miễn dịch được tạo ra bằng tế bào lai, tế bào B hoặc tế bào chủ được thiết kế di truyền. Ở chuỗi nặng, trình tự axit amin chạy từ đầu tận N ở các đầu chạc của cấu hình chữ Y đến đầu tận C ở phần dưới cùng của mỗi chuỗi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được rằng chuỗi nặng được phân lớp thành gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) với một số phân lớp trong số chúng (ví dụ $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Chính bản chất của chuỗi này xác định “lớp” kháng thể là IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE, tương ứng. Các phân lớp globulin miễn dịch (isotyp) ví dụ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, v.v. đã được mô tả đặc điểm rõ ràng và được biết là tạo sự chuyên biệt chức năng. Các phiên bản cải biến của các lớp và isotyp này dễ dàng nhận biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi xem phần bộc lộ này và, theo đó, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Như đã nêu trên, vùng biến đổi của kháng thể cho phép kháng thể nhận biết chọn lọc và gắn kết đặc hiệu với các epitop trên kháng nguyên. Như vậy, miền VL và

miền VH của kháng thể kết hợp để tạo thành vùng biến đổi mà xác định vị trí gắn kết kháng nguyên ba chiều. Cấu trúc kháng thể gồm bốn phần này tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên có mặt ở đầu của mỗi cánh tay trên chạc chữ Y. Cụ thể hơn, vị trí gắn kết kháng nguyên được xác định bằng ba vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) trên mỗi chuỗi VH và VL.

“Vị trí gắn kết” – như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vị trí gắn kết” bao gồm vùng polypeptit chịu trách nhiệm gắn kết chọn lọc với kháng nguyên đích quan tâm. Miền gắn kết bao gồm ít nhất là một vị trí gắn kết. Các miền gắn kết lấy làm ví dụ bao gồm miền biến đổi kháng thể. Các phân tử kháng thể của sáng chế có thể bao gồm một vị trí gắn kết hoặc nhiều (ví dụ hai, ba hoặc bốn) vị trí gắn kết.

“Vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” - các thuật ngữ "vùng biến đổi" và "miền biến đổi" được sử dụng đối cho nhau và được dự định là có nghĩa tương đương. Thuật ngữ "biến đổi" chỉ việc các phần nhất định của các miền biến đổi VH và VL khác đáng kể về trình tự giữa các kháng thể và được sử dụng trong khả năng liên kết và tính đặc hiệu của từng kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, mức độ thay đổi là không đều trên các vùng biến đổi của kháng thể. Nó được tập trung ở ban đoạn được gọi là "vòng siêu biến" trong mỗi miền VL và miền VH mà tạo thành một phần của vị trí gắn kết kháng nguyên. Các vòng siêu biến thứ nhất, thứ hai và thứ ba của miền chuỗi nhẹ V_{λ} được gọi là $L1(\lambda)$, $L2(\lambda)$ và $L3(\lambda)$ và có thể được định nghĩa là bao gồm các gốc 24-33 ($L1(\lambda)$, gồm có 9, 10 hoặc 11 gốc axit amin), 49-53 ($L2(\lambda)$, gồm có 3 gốc) và 90-96 ($L3(\lambda)$, gồm có 5 gốc) trong miền VL (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)). Vòng siêu biến thứ nhất, thứ hai và thứ ba của miền chuỗi nhẹ V_{κ} ở đây được gọi là $L1(\kappa)$, $L2(\kappa)$ và $L3(\kappa)$ và có thể được xác định là bao gồm các gốc 25-33 ($L1(\kappa)$, gồm có 6, 7, 8, 11, 12 hoặc 13 gốc), 49-53 ($L2(\kappa)$, gồm có 3 gốc) và 90-97 ($L3(\kappa)$, gồm có 6 gốc) trong miền VL (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)). Vòng siêu biến thứ nhất, thứ hai và thứ ba của miền VH ở đây được gọi là H1, H2 và H3 và có thể được xác định là bao gồm các gốc 25-33 (H1, gồm có 7, 8 hoặc 9 gốc), 52-56 (H2, gồm có 3 hoặc 4 gốc) và 91-105 (H3, biến đổi cao trong chiều dài) trong miền VH (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)).

Trừ khi được quy định khác, các thuật ngữ L1, L2 và L3 lần lượt chỉ vòng siêu biến thứ nhất, thứ hai và thứ ba của miền VL, và bao gồm vòng siêu biến thu được từ cả hai isotyp $V\kappa$ và $V\lambda$. Các thuật ngữ H1, H2 và H3 tương ứng chỉ vòng siêu biến thứ nhất, thứ hai và thứ ba của miền VH, và bao gồm vòng siêu biến thu được từ bất kỳ trong số các isotyp chuỗi nặng đã biết, bao gồm γ , ϵ , δ , α hoặc μ .

Các vòng siêu biến L1, L2, L3, H1, H2 và H3 có thể mỗi vòng bao gồm một phần của "vùng xác định tính bổ trợ" hoặc "CDR", như được định nghĩa dưới đây. Các thuật ngữ "vòng siêu biến" và "vùng xác định tính bổ trợ" không hoàn toàn đồng nghĩa, do vòng siêu biến (HV) được định nghĩa trên cơ sở cấu trúc, trong khi đó vùng xác định tính bổ trợ (CDR) được định nghĩa dựa trên sự thay đổi trình tự (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) và các giới hạn của các HV và các CDR có thể khác nhau ở một số miền VH và VL.

Các CDR của miền VL và VH thường có thể được định nghĩa là bao gồm các axit amin sau đây: gốc 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) và 89-97 (LCDR3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, và gốc 31-35 hoặc 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) và 95-102 (HCDR3) trong miền biến đổi chuỗi nặng; (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Vì thế, các HV có thể được bao gồm trong các CDR tương ứng và các viện dẫn ở đây đến "vòng siêu biến" của các miền VH và VL nên được hiểu là cũng bao gồm các CDR tương ứng, và ngược lại, trừ khi được quy định khác.

Các phần được bảo toàn cao hơn của miền biến đổi được gọi là vùng khung (vùng khung làm việc - FR), như được định nghĩa dưới đây. Các miền biến đổi của mỗi trong số các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nguyên bản chuỗi nhẹ bao gồm bốn FR (FR1, FR2, FR3 và FR4, tương ứng), chủ yếu theo cấu trúc tấm β , được nối bằng ba vòng siêu biến. Các vòng siêu biến trong mỗi chuỗi được giữ cùng nhau ở khoảng cách gần bởi các FR và, với vòng siêu biến từ chuỗi khác, góp phần tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Phân tích cấu trúc kháng thể cho thấy mối quan hệ giữa trình tự và hình dạng của vị trí gắn kết được tạo thành bởi vùng xác định tính bổ trợ

(Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175-182 (1990)). Mặc dù có độ thay đổi trình tự cao, nằm trong số sáu vòng lặp chỉ chấp nhận một tập hợp nhỏ của cấu hình chuỗi chính, được gọi là “cấu trúc kiểu mẫu”. Các cấu hình này trước hết được xác định bởi chiều dài của vòng và thứ hai là bởi sự có mặt của các gốc quan trọng ở các vị trí nhất định trong vòng và trong vùng khung làm việc mà xác định cấu hình thông qua sự đóng gói, liên kết hydro hoặc khả năng có cấu hình chuỗi chính khác thường của chúng.

“**CDR**” – như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "CDR" hoặc "vùng xác định tính hỗ trợ" có nghĩa là các vị trí kết hợp kháng nguyên không liên tục được phát hiện trong vùng biến đổi của các polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các vùng cụ thể này đã được mô tả bởi Kabat, *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) và Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), và Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) và MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) trong đó các định nghĩa bao gồm việc chồng lặp hoặc tập con của gốc axit amin khi được so sánh với nhau. Các gốc axit amin mà bao gồm các CDR như được xác định bằng mỗi trong số các tài liệu viện dẫn nêu trên được nêu nhằm mục đích so sánh. Tốt hơn là, thuật ngữ “CDR” là CDR như được xác định bằng Kabat được dựa trên việc so sánh trình tự.

Bảng 1 Các định nghĩa về CDR

	Các định nghĩa về CDR		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹Đánh số gốc theo danh pháp Kabat *et al.*, supra

²Đánh số gốc theo danh pháp Chothia *et al.*, supra

³Đánh số gốc theo danh pháp MacCallum *et al.*, supra

“Vùng khung làm việc” – Thuật ngữ “vùng khung làm việc” hoặc “vùng FR” như được sử dụng ở đây, bao gồm các gốc axit amin mà là một phần của vùng biến đổi, nhưng không phải là một phần của các CDR (ví dụ sử dụng định nghĩa Kabat về CDR). Vì thế, khung làm việc vùng thay đổi là có chiều dài nằm trong khoảng từ 100-120 axit amin nhưng chỉ bao gồm các axit amin bên ngoài CDR. Đối với ví dụ cụ thể về miền biến đổi chuỗi nặng và các CDR được định nghĩa bởi Kabat *et al.*, vùng khung làm việc 1 tương ứng với miền của vùng biến đổi bao gồm các axit amin 1-30; vùng khung làm việc 2 tương ứng với miền của vùng biến đổi bao gồm các axit amin 36-49; vùng khung làm việc 3 tương ứng với miền của vùng biến đổi bao gồm các axit amin 66-94, và vùng khung làm việc 4 tương ứng với miền của vùng biến đổi từ axit amin 103 đến hết vùng biến đổi. Các vùng khung làm việc đối với chuỗi nhẹ được phân chia tương tự bởi mỗi một trong số các CDR vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Tương tự, bằng cách sử dụng định nghĩa CDR bởi Chothia *et al.* or McCallum *et al.* các giới hạn vùng khung làm việc được phân tách bằng phần cuối CDR tương ứng như được mô tả ở trên. Theo các phương án ưu tiên các CDR được định nghĩa theo Kabat.

Ở các kháng thể có trong tự nhiên, sáu CDR có mặt trên mỗi kháng thể monome là các trình tự ngắn, không liên tục gồm các axit amin mà được bố trí đặc thù để tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên do kháng thể cho rằng là có cấu hình ba chiều trong môi trường nước. Phần còn lại của miền biến đổi nặng và nhẹ thể hiện ít có sự biến đổi giữa các phân tử trong trình tự axit amin và được đặt tên là vùng khung làm việc. Vùng khung làm việc phần lớn có cấu hình tấm β và CDR tạo thành vòng mà nối, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của, cấu trúc tấm β . Vì thế, các vùng khung làm việc này hoạt động để tạo thành khung tạo thành để định vị sáu CDR theo hướng chính xác bằng các tương tác phi cộng hóa trị giữa các chuỗi. Vị trí gắn kết kháng nguyên được thực hiện bởi các CDR được định vị này tạo thành sự bổ sung bề mặt với epitop trên kháng nguyên phản ứng miễn dịch. Bề mặt bổ sung này thúc đẩy việc gắn kết phi cộng hóa trị của kháng thể với epitop kháng nguyên phản ứng miễn dịch. Việc định vị các CDR có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

“Vùng hằng định” – như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng hằng định” để chỉ phần của phân tử kháng thể bên ngoài miền biến đổi hoặc vùng biến đổi. Các chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có một miền “vùng hằng định”, thường để chỉ miền “CL hoặc CL1”. Miền này nằm ở đầu tận C đến miền VL. Các chuỗi nặng globulin miễn dịch khác nhau trong vùng hằng định của chúng phụ thuộc vào lớp globulin miễn dịch (γ , μ , α , δ , ϵ). Các chuỗi nặng γ , α và δ có vùng hằng định biến đổi gồm có ba miền globulin miễn dịch (được gọi là CH1, CH2 và CH3) với vùng bản lề linh động tách các miền CH1 và CH2. Các chuỗi nặng μ and ϵ have a vùng biến đổi gồm có four domains (CH1-CH4). Miền hằng định của chuỗi nặng được nằm ở đầu tận C đến miền VH.

Việc đánh số axit amin trong các chuỗi globulin miễn dịch nặng và nhẹ từ đầu tận N ở các đầu chạc của cấu hình chữ Y đến đầu tận C ở phần dưới cùng của mỗi chuỗi. Các cách đánh số khác nhau được sử dụng để xác định miền hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch. Theo cách đánh số EU, miền hằng định chuỗi nặng của phân tử IgG được xác định như sau: CH1 – các gốc axit amin 118-215; CH2 – các gốc axit amin 231-340; CH3 – các gốc axit amin 341-446. Theo cách đánh số Kabat, miền hằng định chuỗi nặng của phân tử IgG được xác định như sau: CH1 – các gốc axit amin 114-223; CH2 – các gốc axit amin 244-360; CH3 – các gốc axit amin 361-477. “Vùng bản lề” bao gồm phần của phân tử chuỗi nặng mà nối miền CH1 với miền CH2. Vùng bản lề này bao gồm khoảng 25 gốc và linh động, vì thế cho phép hai vùng gắn kết kháng nguyên đầu tận N di chuyển độc lập. Các vùng bản lề có thể được chia thành ba miền riêng biệt: miền bản lề trên, giữa và dưới (Roux K.H. *et al.* J. Immunol. 161:4083-90 1998). Kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng bản lề “hoàn toàn của người” có thể chứa một trong các trình tự vùng bản lề được thể hiện trên bảng 2 dưới đây.

Bảng 2 Trình tự vùng bản lề của người

IgG	Bản lề trên	Bản lề giữa	Bản lề dưới
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:37)	CPPCP (SEQ ID NO:38)	APELLGGP (SEQ ID NO:39)

IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:40)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:41)	APELLGGP (SEQ ID NO:42)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:43)	CPSCP (SEQ ID NO:44)	APEFLGGP (SEQ ID NO:45)
IgG2	ERK (SEQ ID NO:46)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO:47)	APPVAGP (SEQ ID NO:48)

“Mảnh” – Thuật ngữ “mảnh”, khi được sử dụng trong ngữ cảnh về kháng thể của sáng chế, để chỉ phần hoặc bộ phận của kháng thể hoặc chuỗi kháng thể bao gồm gốc axit amin ít hơn kháng thể hoặc chuỗi kháng thể nguyên vẹn hoặc hoàn chỉnh. Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” để chỉ mảnh polypeptit của globulin miễn dịch hoặc kháng thể mà gắn kết kháng nguyên hoặc cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn (tức là, với kháng thể nguyên vẹn mà chúng có nguồn gốc từ đó) trong việc gắn kết kháng nguyên (tức là gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β). Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mảnh” của phân tử kháng thể bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, ví dụ, miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL), miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH), kháng thể chuỗi đơn (scFv), mảnh F(ab')₂, mảnh Fab, mảnh Fd, mảnh Fv, kháng thể một nhánh (đơn trị), các diabody, triabody, tetrabody hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên bất kỳ được tạo thành bằng cách tổ hợp, lắp ráp hoặc liên hợp các mảnh gắn kết kháng nguyên như vậy. Thuật ngữ “mảnh gắn kết kháng nguyên” như được sử dụng ở đây còn được dự định bao gồm các mảnh kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm các unibody, các kháng thể miền và các nanobody. Các mảnh có thể thu được, ví dụ bằng các xử lý hóa học hoặc enzym chỉnh kháng thể hoặc chuỗi kháng thể nguyên vẹn hoặc hoàn chỉnh hoặc bằng cách tái tổ hợp.

“Phép thế axit amin bảo toàn” - Phép thế axit amin bảo toàn là phép thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Các họ gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực này, bao gồm các mạch bên cơ bản (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các mạch bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin,

asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), các mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan), các mạch bên có nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Vì thế, gốc axit amin không thiết yếu trong polypeptit globulin miễn dịch có thể được thay thế bằng một gốc axit amin khác từ họ có cùng mạch bên. Theo một phương án khác, các chuỗi axit amin có thể được thay thế bằng chuỗi tương tự về mặt cấu trúc mà khác ở thứ tự và/hoặc thành phần các thành viên trong họ mạch bên.

“Khảm” – protein “khảm” bao gồm trình tự axit amin thứ nhất được liên kết với trình tự axit amin thứ hai mà bản chất nó không thể được liên kết trong tự nhiên. Các trình tự axit amin bình thường có thể tồn tại trong các protein riêng biệt mà được kết hợp với nhau trong polypeptit dung hợp hoặc chúng thường có thể tồn tại trong cùng một protein nhưng được đặt ở sự sắp xếp mới trong polypeptit dung hợp. Một protein khảm có thể được tạo ra, ví dụ, bằng tổng hợp hóa học, hoặc bằng cách tạo ra và dịch mã polynucleotit trong đó các vùng peptit được mã hóa trong mỗi quan hệ mong muốn. Kháng thể khảm được lấy làm ví dụ theo sáng chế bao gồm protein dung hợp bao gồm các miền VH hoặc VL có nguồn gốc từ lạc đà, hoặc các biến thể được làm giống của người của chúng, được dung hợp với miền hằng định của kháng thể người, ví dụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người.

“Hóa trị” - Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hóa trị" chỉ số vị trí gắn kết đích tiềm năng kết hợp trong polypeptit. Mỗi vị trí gắn kết đích gắn kết đặc hiệu một phân tử đích hoặc vị trí đặc hiệu trên phân tử đích. Khi polypeptit bao gồm nhiều hơn một vị trí gắn kết đích, thì mỗi vị trí gắn kết đích có thể gắn kết đặc hiệu với các phân tử giống hoặc khác nhau (ví dụ may gắn kết với các phối tử khác nhau hoặc các kháng nguyên khác nhau, hoặc các epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên).

“Tính đặc hiệu” – Thuật ngữ “tính đặc hiệu” để chỉ khả năng gắn kết (ví dụ phản ứng miễn dịch với) đích cho trước, ví dụ phức hợp GARP-TGF- β 1. Polypeptit có thể là đặc hiệu đơn và chứa một hoặc nhiều vị trí gắn kết mà gắn kết đặc hiệu với đích

hoặc polypeptit có thể là đa đặc hiệu và chứa hai hay nhiều vị trí gắn kết mà gắn kết đặc hiệu với các đích giống hoặc khác nhau.

“Tổng hợp” – như được sử dụng ở đây thuật ngữ “tổng hợp” với polypeptit bao gồm các polypeptit mà bao gồm trình tự axit amin mà không có trong tự nhiên. Ví dụ, polypeptit không có trong tự nhiên là các dạng cải biến của polypeptit có trong tự nhiên (ví dụ bao gồm đột biến như thêm, thay thế hoặc bớt) hoặc bao gồm trình tự axit amin thứ nhất (mà có thể hoặc không thể có trong tự nhiên) mà được liên kết trong trình tự tuyến tính của axit amin với trình tự axit amin thứ hai (mà có hoặc không thể có trong tự nhiên) mà về bản chất không được liên kết về mặt tự nhiên.

“Được thiết kế” – như được sử dụng ở đây thuật ngữ “được thiết kế” bao gồm việc thao tác với các phân tử axit nucleic hoặc polypeptit bằng cách tổng hợp (ví dụ bằng kỹ thuật tái tổ hợp, tổng hợp peptit *in vitro*, bằng cách ghép cặp nhờ enzym hoặc hóa chất các peptit hoặc một số tổ hợp của các kỹ thuật này). Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế là kháng thể được thiết kế, bao gồm ví dụ, được làm giống của người và/hoặc khảm, và kháng thể được thiết kế để cải thiện một hoặc nhiều tính chất, như khả năng gắn kết kháng nguyên, độ ổn định/thời gian bán thải hoặc chức năng tác động.

“Thay thế làm cho giống của người” – như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế làm cho giống của người” để chỉ việc thay thế axit amin trong đó gốc axit amin có mặt ở vị trí cụ thể trong miền VH hoặc VL của kháng thể (ví dụ kháng thể GARP-TGF- β 1 có nguồn gốc từ lạc đà) được thay thế bằng gốc axit amin mà có mặt ở vị trí tương đương trong miền VH hoặc miền VL tham chiếu của người. Miền VH hoặc VL tham chiếu của người có thể là miền VH hoặc VL được mã hóa bởi dòng mầm của người. Việc thay thế làm cho giống của người có thể được thực hiện trong vùng khung làm việc và/hoặc các CDR của kháng thể, có thể được thể hiện ở đây.

“Biến thể được làm giống của người” – như được sử dụng ở đây thuật ngữ “biến thể được làm giống của người” để chỉ kháng thể biến thể chứa một hoặc nhiều “phép thể làm cho giống của người” so với kháng thể tham chiếu, trong đó một phần của kháng thể tham chiếu (ví dụ miền VH và/hoặc miền VL hoặc các bộ phận của

chúng chứa ít nhất là một CDR) có axit amin có nguồn gốc từ loài không phải người, và “phép thể làm cho giống của người” xuất hiện trong trình tự axit amin có nguồn gốc từ các loài không phải người.

“Biến thể được tạo dòng mầm” – Thuật ngữ “biến thể được tạo dòng mầm” được sử dụng để chỉ cụ thể là “biến thể được làm giống của người” trong đó “phép thể làm cho giống của người” dẫn đến việc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin có mặt ở (các) vị trí cụ thể trong miền VH hoặc VL của kháng thể (ví dụ kháng thể GARP-TGF- β 1 có nguồn gốc từ lạc đà) với các gốc axit amin diễn ra ở vị trí tương đương trong miền VH hoặc VL tham chiếu của người được mã hóa bởi dòng mầm của người. Diễn hình là đối với “biến thể được tạo dòng mầm” cho trước bất kỳ, phép thể gốc axit amin được thể thành biến thể được tạo dòng mầm chỉ được lấy từ, hoặc chủ yếu là, từ miền VH hoặc VL đơn được mã hóa bởi dòng mầm của người. Các thuật ngữ “biến thể được làm giống của người” và “biến thể được tạo dòng mầm” thường được sử dụng đổi cho nhau. Việc đưa vào một hoặc nhiều “phép thể làm cho giống của người” vào miền VH hoặc VL có nguồn gốc từ lạc đà (ví dụ thu nguồn gốc từ lạc đà không bướu) dẫn đến việc tạo ra “biến thể được làm giống của người” của miền VH hoặc VL có nguồn gốc từ lạc đà (lạc đà không bướu). Nếu gốc axit amin được thể có nguồn gốc chủ yếu từ hoặc hoàn toàn từ trình tự miền VH hoặc VL đơn được mã hóa bởi dòng mầm của người, sau đó kết quả có thể là “biến thể được tạo dòng mầm của người” hoặc miền VH hoặc VL có nguồn gốc từ lạc đà (lạc đà không bướu).

“Biến thể ái lực” – như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể ái lực” để chỉ kháng thể biến thể thể hiện một hoặc nhiều sự thay đổi trong trình tự axit amin so với kháng thể tham chiếu, trong đó biến thể ái lực thể hiện ái lực được biến đổi đối với kháng nguyên đích khi so sánh với kháng thể tham chiếu. Ví dụ, biến thể ái lực sẽ thể hiện ái lực được thay đổi đối với GARP-TGF- β , khi được so sánh với kháng thể GARP-TGF- β tham chiếu. Tốt hơn là biến thể ái lực sẽ thể hiện ái lực được cải thiện đối với kháng nguyên đích, khi được so sánh với kháng thể tham chiếu. Biến thể ái lực thường thể hiện một hoặc nhiều sự thay đổi trong trình tự axit amin trong CDR, khi được so sánh với kháng thể tham chiếu. Phép thể như vậy có thể dẫn đến việc thay thế

axit amin ban đầu có mặt ở vị trí cho trước trong các CDR bằng một gốc axit amin khác, mà là gốc axit amin có trong tự nhiên hoặc gốc axit amin không có trong tự nhiên. Việc thế axit amin có thể là bảo toàn hoặc không bảo toàn.

B. Kháng thể GARP-TGF- β 1

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP và TGF- β 1, cụ thể là phức hợp GARP của người và TGF- β 1 của người. Kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được xác định bằng các đặc điểm cấu trúc và chức năng như được mô tả ở đây.

Quan trọng là kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế được cải tiến so với kháng thể GARP-TGF- β 1 được mô tả trước đó, vì lý do chúng biểu hiện độ ổn định cải thiện. Cụ thể, độ ổn định của kháng thể GARP-TGF- β 1 được mô tả ở đây được cải thiện so với kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể tham chiếu GARP-TGF- β 1 LHG-10 và LHG-10.6, được mô tả trong WO2015/015003 và WO2016/125017. Sự cải thiện và tính ổn định này đạt được mà không giảm đáng kể ái lực gắn kết của kháng thể đối với phức hợp GARP-TGF- β 1, khi được so sánh với kháng thể LHG10 và LHG10.6 tham chiếu.

Kháng thể theo sáng chế khác với kháng thể tham chiếu LHG-10 và LHG-10.6 GARP-TGF- β 1 được mô tả trước đó cụ thể là liên quan đến các trình tự của các trình tự CDR2 và CDR3 chuỗi nặng. Cụ thể hơn, các kháng thể GARP-TGF- β 1 LHG-10 và LHG-10.6 có trình tự CDR2 chuỗi nặng: RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 5) và trình tự CDR3 chuỗi nặng: NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 6), trong khi đó các kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự CDR2 chuỗi nặng: RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12) và trình tự CDR3 chuỗi nặng: YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13). Như được mô tả và được lấy làm ví dụ ở đây, việc thế axit amin G55A và N95Y trong các trình tự CDR2 và CDR3 chuỗi nặng, lần lượt, được phát hiện là cải thiện độ ổn định kháng thể bằng cách làm giảm sự khử amit, isome hóa và oxy hóa, đồng thời đạt được ái lực gắn kết đối với phức hợp GARP-TGF- β 1 xấp xỉ tương đương với ái lực của kháng thể tham chiếu.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1, và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) trong đó:

VH CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12), và

VH CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4).

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó còn bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

VL CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

VH CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

VH CDR3 gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án nhất định, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên là tái tổ hợp. Theo các phương án nhất định, kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên là đơn dòng.

Thuật ngữ "kháng thể" ở đây được sử dụng với nghĩa rộng nhất và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng (bao gồm kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ), kháng thể đa dòng, và kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ kháng thể đặc hiệu kép), miễn là chúng thể hiện tính đặc hiệu miễn dịch thích hợp đối với phức hợp GARP-TGF- β 1. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, quần thể gồm các kháng thể riêng rẽ giống hệt nhau ngoại trừ các thể đột biến xuất hiện trong tự nhiên có thể có mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, trực tiếp kháng lại một vị trí kháng nguyên đơn lẻ. Ngoài ra, ngược với các chế phẩm kháng thể (đa dòng) truyền thống, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng để chống lại các yếu tố quyết định (epitop) khác nhau trên kháng nguyên, mỗi kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại một yếu tố quyết định kháng nguyên hoặc epitop duy nhất.

Sáng chế cũng bao gồm "các mảnh gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, và các mảnh này cũng được định nghĩa trong bản mô tả này. Mảnh kháng thể thường bao

gồm một phần của kháng thể chiều dài đầy đủ, thường là miền gắn kết kháng nguyên hoặc miền biến đổi của chúng. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fab' đặc hiệu kép, và các mảnh Fv, kháng thể dạng thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn, mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv) và kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ mảnh kháng thể (xem Holliger and Hudson, *Nature Biotechnol.* 23:1126-36 (2005)).

Kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể thể hiện sự tương đồng cao với người. Mức tương đồng với trình tự của người có thể được đánh giá qua chiều dài của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và/hoặc qua chiều dài của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Trong phạm vi của sáng chế, kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có thể được coi là có sự tương đồng cao với người nếu các miền VH và các miền VL, khi xem xét cùng nhau, thể hiện độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 90%, ít nhất là 92%, ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 96% với các trình tự VH và VL dòng mầm của người trùng khớp gần nhất. Theo một phương án miền VH của kháng thể có sự tương đồng cao với người có thể thể hiện độ đồng nhất trình tự hoặc độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 90%, ít nhất là 92%, ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 96% với một hoặc nhiều miền Vh của người qua vùng khung làm việc FR1, FR2, FR3 và FR4. Theo một phương án miền VH của kháng thể có sự tương đồng cao với người có thể chứa một hoặc nhiều (ví dụ 1 đến 10) sự bất cặp nhằm trình tự axit amin qua vùng khung làm việc FR1, FR2, FR3 và FR4, khi so sánh với trình tự VH người trùng khớp gần nhất.

Theo một phương án khác, miền VL của kháng thể có sự tương đồng cao với người có thể thể hiện độ đồng nhất trình tự hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 92%, ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 96% với một hoặc nhiều miền VL của người qua vùng khung làm việc FR1, FR2, FR3 và FR4. Theo một phương án, miền VL của kháng thể có sự tương đồng cao với người có thể chứa một hoặc nhiều (ví dụ 1 đến 10) sự bất cặp nhằm trình tự axit amin qua vùng khung làm việc FR1, FR2, FR3 và FR4, khi so sánh với trình tự VL người trùng khớp gần nhất.

Kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có sự tương đồng cao với người có thể bao gồm kháng thể gồm các miền VH và VL của kháng thể không

phải của người nguyên bản mà thể hiện % độ đồng nhất trình tự đủ cao với trình tự dòng mầm của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là các biến thể được làm giống của người hoặc được tạo dòng mầm của kháng thể không phải của người, ví dụ kháng thể bao gồm các miền VH và VL của kháng thể thông thường từ lạc đà được thiết kế để thành các biến thể được làm giống của người, hoặc được tạo dòng mầm của kháng thể ban đầu.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và tùy ý miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến

đôi chuỗi nhẹ, miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự VH có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 14 và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự VL có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 15.

Đối với các phương án trong đó các miền của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được xác định bằng độ đồng nhất trình tự theo tỷ lệ % cụ thể với trình tự tham chiếu, các miền VH và/hoặc miền VL có thể giữ lại các trình tự CDR đồng nhất với các miền có mặt trong trình tự tham chiếu sao cho biến thể này chỉ có mặt trong vùng khung làm việc. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm các miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc các miền biến đổi chuỗi nhẹ được xác định là có tỷ lệ % độ đồng nhất đặc biệt với các SEQ ID NO: 14 và 15, tương ứng, sẽ có các trình tự CDR sau đây:

VH CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án không giới hạn, các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm các miền CH1 và/hoặc các miền CL (từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, tương ứng), trình tự axit amin là hoàn toàn hoặc về cơ bản hoàn toàn giống với của người. Khi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là kháng thể được dự định để sử dụng trong điều trị bệnh cho người, thông thường đối với vùng hằng định toàn vẹn của kháng thể, hoặc ít nhất là một phần của chúng, là có trình tự axit amin hoàn

toàn hoặc về cơ bản hoàn toàn giống với của người. Vì thế, một hoặc nhiều hoặc tổ hợp bất kỳ của miền CH1, vùng bản lề, miền CH2, miền CH3 và miền CL (và miền CH4 nếu có mặt) sẽ toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ của người về trình tự axit amin của nó.

Thuận lợi là miền CH1, vùng bản lề, miền CH2, miền CH3 và miền CL (và miền CH4 nếu có mặt) có thể đều có trình tự axit amin hoàn toàn hoặc về cơ bản là của người. Trong phạm vi của vùng hằng định của kháng thể được làm giống của người hoặc khảm, hoặc mảnh kháng thể, thuật ngữ "về cơ bản giống với người" để chỉ độ đồng nhất trình tự axit amin ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 99% với vùng hằng định của người. Thuật ngữ "trình tự axit amin của người" trong ngữ cảnh này để chỉ trình tự axit amin mà được mã hóa bằng gen globulin miễn dịch của người, mà bao gồm các gen dòng mầm, được sắp xếp lại và đột biến soma. Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit bao gồm miền hằng định của trình tự "của người" mà được biến đổi, bằng cách thêm, bớt hoặc thế một hoặc nhiều axit amin so với trình tự của người, ngoại trừ các phương án mà sự có mặt của vùng bản lề "hoàn toàn của người" được yêu cầu rõ ràng.

Sự có mặt của vùng bản lề "hoàn toàn của người" trong kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế có thể có lợi vừa giảm thiểu khả năng sinh miễn dịch vừa tối ưu hóa độ ổn định của kháng thể.

Như đã thảo luận ở đây, người ta được dự tính rằng một hoặc nhiều việc thế, gắn chen hoặc bớt axit amin có thể được thực hiện trong vùng hằng định của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, cụ thể là trong vùng Fc. Việc thế axit amin có thể dẫn đến việc thay thế axit amin được thế bằng một axit amin có trong tự nhiên khác, hoặc bằng một axit amin cải biến hoặc không có trong tự nhiên. Các cải biến về mặt cấu trúc khác cũng được phép, như ví dụ thay đổi trong kiểu glycosyl hóa (ví dụ bằng cách thêm hoặc bớt các vị trí glycosyl hóa được liên kết N- hoặc O-).

Kháng thể GARP-TGF- β 1 có thể được cải biến trong vùng Fc để tăng ái lực gắn kết đối với thụ thể FcRn mới tạo ra. Việc ái lực gắn kết tăng có thể được xác định ở độ pH axit (ví dụ từ khoảng độ pH=5,5 đến khoảng độ pH=6,0). Việc ái lực gắn kết

tăng cũng có thể được xác định ở độ pH trung tính (ví dụ từ khoảng pH=6,9 đến khoảng pH=7,4). Thuật ngữ “ái lực gắn kết tăng” có nghĩa là ái lực gắn kết tăng với FcRn so với vùng Fc không cải biến. Thông thường, vùng Fc không cải biến sẽ có trình tự axit amin kiểu đại của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 người. Theo các phương án này, ái lực gắn kết FcRn tăng của phân tử kháng thể có vùng Fc cải biến sẽ được xác định liên quan đến ái lực gắn kết của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 kiểu đại đối với FcRn.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc axit amin trong vùng Fc có thể được thế bằng một axit amin khác để tăng khả năng gắn kết với FcRn. Một vài việc thế Fc đã được thông báo là làm tăng khả năng gắn kết với FcRn và vì thế cải thiện được động học của kháng thể. Các việc thế này được thông báo trong, ví dụ, Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28(2):157-9; Hinton et al. (2006) *J Immunol.* 176:346-356; Yeung et al. (2009) *J Immunol.* 182:7663-7671; Presta LG. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460-470; and Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(10):1283-88, nội dung của chúng được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo các phương án nhất định, kháng thể GARP-TGF- β 1 bao gồm miền IgG Fc người được cải biến bao gồm hoặc gồm có phép thế axit amin H433K và N434F, trong đó cách đánh số miền Fc là theo cách đánh số EU. Theo một phương án khác, kháng thể GARP-TGF- β 1 được mô tả ở đây bao gồm miền IgG Fc người được cải biến bao gồm hoặc gồm có các thay thế axit amin M252Y, S254T, T256E, H433K và N434F, trong đó cách đánh số miền Fc là theo cách đánh số EU.

Theo các phương án nhất định, kháng thể GARP-TGF- β 1 bao gồm miền IgG Fc của người được cải biến gồm có lên đến 2, lên đến 3, lên đến 4, lên đến 5, lên đến 6, lên đến 7, lên đến 8, lên đến 9, lên đến 10, lên đến 12, lên đến 15, lên đến 20 phép thế so với trình tự IgG kiểu đại tương ứng.

Phụ thuộc vào mục đích sử dụng kháng thể, mong muốn cải biến kháng thể theo sáng chế liên quan đến đặc tính chất gắn kết của nó với các thụ thể Fc, ví dụ để điều biến chức năng chức năng tác động. Ví dụ (các) gốc xystein có thể được đưa vào vùng Fc, nhờ đó cho phép tạo thành liên kết disulfua liên chuỗi trong vùng này. Vì thế

kháng thể homodime được tạo ra có khả năng nội nhập hóa được cải thiện và/hoặc khả năng tiêu diệt tế bào qua trung gian bổ thể và khả năng gây độc tế bào bởi tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) tăng. Xem Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191 -1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả ở đây được liên hợp với tác nhân gây độc tế bào như tác nhân hóa trị liệu, toxin (ví dụ độc tố có hoạt tính enzym của vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc chất đồng vị phóng xạ (tức là thể liên hợp phóng xạ). Các vùng Fc cũng có thể được thiết kế để kéo dài thời gian bán thải, như được mô tả bởi Chan and Carter, Nature Reviews: Immunology, Vol,10, pp301-316, 2010, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án khác, vùng Fc được cải biến để làm tăng khả năng của kháng thể trong việc điều tiết khả năng gây độc tế bào qua tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc tăng ái lực của kháng thể đối với thụ thể Fcγ bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin.

Cụ thể các phương án, vùng Fc có thể được thiết kế sao cho không có chức năng tác động. Kháng thể GARP-TGF-β1 không có Fc chức năng tác động có thể đặc biệt hữu dụng làm tác nhân phong bế thụ thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể có vùng Fc có nguồn gốc từ isotyp IgG có trong tự nhiên có chức năng tác động giảm, ví dụ IgG4. Các vùng Fc có nguồn gốc từ IgG4 có thể được cải biến thêm để tăng khả năng trị liệu, ví dụ bằng cách đưa vào các cải biến mà làm giảm thiểu sự trao đổi các cánh tay giữa các phân tử IgG4 *in vivo*. Các vùng Fc có nguồn gốc từ IgG4 có thể được cải biến để bao gồm sự thay thế S228P.

Theo các phương án khác nữa, quá trình glycosyl hóa kháng thể được cải biến. Ví dụ, kháng thể được aglycosyl hóa có thể được thực hiện (tức là kháng thể không có sự glycosyl hóa). Quá trình glycosyl hóa có thể được thay đổi, ví dụ, để gia tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên đích. Các cải biến hydrat cacbon như vậy có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều phép thế axit amin có thể được thực hiện, dẫn đến việc loại ra một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa khung làm việc trong vùng biến

đổi, bằng cách đó hạn chế sự glycosyl hóa ở vị trí đó. Việc không glycosyl hóa như vậy có thể làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Cũng được dự định là kháng thể biến thể GARP-TGF- β 1 có kiểu glycosyl hóa biến đổi, như kháng thể được hypofucosyl hóa có lượng gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể được khử fucosyl hoàn toàn hoặc một phần (như được mô tả bởi Natsume et al., *Drug Design Development and Therapy*, Vol.3, pp7-16, 2009) hoặc kháng thể có các cấu trúc GlcNac phân giác tăng. Các kiểu glycosyl hóa được thay đổi chứng tỏ được việc tăng hoạt tính ADCC của kháng thể, tạo ra sự tăng cường ADCC thường là 10 lần so với kháng thể tương đương bao gồm miền Fc của người nguyên bản. Các cải biến hydrat cacbon như vậy có thể được thực hiện bằng, ví dụ, biểu hiện kháng thể ở tế bào chủ bằng phương pháp enzym glycosyl hóa được thay đổi (như được mô tả bởi Yamane-Ohnuki and Satoh, *mAbs* 1:3, 230-236, 2009). Các ví dụ về kháng thể không fucosyl hóa với chức năng ADCC tăng cường là các kháng thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật Potelligent® của BioWa Inc.

Kháng thể được dự định để sử dụng trong điều trị bệnh cho người sẽ thường là loại IgG, IgM, IgA, IgD, hoặc IgE, thường là loại IgG, trong đó trường hợp chúng có thể thuộc về bất kỳ trong số bốn phân lớp IgG1, IgG2a và b, IgG3 hoặc IgG4. Trong mỗi một trong số các phân lớp này nó được phép thực hiện một hoặc nhiều phép thế, gắn chèn hoặc bớt axit amin trong phần Fc, hoặc thực hiện các cải biến về mặt cấu trúc khác, ví dụ để tăng cường hoặc giảm các chức năng phụ thuộc Fc.

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết đặc hiệu GARP-TGF- β 1 bao gồm ít nhất là một chuỗi nặng globulin miễn dịch chiều dài đầy đủ và/hoặc ít nhất là một chuỗi nhẹ lambda hoặc kappa chiều dài đầy đủ, trong đó chuỗi nặng bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO:17.

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết đặc hiệu GARP-TGF- β 1 bao gồm ít nhất là một chuỗi nặng globulin miễn dịch chiều dài đầy đủ và/hoặc ít nhất là một chuỗi nhẹ lambda hoặc kappa chiều dài đầy đủ, trong đó chuỗi nặng bao gồm

trình tự axit amin SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:17.

Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết đặc hiệu GARP-TGF- β 1 bao gồm ít nhất là một chuỗi nặng globulin miễn dịch chiều dài đầy đủ và/hoặc ít nhất là một chuỗi nhẹ lambda hoặc kappa chiều dài đầy đủ, trong đó chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:17.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO:16, và/hoặc chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO:17.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nặng với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 16. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nhẹ với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 17. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin như được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO:16, và chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO:17.

Đối với các phương án trong đó các chuỗi của kháng thể được xác định bằng độ đồng nhất trình tự theo tỷ lệ % cụ thể với trình tự tham chiếu, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể giữ lại trình tự CDR đồng nhất với chúng có mặt trong trình tự tham chiếu sao cho biến thể này chỉ có mặt trong các vùng CDR. Cụ thể, các kháng thể hoặc

mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được xác định là có tỷ lệ % độ đồng nhất cụ thể với các SEQ ID NO: 16 và 17, tương ứng, có thể có các trình tự CDR sau đây:

VH CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11), và

trình tự VL CDR2 bao gồm hoặc gồm có SEQ ID NO: 10 [GASRLKT] và

VL CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Gắn kết với GARP-TGF- β 1

Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1, cụ thể là phức hợp GARP của người và TGF- β 1 của người. Như đã giải thích ở đây, GARP là protein xuyên màng được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T điều hòa và hoạt động như thụ thể đối với dạng tiềm tàng của TGF- β . Fig. 1 bao gồm sự thể hiện bằng sơ đồ về phức hợp tạo thành giữa GARP và TGF- β tiềm tàng ở bề mặt tế bào của tế bào T điều hòa.

Phức hợp GARP-TGF- β 1 mà kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của sáng chế gắn kết là phức hợp GARP-TGF- β 1 nguyên bản tạo ra ở bề mặt tế bào giữa GARP và TGF- β 1.

Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ chúng gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1 nhưng không gắn kết với GARP khi vắng mặt TGF- β 1 hoặc TGF- β tiềm tàng. Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với GARP chỉ khi có mặt TGF- β 1. Cụ thể, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với GARP chỉ khi có mặt TGF- β 1 tiềm tàng. Các kháng

thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể phong bế hoặc ức chế sự giải phóng TGF- β hoạt tính từ các tế bào Treg.

Do kháng nguyên đích đối với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là phức hợp bao gồm hai protein riêng rẽ, epitop mà kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn vào là epitop cấu hình trái ngược với epitop tuyến tính. Epitop cấu hình bao gồm ít nhất là một gốc từ GARP và ít nhất là một gốc từ TGF- β 1 tiềm tàng. Theo các phương án ưu tiên, epitop cấu hình bao gồm ít nhất là một gốc từ GARP, ít nhất là một gốc từ peptit liên quan đến trạng thái tiềm tàng (LAP) của TGF- β 1 tiềm tàng và ít nhất là một gốc từ TGF- β 1 trưởng thành.

Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể gắn kết với epitop của phức hợp được tạo thành bởi GARP của người và TGF- β 1 của người trong đó epitop bao gồm ít nhất là một gốc từ GARP được chọn từ Y137, S138, G139, T162 và R163 (tham chiếu đến SEQ ID NO: 33), và ít nhất là một gốc từ TGF- β 1. Theo các phương án ưu tiên, epitop bao gồm ít nhất là gốc Y137, S138, G139, T162 và R163 của GARP (tham chiếu đến SEQ ID NO:33).

Epitop có thể bao gồm ít nhất là một gốc từ polypeptit TGF- β 1 (SEQ ID NO: 34), tùy ý trong đó ít nhất là một gốc là K338. Epitop có thể bao gồm ít nhất là một gốc từ peptit liên quan đến trạng thái tiềm tàng (LAP) của TGF- β 1 và ít nhất là một gốc từ TGF- β 1 trưởng thành. Epitop có thể bao gồm R58 của LAP và K338 của TGF- β 1 trưởng thành (tham chiếu đến SEQ ID NO: 34).

Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1. Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể còn gắn kết với phức hợp GARP của người và TGF- β 2 người và/hoặc phức hợp GARP của người và TGF- β 3 người.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1 bằng ái lực cao. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ái lực” hoặc “ái lực gắn kết” nên được hiểu dựa trên nghĩa thông thường trong lĩnh vực này trong ngữ cảnh gắn kết kháng thể, và phản ánh độ bền

và/hoặc độ ổn định cả gắn kết giữa kháng nguyên và vị trí gắn kết trên kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Ái lực gắn kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó đối với kháng nguyên tương ứng của nó có thể được xác định bằng thực nghiệm bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các thiết bị SPR như Biacore™ đo ái lực dựa trên việc cố định protein hoặc kháng nguyên đích trên chip cảm biến sinh học trong khi kháng thể hoặc mảnh kháng thể được đi qua đích cố định trong các điều kiện dòng chảy cụ thể. Các thử nghiệm này thu được các giá trị đo k_{on} và k_{off} , mà có thể được chuyển thành các giá trị K_D , trong đó K_D là hằng số cân bằng đối với sự phân ly của kháng nguyên với kháng thể hoặc mảnh của nó. Giá trị K_D càng nhỏ, tương tác gắn kết giữa kháng thể và kháng nguyên đích của nó càng mạnh.

Như đã nêu trên, ái lực của kháng thể có thể được xác định bằng Biacore™ hoặc SPR, ví dụ sử dụng quy trình như được mô tả trong tài liệu này. Ái lực của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên đối với phức hợp GARP-TGF- β 1, như được xác định bằng Biacore™ hoặc SPR, có thể được xác định bằng cách sử dụng phức hợp GARP-TGF- β 1 được biểu hiện tái tổ hợp, như được mô tả ví dụ, trong Ví dụ 2.

Kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể thể hiện tốc độ phân ly (k_{off}) đối với phức hợp GARP-TGF- β 1 nhỏ hơn 7×10^{-4} giây⁻¹, nhỏ hơn 5×10^{-4} giây⁻¹, nhỏ hơn 3×10^{-4} giây⁻¹, nhỏ hơn $1,5 \times 10^{-4}$ giây⁻¹ khi được thử nghiệm dưới dạng Fab. Kháng thể GARP-TGF- β hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể thể hiện tốc độ phân ly (k_{off}) đối với phức hợp GARP-TGF- β 1 trong khoảng từ 1×10^{-6} giây⁻¹ đến 5×10^{-4} giây⁻¹, tốt hơn là trong khoảng từ 1×10^{-6} giây⁻¹ đến 3×10^{-4} giây⁻¹, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1×10^{-5} giây⁻¹ đến $1,5 \times 10^{-4}$ giây⁻¹.

Kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế có thể thể hiện giá trị K_D nhỏ hơn 5×10^{-9} M, nhỏ hơn 2×10^{-9} M. Trong các phương án được ưu tiên, kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế thể hiện giá trị K_D nhỏ hơn $1,7 \times 10^{-9}$ M.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được mô tả ở đây gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1 có thể phản ứng chéo với một hoặc nhiều thể tương tự loài của GARP và TGF- β , ví dụ các thể tương tự GARP và TGF- β có nguồn gốc linh trưởng không phải người.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế không phản ứng chéo với phức hợp GARP và TGF- β có nguồn gốc từ chuột. Theo một phương án khác hoặc ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β có nguồn gốc từ linh trưởng không phải người, cụ thể là phức hợp GARP-TGF- β có nguồn gốc từ khỉ cynomolgus. Hoạt tính phản ứng chéo với các thể tương tự của loài khác có thể đặc biệt có lợi trong việc phát triển và thử nghiệm các kháng thể trị liệu. Ví dụ, thử nghiệm độc tính tiền lâm sàng của các kháng thể trị liệu thường được thực hiện ở các loài linh trưởng bao gồm nhưng không giới hạn ở khỉ cynomolgus. Hoạt tính phản ứng chéo với các thể tương tự loài này vì thế có thể đặc biệt có lợi đối với sự phát triển của kháng thể làm các đối tượng thử nghiệm lâm sàng.

Độ ổn định được cải thiện

Kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế được cải tiến so với kháng thể GARP-TGF- β 1 được mô tả trước đó, vì lý do chúng biểu hiện độ ổn định cải thiện. Cụ thể, độ ổn định của kháng thể GARP-TGF- β 1 được cải thiện so với kháng thể có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể tham chiếu GARP-TGF- β 1 LHG10.6, được mô tả trong WO2015/015003 và WO2016/125017.

Kháng thể GARP-TGF- β LHG10.6 có tổ hợp của các trình tự CDR miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ sau đây:

CDR3 chuỗi nặng gồm có NEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 6),

CDR2 chuỗi nặng gồm có RIDPEDGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 5),

CDR1 chuỗi nặng gồm có SYYID (SEQ ID NO: 4),

CDR3 chuỗi nhẹ gồm có QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

CDR2 chuỗi nhẹ gồm có GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

CDR1 chuỗi nhẹ gồm có QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Như được thông báo ở đây, người ta đã phát hiện ra rằng kháng thể GARP-TGF- β 1 có các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của LHG10.6 thiếu độ ổn định. Cụ thể, các biến thể kháng thể đơn dòng được tạo dòng mầm của LHG10.6 (ở đây được gọi là mAb 39B6 IgG4 và 39B6 IgG1) được phát hiện là thể hiện xu hướng là hoạt tính gắn kết với đích thấp hơn khi được bảo quản ở 37°C trong cả PBS và PBS/Tween (xem ví dụ, Fig. 2). Độ không ổn định này được cho là ít nhất một phần là do việc isome hóa và khử amit ở vị trí N95 của HCDR3, tức là gốc thứ nhất của CDR3 chuỗi nặng.

Kháng thể GARP-TGF- β 1 và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế khác nhau về các trình tự CDR của chúng, cụ thể là các trình tự CDR chuỗi nặng, sao cho độ ổn định của chúng được cải thiện. Cụ thể, các trình tự CDR2 chuỗi nặng (HCDR2 hoặc VH CDR2) được cải biến để bao gồm việc thế G55A, sao cho trình tự HCDR2 của kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR2 được biểu diễn bằng RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12). Ngoài ra, trình tự CDR3 chuỗi nặng (HCDR3 hoặc VH CDR3) được cải biến để bao gồm việc thế N95Y, sao cho trình tự HCDR3 của kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR3 được biểu diễn bằng YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13). Kháng thể theo sáng chế không trải qua quá trình khử amit hoặc isome hóa. Ngoài ra, người ta đã bất ngờ phát hiện ra rằng kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế tương đối chống chịu với sự oxy hóa. Độ bền với việc khử amit, isome hóa và oxy hóa tương quan với tính ổn định được cải thiện của kháng thể của sáng chế, đặc biệt là tính ổn định được cải thiện khi được xác định ở nhiệt độ 37 °C.

Hơn nữa, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có ưu điểm bất ngờ do việc cải biến các trình tự CDR2 và CDR3 chuỗi nặng, khi được so sánh với kháng thể tham chiếu LHG10.6, không làm giảm đáng kể hoạt tính gắn kết với đích. Như được lấy làm ví dụ ở đây, kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế khá ổn định ở nhiệt độ 37 °C và không thể hiện việc giảm ái lực gắn kết một cách đáng kể đối với phức hợp GARP-TGF- β 1 khi được so sánh với kháng thể tham chiếu LHG10.6 hoặc

biến thể được tạo dòng mầm của chúng (39B6). Như được mô tả ở đây, trong các phương án ưu tiên, kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế thể hiện giá trị K_D nhỏ hơn $1,7 \times 10^{-9}$ M.

Như được thông báo ở đây, không phải tất cả việc thể ở vị trí N95 của HCDR3 mà loại bỏ gốc Asn (N) có khả năng cải thiện kháng thể độ ổn định trong khi đồng thời giữ ái lực gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1. Biến thể kháng thể đơn dòng được tạo dòng mầm có sự thể N95V (được gọi là 39B6-AVE) được phát hiện là bền với việc khử amit và isome hóa, nhưng trải qua sự oxy hóa đáng kể khi lưu giữ trong 28 ngày ở 37 °C. Hoạt tính gắn kết của biến thể kháng thể N95V cũng được phát hiện là giảm đáng kể trong khoảng thời gian lưu trữ 56 ngày ở 37 °C. Các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện ra rằng các thay thế lớn ở vị trí liền kề 96 trong chuỗi nặng (tức là gốc thứ hai của HCDR3) không thể cải thiện độ ổn định và giữ hoạt tính gắn kết kháng nguyên ái lực cao. Như được lấy làm ví dụ ở đây, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm hai biến thể kháng thể đơn dòng được tạo dòng mầm bao gồm các phép thế E96K và E96R trong miền HCDR3. Biến thể E96K (được gọi là 39B6-ANK) không trải qua quá trình oxy hóa, nhưng diễn ra sự khử amit và isome hóa trong thời gian 28 ngày ở 37 °C và trải qua sự giảm đáng kể hoạt tính gắn kết trong khoảng thời gian 56 ngày. Biến thể E96R (ở đây được gọi là 39B6-ANR) trải qua quá trình oxy hóa và khử amit đáng kể trong khoảng thời gian 28 ngày ở 37 °C và trải qua quá trình giảm hoạt tính gắn kết trong khoảng thời gian 56 ngày.

Theo các phương án ưu tiên của sáng chế, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó

VH CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),
 VL CDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và
 VL CDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án ưu tiên của sáng chế, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó

VH CDR3 bao gồm trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 bao gồm trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 bao gồm trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Theo các phương án ưu tiên của sáng chế, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất là một miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó

VH CDR3 gồm có trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 gồm có trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12),

VH CDR1 gồm có trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4),

VL CDR3 gồm có trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 gồm có trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 gồm có trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

Các kháng thể này tốt hơn là có giá trị K_D nhỏ hơn $1,7 \times 10^{-9}$ M.

Theo các phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và tùy ý miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án ưu tiên khác của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm chuỗi nặng bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 16 và tùy ý chuỗi nhẹ bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 17.

Theo các phương án ưu tiên khác của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 17.

Theo các phương án ưu tiên khác của sáng chế, kháng thể gắn kết đặc hiệu với phức hợp GARP-TGF- β 1 và thể hiện tính ổn định được cải thiện bao gồm chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin SEQ ID NO: 17.

Polynucleotit mã hóa kháng thể GARP-TGF- β

Sáng chế cũng đề cập đến các phân tử polynucleotit bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit mã hóa kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên

theo sáng chế, vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit này của sáng chế liên kết hoạt động với trình tự điều hòa mà cho phép biểu hiện kháng thể hoặc mảnh của chúng trong hệ biểu hiện tế bào chủ hoặc phi tế bào, và tế bào chủ hoặc hệ biểu hiện phi tế bào chứa vector biểu hiện này.

Theo các phương án nhất định, miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được mã hóa bằng cách trình tự polynucleotit thứ nhất và thứ hai, trong đó trình tự polynucleotit thứ nhất và thứ hai này bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 18 và 19, tương ứng. Theo các phương án nhất định, các polynucleotit mã hóa kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự biến thể mã hóa các miền VH hoặc VL chức năng của kháng thể GARP-TGF- β 1. Các trình tự biến thể mã hóa các miền VH có thể thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% khi tùy ý được sắp thẳng hàng với SEQ ID NO: 18, và các trình tự biến thể mã hóa các miền VL có thể thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% khi tùy ý được sắp thẳng hàng với SEQ ID NO: 19.

Theo các phương án nhất định, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được mã hóa bằng các trình tự polynucleotit thứ nhất và thứ hai, trong đó các trình tự polynucleotit thứ nhất và thứ hai này bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID NO: 20 và 21, tương ứng. Theo các phương án nhất định, các polynucleotit mã hóa kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự biến thể mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể GARP-TGF- β 1. Các trình tự biến thể mã hóa chuỗi nặng có thể thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% khi tùy ý được sắp thẳng hàng với SEQ ID NO: 20, và các trình tự biến thể mã hóa chuỗi nhẹ có thể thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% khi tùy ý được sắp thẳng hàng với SEQ ID NO: 21.

Trong ngữ cảnh này, % độ đồng nhất trình tự giữa hai trình tự polynucleotit có thể được xác định bằng cách so sánh hai trình tự này được sắp thẳng hàng theo cách tối ưu và trong đó trình tự polynucleotit được so sánh có thể có thể bao gồm việc thêm

hoặc bớt so với trình tự tham chiếu để việc sắp thẳng hàng tối ưu giữa hai trình tự này. Tỷ lệ % độ đồng nhất được tính bằng cách xác định số lượng vị trí đồng nhất trong đó gốc nucleotit là đồng nhất giữa hai trình tự, bằng cách chia số vị trí đồng nhất cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh và nhân kết quả thu được với 100 để thu được tỷ lệ % độ đồng nhất giữa hai trình tự này. Ví dụ, có thể sử dụng chương trình BLAST, "trình tự BLAST 2" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) sẵn có trên ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2, các thông số được sử dụng là các thông số cho trước mặc định (cụ thể đối với các thông số "điểm phạt khoảng trống mở": 5, và "điểm phạt khoảng trống trống mở rộng": 2; ma trận được chọn là, ví dụ, ma trận "BLOSUM 62" được đề xuất bởi chương trình), tỷ lệ % của độ đồng nhất giữa hai trình tự được so sánh được tính trực tiếp bằng chương trình.

Các phân tử polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế bao gồm, ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp. Các thuật ngữ "axit nucleic", "polynucleotit" hoặc "phân tử polynucleotit" như được sử dụng ở đây có thể đổi cho nhau và để chỉ phân tử ADN hoặc ARN bất kỳ, mạch đơn hoặc kép và, nếu là mạch đơn, phân tử của trình tự bổ sung của nó. Khi thảo luận về phân tử axit nucleic, trình tự hoặc cấu trúc của phân tử axit nucleic cụ thể có thể được mô tả ở đây theo quy ước thông thường của việc tạo ra trình tự theo hướng 5' đến 3'. Theo một số phương án của sáng chế, các axit nucleic hoặc polynucleotit là "được phân lập". Thuật ngữ này, khi được sử dụng cho phân tử axit nucleic, để chỉ phân tử axit nucleic mà được tách ra từ các trình tự mà nó liên kết trong hệ gen có trong tự nhiên của sinh vật trong đó nó có nguồn gốc từ đó. Ví dụ, "axit nucleic phân lập" có thể bao gồm phân tử ADN được chèn vào trong vectơ, như plasmit hoặc vectơ virus, hoặc được tích hợp vào ADN bộ gen của tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn hoặc sinh vật chủ không phải người. Khi được sử dụng cho ARN, thuật ngữ "polynucleotit phân lập" chủ yếu để chỉ phân tử ARN được mã hóa bằng phân tử ADN phân lập như được định nghĩa ở trên. Theo cách khác, thuật ngữ này có thể chỉ phân tử ARN mà được tinh chế/tách từ các axit nucleic khác mà nó sẽ được đi kèm trong trạng thái tự nhiên của nó (tức là trong tế bào hoặc mô). Polynucleotit phân lập (ADN hoặc ARN) có thể còn là phân tử được trực tiếp tạo ra bằng phương pháp sinh

học hoặc tổng hợp và được tách khỏi các thành phần khác có mặt trong quá trình sản xuất nó.

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể theo sáng chế, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa nó có thể được tạo ra (bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn) và được chèn vào trong vector có khả năng sao chép hoặc để biểu hiện trong tế bào chủ được chọn hoặc hệ biểu hiện phi tế bào. Các tế bào chủ thích hợp có thể là sinh vật nhân sơ, nấm men, hoặc sinh vật nhân chuẩn bậc cao đặc biệt là tế bào động vật có vú. Ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu dụng là dòng tế bào thận khỉ CV1 được biến nạp SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293 được tách dòng phụ để nuôi trong môi trường nuôi cấy huyền phù, Graham và các đồng tác giả, *J. Gen Virol. Virol.* 36:59 (1977)); tế bào thận chuột con hamster (BHK, ATCC CCL 10); tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); tế bào sertoli chuột (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); tế bào u tủy xương chuột SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) hoặc NS0 (bộ sưu tập chủng HPA số 85110503); tế bào thận khỉ (CV1 ATCC CCL 70); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587); tế bào caxinom cổ tử cung ở người (HELA, ATCC CCL 2); tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34); tế bào gan chuột buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); tế bào phổi người (W138, ATCC CCL 75); tế bào gan người (Hep G2, HB 8065); khối u vú chuột (MMT 060562, ATCC CCL51); tế bào TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); tế bào MRC 5; tế bào FS4; và dòng tế bào ung thư gan người (Hep G2), cũng như dòng tế bào PERC-6 của DSM. Vector biểu hiện thích hợp để sử dụng trong mỗi một trong số các tế bào chủ này thường đã được biết đến trong lĩnh vực.

Nên lưu ý rằng thuật ngữ "tế bào chủ" thường để chỉ dòng tế bào được nuôi cấy. Trong khi con người trong đó vector biểu hiện mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được đưa vào rõ ràng được loại trừ khỏi định nghĩa về "tế bào chủ".

Sản xuất kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể theo sáng chế mà bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ (hoặc hệ biểu hiện phi tế bào) chứa một hoặc nhiều polynucleotit (ví dụ vector biểu hiện) mã hóa kháng thể trong các điều kiện cho phép biểu hiện kháng thể, và thu hồi kháng thể được biểu hiện. Quy trình biểu hiện tái tổ hợp này có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể trên quy mô lớn, bao gồm kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế, bao gồm kháng thể đơn dòng được dự định để chữa bệnh cho người. Các vector, dòng tế bào và quy trình sản xuất thích hợp để sản xuất kháng thể tái tổ hợp trên quy mô lớn thích hợp để sử dụng trong điều trị bệnh *in vivo* thường sẵn có trong lĩnh vực này và được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Dược phẩm

Phạm vi của sáng chế bao gồm dược phẩm chứa một hoặc tổ hợp của kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, được bào chế với một hoặc nhiều chất mang hoặc tá dược được dụng. Các dược phẩm này có thể bao gồm một hoặc tổ hợp của các kháng thể (ví dụ hai hay nhiều khác nhau) GARP-TGF- β 1. Các kỹ thuật bào chế kháng thể đơn dòng để sử dụng trong điều trị bệnh cho người cũng được biết rõ trong lĩnh vực này và được xem trong, ví dụ, Wang *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp1-26, 2007, nội dung của chúng được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm được bào chế để dùng cho đối tượng qua đường dùng thích hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng, dưới da, trên màng cứng, mũi, miệng, trực tràng, khu trú, xông hít, trong miệng (ví dụ dưới lưỡi), và qua da.

Tá dược được dụng có thể được sử dụng trong các dược phẩm này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất trao đổi ion, nhôm oxit, nhôm stearat, lexithin, protein huyết thanh, như albumin huyết thanh người, các chất đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, hỗn hợp glyxerit một phần của axit béo thực vật bão hòa, nước, muối hoặc chất điện phân, như protamin sulfat, dinatri hydro phosphat, kali

hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, silic oxit dạng keo, magie trisilicat, polyvinyl pyrolidon, chất gốc xenluloza, polyetylen glycol, xyclodextrin, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, polyetylen-polyoxypropylen-polyme khối, polyetylen glycol và mỡ cừu.

Sử dụng kháng thể GARP-TGF- β 1 trong điều trị bệnh

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị, trong đó đối tượng có nhu cầu được dùng lượng có tác dụng điều trị bệnh của kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị, trong đó đối tượng là người có nhu cầu được dùng lượng có tác dụng điều trị bệnh của kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp GARP và TGF- β 1 của người, để dùng làm thuốc.

Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β trên tế bào T điều hòa và có thể phong bế hoặc ức chế sự sản xuất hoặc giải phóng TGF- β hoạt tính. Vì thế, theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng có hoặc dễ bị các rối loạn liên quan đến TGF- β . Các phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng có nhu cầu một lượng có tác dụng điều trị bệnh của kháng thể GARP-TGF- β 1 theo sáng chế.

Các rối loạn liên quan đến TGF- β được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh viêm, lây nhiễm mạn tính, ung thư, chứng xơ hóa, mệnh tim mạch, bệnh mạch máu não (ví dụ đột quy thiếu máu cục bộ), và bệnh thoái hóa thần kinh. Theo các phương án nhất định, rối loạn liên quan đến TGF- β là lây nhiễm mạn tính. Theo các phương án nhất định, rối loạn liên quan đến TGF- β là ung thư.

Để sử dụng trong việc dùng cho đối tượng, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được bào chế thành dược phẩm. Các dược phẩm này có thể được dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, bằng cách xông hít, khu trú, trong trực tràng, trong mũi, trong má, trong âm đạo hoặc dạng viên cấy. Thuật ngữ

“dùng” như được sử dụng ở đây bao gồm nhưng không giới hạn các kỹ thuật tiêm hoặc truyền dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, trong khớp, trong bao hoạt dịch, trong xương ức, trong não tủy, trong gan, trong vùng thương tổn, trong khối u, và trong sọ.

Dạng tiêm vô trùng của dược phẩm có thể ở dạng hỗn dịch trong nước hoặc dầu. Các hỗn dịch này có thể được bào chế theo kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng tác nhân phân tán hoặc thẩm ướt và tác nhân tạo huyền phù thích hợp. Chế phẩm vô trùng tiêm được cũng có thể là dung dịch hoặc hỗn dịch vô trùng tiêm được trong chất pha loãng hoặc dung môi không độc, sử dụng được theo đường ngoài tiêu hóa. Trong số các chất dẫn thuốc và dung môi chấp nhận được mà có thể được sử dụng là nước, dung dịch Ringer và dung dịch natri clorua đẳng trương. Ngoài ra, các dầu cố định vô khuẩn thông thường được sử dụng làm dung môi hoặc môi trường huyền phù hóa. Nhằm mục đích này, dầu ôn hòa, cố định bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm các mono hoặc diglyxerit tổng hợp. Axit béo, như axit oleic và các dẫn xuất glyxerit của nó là hữu ích trong việc bào chế chế phẩm tiêm, như các dầu được dùng tự nhiên, như dầu oliu hoặc dầu thầu dầu, đặc biệt ở dạng polyoxyetyl hóa của chúng. Các dung dịch hoặc hỗn dịch trong dầu này có thể còn chứa chất pha loãng hoặc chất phân tán trong rượu mạch dài, như carboxymetyl xenluloza hoặc các tác nhân phân tán tương tự thường được sử dụng trong quá trình bào chế các dạng liều được dùng bao gồm nhũ tương và hỗn dịch. Các chất hoạt động bề mặt khác thường được sử dụng, như Tweens, Spans và các tác nhân nhũ hóa hoặc chất tăng cường độ sinh khả dụng khác thường được sử dụng trong quá trình bào chế các dạng liều được dùng rắn, lỏng, hoặc dạng liều khác, cũng có thể được sử dụng cho mục đích bào chế.

Phác đồ hoặc liều lượng để dùng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó trong dược phẩm có thể xác định được theo các phương pháp đã biết đối với các loại sản phẩm này, ví dụ sử dụng hướng dẫn của nhà sản xuất. Ví dụ, kháng thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp ở nồng độ là 10 mg/mL trong ống sử dụng một lần 100 mg (10 mL) hoặc 500 mg (50 mL). Sản phẩm được bào chế để dùng trong tĩnh mạch (IV) trong natri clorua 9,0 mg/mL, natri xitrat dihydrat

7,35 mg/mL, trong polysorbat 80 0,7 g/mL, và nước vô trùng để tiêm. Độ pH được hiệu chỉnh tới giá trị 6,5.

Để sử dụng trong lâm sàng, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể được dùng cho đối tượng một hoặc nhiều liều. Để dùng ngoài đường tiêu hóa, liều đơn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể là, ví dụ, khoảng 0,01 đến khoảng 100 mg/kg thể trọng. Theo một phương án, liều đơn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể, ví dụ, khoảng 0,1 đến khoảng 50 mg/kg thể trọng. Theo một phương án, liều đơn kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể, ví dụ, khoảng 1 đến khoảng 20 mg/kg thể trọng. Đối với việc dùng nhắc lại, các liều riêng rẽ có thể được dùng bản cách đường dùng giống hoặc khác nhau. Cũng đối với dùng nhắc lại, các liều riêng rẽ có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ, liều thứ nhất hoặc liều tấn công có thể lớn hơn liều sau đó. Cũng đối với việc dùng nhắc lại, các liều riêng rẽ có thể được dùng trong phác đồ cố định hoặc phác đồ điều chỉnh hoặc thay đổi được, ví dụ, dựa trên điều kiện lâm sàng hoặc đáp ứng lâm sàng của bệnh nhân. Cũng đối với việc dùng nhắc lại, các liều riêng rẽ thường có thể được dùng một lần mỗi ngày, hai ngày một lần, một lần mỗi 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày, một lần một tuần, hai tuần một lần, một lần mỗi ba hoặc bốn tuần, hoặc hai tháng một lần. Các phác đồ khác cũng được bao gồm bởi sáng chế.

Người ta đánh giá được rằng các liều lượng và phác đồ này là lấy làm ví dụ và một phác đồ và chế độ dùng tối ưu có thể được xác định bằng cách cân nhắc đến các yếu tố như kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên cụ thể được dùng, bệnh hoặc rối loạn được điều trị, kích thích, tuổi và tình trạng bệnh của đối tượng được điều trị, và đường dùng, các liệu pháp khác được dùng cho đối tượng, và ái lực và khả năng dung nạp của kháng thể cụ thể. Việc xem xét đến các yếu tố và việc dùng theo liều như vậy có thể được xác định bằng một hoặc nhiều thử nghiệm lâm sàng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để tăng cường hệ miễn dịch ở đối tượng có nhu cầu, bao gồm việc dùng cho đối tượng này một lượng có tác dụng điều trị bệnh của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp ức chế chức năng ức chế miễn dịch của Treg người ở đối

tượng có nhu cầu, bao gồm việc dùng cho đối tượng này một lượng có tác dụng điều trị bệnh của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị ung thư bằng cách sử dụng kháng thể GARP-TGF- β 1 và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế. Các phương pháp này bao gồm việc giảm ức chế miễn dịch trong môi trường khối u ở đối tượng có nhu cầu.

Đối với các phương án trong đó kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là để sử dụng trong các phương pháp điều trị ung thư, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều phương pháp điều trị ung thư bổ sung, ví dụ một hoặc nhiều tác nhân trị liệu miễn dịch.

Đối với các phương án trong đó kháng thể GARP-TGF- β 1 được dùng kết hợp với tác nhân trị liệu miễn dịch, tác nhân trị liệu miễn dịch này có thể là vaccin khối u. Theo cách khác, tác nhân trị liệu miễn dịch có thể là kháng thể kích thích miễn dịch.

Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, kháng thể theo sáng chế sẽ có khả năng cải thiện hiệu quả của tác nhân trị liệu miễn dịch bằng cách ngăn ngừa hoặc làm giảm nhẹ sự ức chế miễn dịch bất kỳ. Theo các phương án nhất định, tổ hợp với tác nhân trị liệu miễn dịch có thể thể hiện tác dụng hiệp đồng.

Các loại ung thư khác nhau có thể được điều trị theo phương pháp được mô tả ở đây bao gồm nhưng không giới hạn ở ung thư biểu mô tuyến thượng thận, ung thư hậu môn, ung thư bàng quang, khối u não, u thần kinh đệm, caxinom vú, u carcinoid, ung thư cổ tử cung, caxinom kết tràng, ung thư màng trong tử cung, ung thư thực quản, ung thư ống mật ngoài gan, khối u Ewing, khối u tế bào mầm ngoại bào, ung thư mắt, ung thư túi mật, ung thư dạ dày, u tế bào mầm, u nguyên bào nuôi do thai nghén, ung thư đầu và cổ, ung thư mảnh hạ hầu, caxinom tế bào đảo, ung thư thận, ung thư thanh quản, bệnh bạch cầu, ung thư môi và khoang miệng, ung thư gan, ung thư phổi, ung thư hệ bạch huyết, ung thư hắc tố, u trung biểu mô, caxinom tế bào Merkel, ung thư đầu cổ tế bào vảy di căn, u tủy, khối tân sinh, ung thư vòm mũi họng, u nguyên bào thần kinh, ung thư miệng, ung thư hầu họng, sacom xương, ung thư buồng trứng, ung

thư tuyến tụy, ung thư xoang và mũi, ung thư tuyến cận giáp, ung thư dương vật, u tử cung, ung thư tuyến yên, u tân sinh tương bào, ung thư tuyến thượng thận, sarcom cơ vân, ung thư trực tràng, caxinom tế bào thận, ung thư tuyến nước bọt, ung thư da, sarcom Kaposi, ung thư bạch huyết tế bào T, sarcom mô mềm, ung thư dạ dày, ung thư tinh hoàn, u tuyến ức, ung thư tuyến giáp, ung thư niệu đạo, ung thư tử cung, ung thư âm đạo, ung thư âm hộ, hoặc khối u Wilms.

Các kháng nguyên khối u thích hợp để sử dụng làm vacxin khối u đã biết trong lĩnh vực bao gồm ví dụ: (a) kháng nguyên ung thư-tinh hoàn như polypeptit họ NY-ESO-1, SSX2, SCP1 cũng như RAGE, BAGE, GAGE và MAGE, ví dụ, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, và MAGE-12 (có thể được sử dụng, ví dụ, để giải quyết u melanin, phổi, đầu và cổ, NSCLC, vú, dạ dày ruột, và bàng quang), (b) kháng nguyên đột biến, ví dụ, p53 (liên quan đến các khối u rắn khác nhau, ví dụ ung thư đại trực tràng, phổi, đầu và cổ), p21/Ras (đi kèm với, ví dụ u melanin, ung thư tuyến tụy và ung thư đại trực tràng), CD 4 (đi kèm với, ví dụ u melanin), MUM 1 (đi kèm với, ví dụ u melanin), caspaza-8 (đi kèm với, ví dụ đầu và cổ ung thư), CIA 0205 (đi kèm với, ví dụ ung thư bàng quang), HLA-A2-R1701, beta catenin (đi kèm với, ví dụ u melanin), TCR (đi kèm với, ví dụ u lympho không Hodgkins tế bào T), BCR-abl (đi kèm với, ví dụ bệnh bạch cầu mạn tính do tủy xương), triosephosphat isomeraza, IA 0205, CDC-27, và LDLR- FUT, (c) kháng nguyên đồng biểu hiện, ví dụ, Galectin 4 (đi kèm với, ví dụ ung thư đại trực tràng), Galectin 9 (đi kèm với, ví dụ bệnh Hodgkin), proteinaza 3 đi kèm với, ví dụ bệnh bạch cầu mạn tính do tủy xương), WT 1 đi kèm với, ví dụ các bệnh bạch cầu khác nhau), carbonic anhydraza đi kèm với, ví dụ ung thư thận), aldolaza A đi kèm với, ví dụ ung thư phổi), PRAME đi kèm với, ví dụ u melanin), HER-2/neu đi kèm với, ví dụ ung thư vú, ruột kết, phổi và buồng trứng), alpha-fetoprotein đi kèm với, ví dụ ung thư gan), SA đi kèm với, ví dụ ung thư đại trực tràng), gastrin đi kèm với, ví dụ ung thư tuyến tụy và dạ dày), protein xúc tác telomeraza, MUC-1 đi kèm với, ví dụ ung thư vú và buồng trứng), G-250 đi kèm với, ví dụ caxinom tế bào thận), và kháng nguyên ung thư phổi đi kèm với, ví dụ ung thư vú, ung thư phổi, và các ung thư của ống dạ dày ruột như ung thư đại trực tràng), (d) kháng nguyên dùng chung, ví dụ, kháng nguyên biệt

hóa u melanin-tế bào hắc tố như MART-1/Melan A, gp100, MC1R, thụ thể hormon kích thích tế bào hắc tố, tyrosinaza, tyrosinaza liên quan đến protein- 1/TRP1 và tyrosinaza liên quan đến protein-2/TRP2 đi kèm với, *ví dụ* u melanin), (e) kháng nguyên liên quan đến tuyến tiền liệt như PAP, PSA, PSMA, PSH-P1 , PSM-P1, PSM-P2, đi kèm với *ví dụ* ung thư tuyến tiền liệt, (f) idiotyp globulin miễn dịch (đi kèm với u tủy và u lympho tế bào B, *ví dụ*), và (g) các kháng nguyên khối u khác, như kháng nguyên chứa polypeptit và sacarit bao gồm (i) glycoprotein như sialyl Tn và sialyl Le^x đi kèm với, *ví dụ* ung thư vú và đại trực tràng) cũng như các mucin khác nhau; glycoprotein có thể ghép cặp với protein mang (*ví dụ* MUC-1 có thể ghép cặp với LH); (ii) lipopolypeptit (*ví dụ* MUC-1 liên kết với gốc lipit); (iii) polysacarit (*ví dụ* hexasacarit tổng hợp Globo H), mà có thể được ghép cặp với protein mang (*ví dụ* với KLH), (iv) các gangliosit như GM2, GM12, GD2, GD3 đi kèm với, *ví dụ* ung thư não, phổi, u melanin), mà cũng có thể ghép cặp với protein mang (*ví dụ* KLH). Các kháng nguyên khối u khác bao gồm pi 5, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, kháng nguyên virus Epstein Barr, EBNA, kháng nguyên papillomavirus ở người (HPV), bao gồm các kháng nguyên E6 và E7, virus viêm gan B và C, kháng nguyên virus gây bệnh ung thư máu tế bào T ở người, TSP-180, pl85erbB2, pl80erbB-3, c-met, mn-23H 1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, p 16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO- 1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (protein gắn kết Mac-2/protein liên quan đến cyclophilin C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, và các kháng nguyên tương tự.

Các kháng thể kích thích miễn dịch thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: kháng thể kháng CTLA-4, kháng PD1, kháng PDL1 và kháng KIR.

Theo các phương án nhất định, phương pháp điều trị ung thư được mô tả ở đây, bao gồm việc dùng cho đối tượng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo

sáng chế trước, đồng thời và/hoặc sau khi dùng các tác nhân kháng ung thư hoặc phương pháp điều trị bệnh ung thư khác, như phương pháp hóa trị liệu.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm bằng cách dùng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế để cải thiện hiệu quả của phác đồ chủng ngừa. Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm như HIV, sốt rét, hoặc Ebola bằng cách dùng kết hợp kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên như được mô tả ở đây cùng với các vaccin cụ thể đối với các bệnh này.

Các bộ kit

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit bao gồm ít nhất là một kháng thể GARP-TGF- β 1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của sáng chế.

Thuật ngữ “kit” được dự định để có nghĩa là sản phẩm bất kỳ (ví dụ gói hoặc vật chứa) bao gồm ít nhất là một chất phản ứng, ví dụ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của sáng chế, để gắn kết đặc hiệu phức hợp GARP-TGF- β 1. Bộ kit này có thể được quảng bá, phân phối hoặc bán dưới dạng một đơn vị để thực hiện phương pháp của sáng chế. Hơn nữa, bất kỳ hoặc tất cả các chất phản ứng trong bộ kit có thể được cung cấp trong các vật chứa để bảo vệ chúng khỏi môi trường bên ngoài, chẳng hạn như trong các vật chứa kín. Các bộ kit dụng cụ cũng có thể bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng mô tả bộ kit này và phương pháp sử dụng nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: Tạo dòng mầm kháng thể LHG-10.6

Việc sản xuất và mô tả đặc điểm kháng thể “LHG-10” được mô tả trong các đơn quốc tế số WO2015/015003 và WO2016/125017, toàn bộ nội dung của nó được kết hợp vào đây. Kháng thể LHG-10 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho lạc đà không bướu bằng các tế bào HEK293E biểu hiện quá mức phức hợp GARP-TGF- β 1 của người, và được nhận biết bằng cách chọn lựa và sàng lọc GARP-TGF- β 1 Fab. Phương pháp xáo trộn chuỗi nhẹ (như được mô tả ví dụ, trong đơn quốc tế số

WO2014/033252) được sử dụng để cải thiện ái lực của kháng thể đơn dòng LHG-10, và biến thể “LHG-10.6” (ở đây còn được gọi là 17H5) được xác định là có đặc điểm gắn kết cải thiện. Các trình tự VH và VL của LHG-10 và biến thể LHG-10.6 được xáo trộn V_K được thể hiện ở trên 3.

Bảng 3

		SEQ ID NO.
Miền VH của LHG-10 và LHG10.6	EVQLVQPGAELRNSGASVKVSCKASGYRFT SYYID WVRQAPGQGLEWMG RIDPEDGGTKYAQKFQG RVTFTADTSTSTAYVELSSLRSEDVAVYYCAR NEWETVVVGDLMEYEY WGQGTQVTVSS	1
Miền VL của LHG-10	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPKLLIY GASRLQT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYDSLPTV FGQGTKVELK	2
Miền VL của LHG10.6	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITC QASQSISSYLA WYQQKPGQAPNILLIY GASRLKT GVPSRFSGSGSGTSFTLTISGLEAEDAGTYYC QQYASVPVT FGQGTKVELK	3

Kháng thể 17H5 được phát hiện là có độ đồng nhất 88,5% với trình tự dòng mầm của người gần nhất (X92343|IGHV1-46*01) qua miền VH và độ đồng nhất 86,2% với trình tự dòng mầm của người gần nhất (X59315|IGKV1-39*01) qua miền VL. Kháng thể được tạo dòng mầm theo phương pháp 3 bước:

- 1- Lắp ráp thư viện gen bằng cách sử dụng các oligonucleotit chồng lặp để tạo ra theo cách tổng hợp gen mã hóa chuỗi (VL) và chuỗi nặng (VH) biến đổi bằng PCR.
- 2- Tách dòng thư viện gen vào trong vector (pCB13) chứa các gen mã hóa chuỗi nặng vùng hằng định (CH1) và chuỗi nhẹ kappa (C_K) vùng hằng định của người (cấu trúc thư viện).

3- Chọn lọc các Fab chức năng bằng cách sử dụng chọn lọc ái lực và biểu hiện bằng thể thực khuẩn.

1. Cấu trúc thư viện

VH của 17H5 được so sánh với trình tự dòng mầm của người gần nhất và các gốc khung làm việc lệch với dòng mầm của người được nhận biết. Các gốc khung làm việc này được phép đột biến thành gốc có mặt trong vùng V của người, trong khi cũng duy trì trong thư viện gốc ban đầu. Các gốc 12 VH được phép đột biến thành các gốc tương đương với chúng của người được thể hiện ở bảng dưới đây. Ngoài các đột biến tạo dòng mầm này, vị trí isome hóa trong CDR2 (D54;D55) và vị trí oxy hóa trong CDR3 (M100f) được phép đột biến. Các vị trí này được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 4 Gốc được hướng đích trong miền VH 17H5

Vị trí	Aa lạc đà	Aa đột biến	Xác suất	Các dòng
1	E	Q	0,5	2
7	P	S	0,5	2
11	L	V	0,5	2
12	R	K	0,5	2
13	N	K	0,5	2
14	S	P	0,5	2
28	R	T	0,5	2
54 (HCDR2)	D	E	0,5	2
55 (HCDR2)	G	A	0,5	2
69	F	M	0,5	2
71	A	R	0,5	2
78	A	V	0,5	2
80	V	M	0,5	2
100f (HCDR3)	M	L/T	0,33	3
108	Q	L	0,5	2

Đối với Vk của 17H5, việc so sánh giữa trình tự dòng mầm của người gần nhất và các trình tự khung làm việc dẫn đến việc nhận biết 11 gốc được hướng đích. Các vị trí này được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 5: Các gốc được hướng đích trong miền VL 17H5

Vị trí	Aa lạc đà	Aa đột biến	Xác suất	Các dòng
11	L	V	0,5	2
42	Q	K	0,5	2
45	N	K	0,5	2
46	I	L	0,5	2
70	S	D	0,5	2
77	G	S	0,5	2
79	E	Q	0,5	2
80	A	P	0,5	2
83	A	F	0,5	2
84	G	A	0,5	2
106	L	I	0,5	2

Kích thước lý thuyết của thư viện được tạo dòng mầm 17H5 được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6

	17H5
Kích thước của thư viện VH	5×10^4
Kích thước của thư viện VL	2×10^3
Kích thước của thư viện cuối cùng	1×10^8

2. Tạo cấu trúc thư viện gen

Các thư viện được tạo dòng mầm được tạo ra bằng cách lắp ráp gen. Các gen tổng hợp đối với VH và VL (hai bộ) được dựa trên thiết kế này được tạo ra bằng việc lắp ráp trên cơ sở PCR (Stemmer *et al.*, Gene (1995) 164: 49 - 530). Các oligonucleotit chèn lắp với các đột biến đặc hiệu trên các vị trí nhất định được lắp ráp bằng PCR. Các nucleotit được làm thoái hóa để mã hóa axit amin của người và lạc đà không bướu. Việc này được thực hiện để ngăn chặn việc mất hoàn toàn việc gắn kết trong trường hợp lạc đà không bướu gốc là quan trọng đối với độ ổn định, sự xoắn cuộn hoặc gắn kết ái lực cao.

Các gen tổng hợp của các thư viện 17H5 V_k và V_H đầu tiên được tách dòng trong pCB13-CK1, vectơ phagemid với các miền C_k và CH1 của người, tương ứng. Sau khi tạo cấu trúc các thư viện con V_kC_k và V_HCH1 này, các thư viện cuối cùng được thực hiện bằng cách thắt đoạn gắn chèn nối chuỗi nặng vào trong thư viện chuỗi nhẹ. PCR khuôn lạc được thực hiện để xác định tỷ lệ % gắn chèn và các dòng được chuyển đến để giải trình tự để đảm bảo rằng tất cả các đột biến mong muốn có mặt trong thư viện. Đặc điểm của các thư viện khác nhau được mô tả trong bảng dưới đây.

Bảng 7: Đặc trưng của các thư viện được tạo dòng mầm 17H5

	17H5
Kích thước của thư viện V _H	1E5
Kích thước của thư viện V _L	1E3
Kích thước của thư viện cuối cùng	1E8
% gắn chèn	85%

Các thư viện tạo dòng mầm được phát hiện là có chất lượng tốt và có thể được sử dụng để chọn lọc.

3. Chọn lọc các Fab với độ đồng nhất cao với người

Việc biểu hiện bằng thể thực khuẩn được sử dụng để chọn lọc Fab có ái lực cao đối với phức hợp GARP-TGF- β 1 của người, như được mô tả trước đó trong WO2015/015003, nội dung của chúng được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Ngắn gọn, các đĩa vi chuẩn được phủ O/N ở 4 °C bằng phức hợp GARP-TGF- β 1 và ngày sau đó, thể thực khuẩn biểu hiện Fab được ủ trong 2 giờ trong các lỗ được phủ bằng phức hợp ở các nồng độ khác nhau. Các đĩa được rửa và thể thực khuẩn đặc hiệu được rửa giải bằng trypsin và được sử dụng để lây nhiễm cho các tế bào TG1. Chi tiết về các điều kiện chọn lọc được liệt kê trong bảng 8.

Bảng 8: Chi tiết về các chu trình chọn lọc thư viện được tạo dòng mầm của 17H5

Chu trình	Đưa vào thể thực khuẩn (μ l)	huGARP-TGF- β 1 [ng/lỗ]	Thời gian rửa	Kháng nguyên rửa
-----------	-----------------------------------	-------------------------------	---------------	------------------

1	10	1000-100-10	-	-
2	1	1000-100-10	-	-
3	1	1000-100-10	2 giờ	20 x huGT
4	1	1000-100-10	24 giờ	20 x huGT
5	1	1000-100-10	72 giờ	20 x huGT
6	1	1000-100-10	1 tuần	100 x huGT

Sau chu trình chọn lọc thứ nhất, việc làm giàu chỉ quan sát được qua lớp phủ protein không liên quan ở nồng độ 10µg/ml. Trong chu trình 2, việc làm giàu cao hơn gấp 10 lần, trong khi lượng thể thực khuẩn thấp hơn 10 lần. Bắt đầu từ chu trình 3, mức độ nghiêm ngặt đã được tăng lên bằng cách tăng thời gian rửa và bằng cách thêm một lượng dư mục tiêu vào dung dịch. Một dư lượng lớn đích hòa tan là dung dịch được bổ sung để ngăn chặn việc liên kết lại của thể thực khuẩn đã phân tách. Thậm chí sau chu trình thứ 6, với việc rửa với tốc độ phân ly 1 tuần dư lượng đích hòa tan 100 lần, việc làm giàu vẫn quan sát được.

4. Sàng lọc các Fab với độ đồng nhất cao với người

Các đĩa mẫu được chọn từ các chu trình chọn lọc 2, 3, 4, 5 và 6 (48 dòng cho mỗi chu trình). Chất chiết chu chất được chuẩn bị và tốc độ phân ly được xác định bằng SPR (sử dụng Biacore). Tất cả các dòng được giải trình tự ADN và trình tự axit amin được suy luận từ đó. Các dòng có độ đồng nhất với vùng Ig V dòng mầm người trên 92% được tóm tắt trong bảng 9. Tốc độ phân ly của các dòng này được xác định bằng các chất chiết chu chất trên SPR (sử dụng Biacore), và được so sánh với tốc độ phân ly của Fab 17H5.

Bảng 9: Ái lực gắn kết của các dòng với nhiều hơn 92% tổng độ đồng nhất với người

Fab	Tốc độ phân ly (10^{-4} giây ⁻¹)	% đồng nhất VH	% đồng nhất VK	% đồng nhất toàn bộ	Vị trí isome hóa D54;G55 (HCDR2)	Nguy cơ oxy hóa M100f (HCDR3)
17H5	2,01	88,5	86,2	87,4	Khối lượng (D54;G55)	Khối lượng (M100f)

*39A12	6,06	95,4	96,2	95,8	E54;G55	T100f
*39A5	1,9	94,2	96,2	95,2	Khối lượng	Khối lượng
39H6	4,4	93,1	96,2	94,7	Khối lượng	Khối lượng
40H3	2,47	94,2	95,0	94,6	Khối lượng	Khối lượng
39A10	1,77	94,2	95,0	94,6	Khối lượng	Khối lượng
*39B6	1,05	95,4	93,7	94,6	Khối lượng	Khối lượng
39E6	8,61	96,5	92,5	94,5	Khối lượng	Khối lượng
40G4	2,07	93,1	95,0	94,1	Khối lượng	Khối lượng
38C3	2,32	95,4	92,5	94,0	Khối lượng	Khối lượng
39G3	6,62	95,4	92,5	94,0	E54;G55	T100f
39G9	9,47	95,4	92,5	94,0	E54;G55	T100f
38F3	2,03	91,9	95,0	93,5	D54;A55	Khối lượng
*38F2	4,08	94,2	92,5	93,4	D54;A55	T100f
*39B10	2,36	95,4	91,2	93,3	E54;G55	Khối lượng
39C6	7,89	95,4	91,2	93,3	E54;G55	T100f
39G6	7,79	94,2	91,2	92,7	Khối lượng	L100f
38C5	1,69	90,8	93,7	92,3	E54;G55	Khối lượng
38B2	2,86	93,1	91,2	92,2	Khối lượng	T100f

*** 5 Fab được định dạng lại là IgG1 đầy đủ**

5 dòng thể hiện tổng số độ đồng nhất với người >93% và tốc độ phân ly có thể so sánh với 17H5 Fab bố mẹ được tạo dòng lại là kháng thể IgG1 người hoàn toàn. Các trình tự CDR, VH và VL của các kháng thể này được thể hiện ở các bảng 10, 11 và 12.

Bảng 10: Các trình tự VH CDR đối với GARP-TGF-β1 Ab

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ NO.	ID	CDR3	SEQ ID NO.
39B6	SYVID	4	RIDPEDGGTKYAQKFQG	5		NEWETVVVGDLMEYEY	6
39A12	SYVID	4	RIDPEEGGTKYAQKFQG	7		NEWETVVVGDLTYEY	32
39A5	SYVID	4	RIDPEDGGTKYAQKFQG	5		NEWETVVVGDLMEYEY	6
38F2	SYVID	4	RIDPEDAGTKYAQKFQG	8		NEWETVVVGDLTYEY	32
39B10	SYVID	4	RIDPEEGGTKYAQKFQG	5		NEWETVVVGDLMEYEY	6

Bảng 11: Các trình tự VL CDR đối với GARP-TGF-β1 Ab

	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
39B6	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
39A12	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
39A5	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
38F2	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11
39B10	QASQSISSYLA	9	GASRLKT	10	QQYASVPVT	11

Bảng 12: Trình tự miền biến đổi đối với GARP-TGF-β1 Abs

Dòng	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
39B6	QVQLVQPGAIEVRKPGASVKVSKASGYRF	22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSI	23

	T SYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGGTK YAQKFQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRSE DTAVYYCAR NEWETVVVGDLMEY EY WGQGLVTVSS		SSYLA WYQQKPGQAPKILLYGASRLKT GVPSRFGSGSGTSFTLTISSEPEDAAT YYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	
39A12	EVQLVQPGAELKKPGASVKVSKKASGYRF T SYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEEGGTK YAQKFQGRVTFTADTSTSTVYVELSSLRSE DTAVYYCAR NEWETVVVGDLTYEY EY WGQGLVTVSS	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSI SSYLA WYQQKPGQAPKILLYGASRLKT GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQAEDEFAT YYC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	25
39A5	QVQLVQPGAELRNPASVKVSKKASGYRF T SYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDGGTK YAQKFQGRVTFTTRDTSTSTVYVELSSLRSE DTAVYYCAR NEWETVVVGDLMEY EY WGQGLVTVSS	26	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSI SSYLA WYQQKPGQAPKLLIYGASRLKT GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDAAT YYCQQYASVPVT FGQGTKVEIK	27
38F2	QVQLVQPGAELKKPGASVKVSKKASGYRF T SYIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGTK YAQKFQG RVFTADTSTSTVYVELSSLRSED TAVYYC AR NEWETVVVGDLTYEY EY WGQGLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSI SSYLA WYQQKPGKAPNLLIYGASRLKT EVPSRFGSGSGTDFTLISGLEPEDAGTY YC QQYASVPVT FGQGTKVEIK	29
39B10	EVQLVQSGAELKKPGASVKVSKKASGYRF TSYYID WVRQAPGQGLEWMG RIDPEEGGTKY A QKFQ	30	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSI SSYLA WYQQKPGQAPNLLIYGASRLKT GVPSRFGSGSGTDFTLTISGLEAEDEFAT	31

	RVTMTADTSTSTAYMELSSLRSED CAR WGQGT LVT VSS	NEWETVVVGDL MYEY EY	YYC QQY ASVP VT FGQ GK VEIK	
--	--	---------------------------	---	--

5. Mô tả đặc điểm *in vitro* của các mAb có độ đồng nhất cao với gốc khung làm việc của người

5 dòng được tạo dòng mầm được định dạng lại thành IgG1 người được sản xuất bằng cách chuyển nhiễm tạm thời trong tế bào HEK 293E. Tất cả các kháng thể được thử nghiệm về việc gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β 1 của người bằng SPR và thể hiện ái lực gắn kết tương tự như dòng ban đầu không được tạo dòng mầm (K_D thấp hơn 2-5 lần so với 17H5). Việc thay đổi gốc M100f trong CDR3 thành threonin làm giảm $K_D \approx 5$ lần. Các đặc điểm và tính chất gắn kết của 17H5 Ab được tạo dòng mầm được liệt trong bảng 13.

Bảng 13: Các đặc điểm và tính chất gắn kết của 17H5 Ab được tạo dòng mầm

mAb	KD (M)	Số lần thay đổi	Vị trí isome hóa D54;G55	Nguy cơ oxy hóa M100f	% đồng nhất VH	% đồng nhất VK	% đồng nhất tổng thể
17H5	1,00E-10	1,0	Khối lượng (DG)	Khối lượng (M)	88,5	86,2	87,3
39B6	1,67E-10	1,7	Khối lượng (DG)	Khối lượng (M)	95,4	93,7	94,5
39B10	2,62E-10	2,6	EG	Khối lượng (M)	95,4	91,2	93,3
39A5	2,98E-10	3,0	Khối lượng (DG)	Khối lượng (M)	94,2	96,2	95,2
38F2	4,80E-10	4,8	DA	T	94,2	92,5	93,3
39A12_T	5,05E-10	5,1	EG	T	95,4	96,2	95,8

6. Độ ổn định của mAb 39B6 được tạo dòng mầm

Dòng 39B6 được chọn làm dòng được tạo dòng mầm dẫn đầu dựa trên đặc điểm gắn kết của nó. Kháng thể này được sản xuất thành hai dạng thiếu hụt chức năng tác động, hIgG1^{N297Q} và hIgG4^{S228P}, các thử nghiệm độ ổn định được thực hiện. Trước khi thử nghiệm độ ổn định, ái lực của kháng thể 39B6 thiếu hụt chức năng tác động đối với GARP-TGF- β 1 được thử nghiệm bằng BiacoreT200 sử dụng chip CM5 được phủ phức hợp GARP-TGF- β 1 ở 750RU (bảng 14) hoặc được phủ kháng thể ở 1000RU (bảng 15).

Bảng 14

mAb	Dạng	K_D (M)	Sự khác biệt về gấp cuộn
LHG10.6	IgG1-N297Q	8,19E-10	1
39B6	IgG1-N297Q	8,63E-11	0,1
39B6	IgG4-S228P	3,13E-10	0,4

Bảng 15

mAb	Dạng	K_D (M)	Sự khác biệt về gấp cuộn
LHG10.6	IgG1-N297Q	5,34E-10	1
39B6	IgG1-N297Q	1,23E-09	2,3
39B6	IgG4-S228P	1,02E-09	1,9

Khả năng chịu nhiệt của kháng thể 39B6 được thử nghiệm bằng cách sử dụng quy trình sau đây.

- Chuẩn bị mẫu mAb: 1 ml mAbs (39B6-IgG1 và 39B6-IgG4), dung dịch gốc mới được chuẩn bị (5 mg/ml), được đặt trong lọ thủy tinh nắp vặn thủy tinh 2 ml và được bảo quản ở 5 °C và 37 °C. Các lọ ngay lập tức được kiểm tra sự vắng mặt của các hạt.
- Đối chứng âm PBS: các phần phân ước 1 ml PBS Dulbecco được lọc được chuẩn bị trong các lọ thủy tinh 2 ml làm đối chứng âm tính PBST. Các lọ ngay lập tức được kiểm tra sự có mặt của các hạt.
- Đối chứng âm PBSTw: các phần phân ước 1 ml PBS Dulbecco được lọc chứa 0,02% Tween80 (Sigma) được chuẩn bị trong các lọ thủy tinh 2 ml làm đối chứng âm tính PBSTw. Các lọ ngay lập tức được kiểm tra sự có mặt của các hạt.
- Kiểm soát mức kết tụ cao: Các phần phân ước 1 ml của kháng thể nội bộ được chuẩn bị với sự kết tụ có thể nhìn thấy nhiều trong các lọ thủy tinh 2 ml.
- Mẫu tham chiếu: đối với mỗi kháng thể, các phần phân ước 60 µl mAb được chuẩn bị trong các ống PCR, tiệt trùng 500 µl, được dán nhãn và được bảo quản ở -20 °C.

Độ ổn định của kháng thể được bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau và trong các điều kiện khác nhau (PBS với PBSTw) được theo dõi trong khoảng thời gian 56 ngày. Ảnh hưởng của việc bảo quản lên hoạt tính gắn kết với đích như được xác định bằng SPR (Biacore™) được thể hiện trên Fig. 2. Như có thể quan sát được từ kết quả đã nêu, kháng thể 39B6 (ở ở các dạng thiếu hụt chức năng tác động) đã thể hiện xu hướng có hoạt tính gắn kết với đích thấp hơn trong cả PBS và PBS/Tween khi được bảo quản ở 37 °C. Ngược lại, các mẫu được bảo quản ở 5 °C không thể hiện việc mất hoạt tính gắn kết với đích một cách đáng kể trong thời gian trên.

Ví dụ 2: Phát triển kháng thể GARP-TGF- β 1 với độ ổn định được cải thiện

2.1 Sản xuất các biến thể 39B6

Việc giảm hoạt tính gắn kết với đích được lưu ý ở trên đối với kháng thể 39B6 được phát hiện là được liên quan đến việc khử amit diễn ra ở các vị trí 95-96 của VH CDR3. Như vậy, công việc tiếp theo được thực hiện để cải thiện độ ổn định của 39B6.

Đầu tiên, dòng này được cải biến chuỗi VH trong vùng CDR2 để đưa vào phép thay thế **G55A (39B6-A)**. Các vùng VH và VL của **39B6-A** được tách dòng lại trong khung IgG4^{S228P} người tức là dạng kháng thể người thiếu hụt chức năng tác động.

Để cố gắng cải thiện độ ổn định của kháng thể 39B6-A IgG4^{S228P}, 5 biến thể được tạo ra có các đột biến ở các vị trí 95 hoặc 96 của CDR3 của miền VH. Các biến thể này được thể hiện dưới đây. Tất cả các biến thể được tạo ra ở dạng thiếu hụt chức năng tác động IgG4^{S228P}.

Bảng 16: Các biến thể 39B6-A

Biến thể	Vị trí 95	Vị trí 96
39B6-AVE	V	E*
39B6-AYE	Y	E*
39B6-ANK	N*	K
39B6-ANR	N*	R
39B6-AEE	E	E*

* gốc đã có trong 39B6-A

Kháng thể được lọc và được cô thành 5mg/ml và được bảo quản trong PBS Dulbecco với 0,02% Tween80 (Sigma). Tween80 cần để làm ổn định chế phẩm kháng thể.

Ái lực của tất cả các kháng thể (bao gồm 39B6-A) đối với GARP-TGF- β 1 được thử nghiệm bằng BiacoreT200 sử dụng chip CM5 được phủ phức hợp GARP-TGF- β 1 ở 150RU (bảng 17) hoặc được phủ kháng thể ở 200RU (bảng 18)

Bảng 17

mAb	K_D (M)	Số lần thay đổi
39B6-A	9,91E-10	1,0
39B6-AVE	8,94E-10	0,9
39B6-AYE	7,63E-10	0,8
39B6-AEE	5,79E-09	5,8
39B6-ANK	8,80E-10	0,9
39B6-ANR	8,84E-10	0,9
LHG10.6	5,17E-10	0,5

Bảng 18

mAb	K_D (M)	Số lần thay đổi
39B6-A	1,33E-09	1,0
39B6-AVE	1,29E-09	1,0
39B6-AYE	1,62E-09	1,2
39B6-AEE	1,02E-07	76,7
39B6-ANK	2,02E-09	1,5
39B6-ANR	1,94E-09	1,5

Hiệu lực phong bế việc giải phóng TGF- β hoạt tính bởi Treg người được phân tích với tất cả các biến thể bằng cách xác định mức phosphoryl hóa SMAD2 của Treg người được kích thích bởi CD3/CD28 với sự có mặt của các mAb. Như được thể hiện trên Fig. 3, kháng thể 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR có hiệu lực tương tự trong thử nghiệm phosphoryl hóa SMAD2 so với 39B6-A ban đầu. Các biến thể 39B6-AEE và 39B6-AVE đã thể hiện việc mất hiệu lực rõ rệt.

Các kết quả tương tự thu được bằng cách sử dụng thử nghiệm GAGA-luc trong đó các tế bào 293T-hGARP được chuyển nhiễm tạm thời với plasmid thông báo trong đó luciferaza đom đóm chịu sự kiểm soát của promoter đáp ứng SMAD (GAGA-luc). Kháng thể 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR có hiệu lực tương đương trong thử nghiệm luciferaza so với 39B6-A ban đầu. Các biến thể 39B6-AEE và 39B6-AVE thể hiện việc mất hiệu lực rõ rệt (xem Fig. 4).

2.2 Nghiên cứu độ ổn định

Ngoại trừ 39B6-AEE, các biến thể được thử nghiệm độ ổn định bằng cách sử dụng các phương pháp như được mô tả dưới đây.

Đối với mỗi nghiên cứu độ ổn định khác nhau, kháng thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật sau đây:

- Kiểm tra trực quan
- HPLC loại trừ kích thước
- SDS-PAGE (khử và không khử)
- Ái lực gắn kết với đích trên SPR
- Nồng độ protein

Quy trình của các kỹ thuật này được mô tả dưới đây.

Quy trình đánh giá trực quan

Các mẫu được làm mù và ghi điểm đối với sự hiện diện của các hạt nhìn thấy được bằng cách đánh giá trực quan các lọ bởi ba nhà phân tích. Các mẫu được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng trong 30 phút trước khi đánh giá. Hệ thống điểm ghi sau được sử dụng để đánh giá:

- A: mẫu sạch, không quan sát thấy các hạt
- B: có rất ít hạt
- C: sự xuất hiện của các hạt ở mức vừa phải
- D: các hạt quan sát được ở mức nhiều

f: sợi

Quy trình đối với sắc ký loại trừ theo kích thước (SE-HPLC)

Hệ thống, cột và chuẩn bị mẫu

Cột được sử dụng trong nghiên cứu là Xbridge Protein BEH SEC 200A (3,5 μ m, 7,8*30 mm, Waters) thường được bảo quản trong 20% EtOH. Cột bảo vệ Xbridge Protein BEH 200A được ghép với cột phân tích (3,5 μ m, 7,8*3 mm; Waters). Trước mỗi lần sử dụng, cột ít nhất được cân bằng bằng PBS Dulbecco đối với 5CV, và trước và sau khi loại bỏ khỏi hệ thống, nó được làm sạch bằng 5CV nước loại LC. Tất cả các dung môi được lọc và khử khí trước khi dùng.

Hệ thống sắc ký được sử dụng là Agilent 1260 Infinity, được trang bị bơm bốn kênh, bộ tiêm tự động, thiết bị khử khí trực tuyến và bộ dò DAD. Cột được giữ trong ngăn ổn nhiệt và mẫu được phân tích ở nhiệt độ phòng. Bộ dò được thiết lập ở các chiều dài bước sóng 280 và 214 nm một cách đồng thời (chiều dài bước sóng tham chiếu ở 360 nm với ngưỡng là 100 nm). Việc giám sát sự kết tụ được theo dõi trên kênh 214 nm. Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm Chemstation(Agilent).

Việc phân tích mẫu được thực hiện bằng cách chuyển 25 μ l mẫu ban đầu trực tiếp từ nồng độ 5 mg/ml sang điều kiện vô trùng. Chúng được lượn xoáy xuống ở tốc độ 2000 rcf trong 1 phút và 20 μ l được chuyển sang ống thủy tinh, màu hổ phách có nắp vặn một cách cẩn thận. Thể tích bơm đối với mỗi điều kiện là 5 μ l (25 μ g), ở lưu lượng là 0,7 ml PBS/phút trong 25 phút. Mỗi lần bơm được kèm theo việc rửa kim bằng nước loại LC và rửa lớp bọt lúc kết thúc mỗi mẫu.

Trình tự mỗi thời điểm được bắt đầu bằng việc bơm 2x PBS (trống; thể tích bơm 5 μ l), sau đó bơm 2 μ l hỗn hợp Protein chuẩn BEH 200 (Waters) và mẫu mAb kết tụ đã biết. Mỗi mười hai mẫu được phân tích, việc bơm mẫu trống được thực hiện. Mỗi trình tự phân tích được kết thúc như khi bắt đầu nhưng theo thứ tự ngược lại (mAb đối chứng kết tụ đã biết, hỗn hợp protein chuẩn BEH và mẫu trống 2x).

Phương pháp được sử dụng để xác định % kết tụ và % vùng monome

Quy trình sau đây được sử dụng:

- Tích hợp tất cả các sắc ký đồ bằng phương pháp ARGX-115 (các thông số kỹ thuật cơ bản: chế độ tiêu chuẩn tiếp tuyến, độ nhạy của dốc 2,0, độ cao từ chối 1,7, vùng từ chối 1,0, độ rộng của đỉnh: 0,02)
- Xác minh rằng tất cả các đỉnh được tích hợp theo cách trùng khớp với các phân tích trước đó thu được.
- Xuất các kết quả tích hợp trong tệp PDF và Excel.
- Tính tổng % là tổng cộng của các khu vực của tất cả các đỉnh rửa giải trước khi đỉnh monome chia cho tổng diện tích tiêm và nhân với 100.
- Cũng tính % vùng monome bằng cách chia vùng monome cho toàn bộ vùng và nhân với 100. % vùng monome này phản ánh có các khối kết tụ không tan có mặt trong mẫu hay không.
- Giữ hồ sơ ghi chi tiết để theo dõi hiệu suất, hiệu quả và độ phân giải của cột phân tích (nghĩa là đối xứng đỉnh, diện tích monome, tổng diện tích, khả năng tái lập của thời gian lưu, v.v.)

Quy trình đối với SDS-PAGE

Chuẩn bị mẫu

Việc phân tích mẫu được thực hiện bằng cách chuyển 25 µl toàn bộ mẫu ban đầu ở nồng độ 5 mg/ml trong 100 µl PBS/0,02% Tween80 (được viết tắt là PBSTw trong thử nghiệm này) trong điều kiện vô trùng để tạo ra nồng độ trung gian ở 1 mg/ml, đối với SDS-PAGE (khử và không khử), đánh giá ái lực gắn kết trên SPR và nồng độ protein. 4-20% tris glyxin, mini-protean, không thuốc nhuộm, gel chế tạo sẵn được sử dụng để phân tích SDS-PAGE mẫu (Biorad). Một mẻ dung dịch đệm tải mẫu ADN đậm đặc 4 lần, có hoặc không có tác nhân khử DTT, được chuẩn bị và được chia thành các phần phân ước đến -20°C. Thông thường, 5 µl được lấy từ dịch pha loãng trung gian ở nồng độ 1 mg/ml và sau đó, 5 µl dung dịch đệm tải mẫu ADN đậm đặc 4 lần (+/- DDT) được bổ sung cùng với 10 µl mQ. Số lượng cuối cùng cho mỗi điều kiện là 5 µg. Các mẫu được đun sôi trong 10 phút ở 95 °C và sau đó được tải (20 µl)

lên gel đúc sẵn. Điện di diễn ra trong 35 phút trong hệ đệm tris-glyxin trong điện áp không đổi là 200 V. Nhuộm xanh dương (Gentaur) sau 1 giờ. Tất cả gel không bị nhuộm bằng nước mQ trong ít nhất là 1 giờ.

Xác định % Ab chiều dài đầy đủ

Cường độ của các dải khác nhau được xác định trên hệ Odyssey v3.0 Li-Cor bằng cách quét gel protein để phát hiện một kênh (700 nm) theo các cài đặt: độ dịch quỹ tích 0,5 mm và chất lượng “cao”. Độ sáng và độ tương phản cho mỗi phân tích được thiết lập đến 50% bằng thông số thủ công tuyến tính là 5.

Phương pháp này như sau:

- Quét gel và khẳng định rằng tất cả các dải trên gel bao chặt bởi các hình chữ nhật.
- Chọn “xuất dữ liệu” trong các cài đặt để có được cường độ thô của tất cả các dải ở định dạng Excel.
- Tính % cường độ thô của mỗi dải có mặt trong một làn là cường độ thô của dải được chia cho tổng cường độ thô của làn và nhân với 100.
- Đối với điều kiện không khử, % Ab chiều dài đầy đủ được xác định là % cường độ thô của dải tương ứng với dải ~100 kD.
- Đối với điều kiện khử, % Ab chiều dài đầy đủ được xác định là tổng số % cường độ thô của các dải mà tương ứng với các dải ~25-35 kD và ~55 kD.

Quy trình xác định hoạt tính gắn kết với đích trong Biacore 3000

Chuẩn bị mẫu

Từ nồng độ trung gian của tất cả các mẫu ở 1 mg/ml được mô tả ở trên, việc pha loãng thêm 1/250 được thực hiện đối với việc phân tích SPR để thu được nồng độ cuối cùng là 4 µg/ml. Việc pha loãng 1/250 này diễn ra đối với tất cả các điều kiện trong hai bước: a) 5 µl (1 mg/ml) + 120 µl HBS-EP (dung dịch đệm SPR) và b) pha loãng thêm 10x (15 µl + 135 µl HBS-EP). Đối với mỗi kháng thể và mỗi thời điểm, đường cong chuẩn riêng rẽ được tạo ra, bắt đầu từ mẫu đông lạnh -80 °C. Đường cong

này được phân tích cùng với độ ổn định mẫu để xác định độ dốc của mỗi đường cong sau sự phù hợp chung của các mẫu chuẩn. Các độ dốc này được sử dụng để tính % hoạt tính của độ ổn định mẫu bằng cách thiết lập mẫu tham chiếu là 100%.

Xác định % hoạt tính trên Biacore

Để xác định hoạt tính gắn kết với đích trong Biacore, chip CM5 được phủ bằng ~4000 RU phức hợp GARP-TGF- β người. Dòng chảy được thiết lập đến 30 μ l/phút bằng chế độ bơm “kinject” và hai lần bơm khôi phục (1 mM NaCl, 2,5 mM glyxin độ pH=1,5) với các khoảng cách thời gian 5 phút.

Phương pháp được thực hiện như sau:

- Mở các đường cong trong chương trình BIAEVAL và chọn giá trị ‘2-1’ (1: trống, 2 hGARP-TGF- β 1)
- Chọn một đường cong tại thời điểm chồng phủ đồ thị.
- Xóa các phần tái tạo của đường cong
- Chọn đường cơ sở ngay trước khi bơm và chuyển trục Y về ‘0 ở trung tuyến của vùng chọn’.
- Chọn ‘phù hợp chung’ (General Fit), bắt đầu từ 120 giây sau khi bơm và kết thúc ở 155 giây.
- Lập đồ thị các chất chuẩn trong Excel và xác định độ dốc của đường cong đối với mỗi kháng thể
- Các giá trị này được chuyển thành % hoạt tính bằng cách thiết lập giá trị tham chiếu (mẫu được bảo quản ở -20 °C) ở 100%

Quy trình đối với nồng độ protein

Để xác định hàm lượng protein của mỗi điều kiện, hệ thống NanoDrop được sử dụng bằng cách xác định sự hấp thụ ở 280 nm của mỗi mẫu (2 μ l). Hệ thống này được làm trống bằng PBS và xác định protein được thực hiện bằng cách đo trong ba mẫu giống nhau mức hấp thụ ở 280 nm đối với mỗi mẫu (pha loãng trung gian ở 1 mg/ml). Tất cả các giá trị thu được ở 280 nm được chia cho hệ số 1,51. Việc xác định mẫu

trống PBS được thực hiện sau mỗi điều kiện khác nhau. Các dữ liệu được thông báo là giá trị trung bình của ba lần đo đối với mỗi điều kiện.

2.2.1 Nghiên cứu độ ổn định với nhiệt độ

Để theo dõi độ ổn định của kháng thể trong các điều kiện bảo quản khác nhau, các thiết lập sau đây là như sau:

- Chuẩn bị mẫu mAb: 1 ml các mAb (39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR), dung dịch gốc mới được chuẩn bị (5 mg/ml), được đặt trong các lọ thủy tinh nắp vặn 2 ml and được bảo quản ở 5 °C và 37 °C. các lọ ngay lập tức được kiểm tra sự vắng mặt của các hạt.
- Đối chứng âm PBSTw: các phần phân ước 1 ml PBS Dulbecco được lọc chứa 0,02% Tween80 (Sigma) được chuẩn bị trong các lọ thủy tinh 2 ml làm đối chứng âm tính PBSTw. Các lọ ngay lập tức được kiểm tra sự vắng mặt của các hạt.
- Kiểm soát mức kết tụ cao: Các phần phân ước 1 ml của kháng thể nội bộ được chuẩn bị với sự kết tụ có thể nhìn thấy nhiều trong các lọ thủy tinh 2 ml.
- Mẫu tham chiếu: đối với mỗi kháng thể, các phần phân ước 60 µl mAb được chuẩn bị trong các ống PCR, tiệt trùng 500 µl, được dán nhãn và được bảo quản ở -20 °C.

Tại các thời điểm khác nhau, các mẫu mAb được lấy từ các điều kiện bảo quản và được kiểm tra:

- Kiểm tra trực quan
- SE-HPLC
- SDS-PAGE (khử và không khử)
- Ái lực gắn kết với đích trên SPR
- Nồng độ protein

Kiểm tra trực quan

Các kết quả kiểm tra trực quan được thể hiện trên bảng 19 dưới đây. Tất cả các mAbs là ở trong PBSTw, mà sẽ cho tác dụng ổn định.

Bảng 19: Kết quả kiểm tra trực quan các mẫu mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR trong điều kiện bảo quản 56 ngày ở 5 °C và 37 °C

	0d	1d	7d	14d	28d	56d
Mẫu	Điều kiện bảo quản: 5 °C					
39B6-AVE	A-B-B	A-B-B	Af-B-B	Af-B-B	Af-B-A	B-Bf-Af
39B6-AYE	A-A-A	A-A-A	A-A-B	Af-A-B	Af-Af-B	Af-Bf-A
39B6-ANK	A-A-A	A-A-B	Af-B-B	Af-A-B	B-A-C	B-A-B
39B6-ANR	B-A-A	B-B-B	B-Bf-Bf	C-Bf-Bf	C-Bf-Cf	C-Bf-C
Cao Kiểm soát mức kết tụ	C-C-C	C-C-C	C-D-D	D-D-D	D-D-D	D-D-D
PBSTw	Af-A-A	Af-A-A	A-B-B	Af-A-B	Af-A-A	Af-A-A
	Điều kiện bảo quản: 37 °C					
39B6-AVE	A-A-A	A-B-B	Af-Bf-B	Af-Bf-B	Af-Bf-B	Af-Bf-Af
39B6-AYE	A-A-A	A-B-B	Af-A-B	Af-B-B	B-B-B	B-Af-Bf
39B6-ANK	A-A-A	A-A-B	A-B-B	B-A-B	C-B-B	D-Bf-Bf
39B6-ANR	B-A-A	B-A-B	Af-Af-Bf	Af-Af-Bf	B-Af-Bf	C-Af-Bf
Cao Kiểm soát mức kết tụ	C-C-C	C-C-C	C-D-C	D-D-C	D-D-D	D-D-D
PBSTw	Af-B-B	Af-Bf-B	Af-Af-Bf	Af-Bf-B	Af-Bf-Bf	Af-A-Af

Đối với điều kiện 5 °C, điểm số trung bình đối với các mAb sau 56 ngày như sau:

39B6-AYE: ‘Mẫu sạch, không quan sát thấy các hạt’

39B6-AVE và 39B6-ANK: ‘có rất ít hạt’

39B6-ANR: “sự xuất hiện của các hạt ở mức vừa phải”

Dung dịch đậm PBSTw được tính điểm là ‘mẫu sạch, không quan sát thấy các hạt’ ở 5°C sao cho điều này chỉ ra rằng hạt quan sát được liên quan đến protein.

Đối với điều kiện bảo quản 37 °C, điểm số trung bình đối với các mAb sau 56 ngày như sau:

39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR: ‘có rất ít hạt’

39B6-AVE: ‘Mẫu sạch, không quan sát thấy các hạt’.

Dung dịch đệm PBSTw được tính điểm là ‘mẫu sạch, không quan sát thấy các hạt’ ở 37°C sao cho điều này chỉ ra rằng hạt quan sát được liên quan đến protein.

Phân tích bằng SE-HPLC

Sự kết tụ và tạo mảnh protein được xác định bằng SE-HPLC.

Các kết quả kết tụ protein đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR, như được xác định bằng SE-HPLC, được tóm tắt trong bảng 20 dưới đây và được thể hiện trên Fig. 5.

Bảng 20: Mức tạo thành khối kết tụ 20 % được theo dõi bằng SE-HPLC đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

39B6-AVE - % kết tụ (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,0	1,0
7	1,0	1,1	1,2
14	1,0	1,0	2,2
28	0,9	0,9	3,0
56	1,1	1,1	4,4
39B6-AYE - % kết tụ (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,2	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,0
14	1,0	1,0	1,1
28	0,9	0,9	1,4
56	1,1	1,0	0,5
39B6-ANK - % kết tụ (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C

0	1,0	1,0	1,0
28	0,9	0,9	1,1
56	0,9	0,9	0,7
39B6-ANR - % kết tụ (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,1	1,1
28	1,0	1,0	1,3
56	1,0	1,4	1,5

Khi được bảo quản ở 5 °C, không thấy có sự thay đổi về % mức kết tụ đối với các mAb 39B6-AYE, 39B6-AVE và 39B6-ANK trong khoảng thời gian 56 ngày. % mức kết tụ quan sát được là thấp- từ 0,9% đến 1,1%. Một sự gia tăng nhỏ về mức kết tụ quan sát được đối với các mAb 39B6-ANR từ 1,1% đến 1,4%.

Ở 37 °C, không thấy có sự thay đổi về % mức kết tụ đối với các mAb 39B6-AYE và 39B6-ANK. Đối với 39B6-ANR có sự gia tăng nhỏ từ 1,1% ở ngày 0 đến 1,5% ở ngày 56. Đối với 39B6-AVE sự gia tăng về % kết tụ quan sát được từ 1,0% vào ngày 0 đến 4,4% vào ngày 56.

Sự có mặt của các đỉnh mảnh đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR, như được xác định bằng SE-HPLC, như được thể hiện trên bảng 21 và Fig. 6. Do các đỉnh phân mảnh chỉ quan sát được ở 37 °C sau 56 ngày, chỉ những kết quả này được trình bày.

Bảng 21: Mức tạo thành mảnh 21 % được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR ở 56 ngày

39B6-AVE - % phân mảnh (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	0,3
39B6-AYE - % phân mảnh (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	5,7
39B6-ANK - % phân mảnh (%) khi phân tích SE-HPLC			

t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	0,2
39B6-ANR - % phân mảnh (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
56	0	0	0,3

Đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-ANK và 39B6-ANR tỷ lệ % của các đỉnh của mảnh là nằm trong khoảng từ 0,2% đến 0,3% sau 56 ngày trong khi đối với mAb 39B6-AYE tỷ lệ % của các đỉnh của mảnh là 5,7%.

Các kết quả của % đỉnh monome đối với tất cả các mAb được tóm tắt trong bảng 22.

Bảng 22: Vùng monome (%) được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

39B6-AVE - % vùng monome (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	99,0	99,0	99,0
7	99,0	98,9	98,8
14	99,0	99,0	97,8
28	99,1	99,1	97,0
56	98,9	98,9	95,3
39B6-AYE - % vùng monome (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	98,8	99,0	99,0
7	99,0	99,0	99,0
14	99,0	99,0	98,9
28	99,1	99,1	98,6
56	98,9	99,0	93,8
39B6-ANK - % vùng monome (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	99,0	99,0	99,0
28	99,1	99,0	98,9

56	99,1	99,1	99,1
39B6-ANR - % vùng monome (%) khi phân tích SE-HPLC			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	99,0	98,9	98,9
28	99,0	99,0	98,7
56	99,0	98,6	98,2

SDS-PAGE

Các kết quả SDS-PAGE đối với việc phân tích tất cả các kháng thể được thể hiện ở bảng 23 và Fig. 8.

Bảng 23: Tổng tỷ lệ % chuỗi nặng/Ab chiều dài đầy đủ được ước lượng bằng phân tích SDS-PAGE và quét Odyssey đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

	% 39B6-AVE chiều dài đầy đủ					
	Điều kiện không khử			Điều kiện khử		
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C
0	77,2	74,4		96,7	96,6	
7	76,0	78,0	79,8	97,9	98,0	97,8
14	80,3	81,9	79,8	98,4	97,5	97,1
28	82,8	81,9	74,5	96,2	96,1	85,6
56	79,2	80,7	70,7	95,1	94,8	78,6
	% 39B6-AYE chiều dài đầy đủ					
	Điều kiện không khử			Điều kiện khử		
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C
0	74,2	74,6		96,4	97,2	
7	76,5	79,6	77,8	98,4	97,8	98,0
14	77,1	77,9	76,9	97,1	96,5	90,8
28	75,6	77,3	73,6	97,0	98,3	90,3
56	73,4	73,4	59,8	96,4	94,7	88,0
	% 39B6-ANK chiều dài đầy đủ					
	Điều kiện không khử			Điều kiện khử		
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C

0	74,7	71,3		96,7	96,6	
28	70,8	70,7	74,2	97,0	96,9	89,5
56	79,3	78,5	73,6	96,8	96,7	88,1
% 39B6-ANR chiều dài đầy đủ						
t (ngày)	Điều kiện không khử			Điều kiện khử		
	Ref	5 °C	37 °C	Ref	5 °C	37 °C
0	76,2	76,5		97,1	96,9	
28	78,1	78,7	73,5	96,9	96,1	84,9
56	74,1	75,7	70,6	95,5	95,6	79,0

Không có xu hướng phân giải nào được quan sát đối với bất kỳ trong số các mAb trong điều kiện nhiệt độ 5 °C cho cả điều kiện khử và không khử.

Ở 37 °C, tất cả các mAb đã thể hiện tốc độ phân giải tương tự đối với điều kiện không khử đối với mAb 39B6-AYE. mAb này thể hiện tốc độ phân giải tương tự lên đến 28 ngày nhưng chứng tỏ tốc độ phân giải nhanh hơn trong khoảng từ ngày 28 đến ngày 56 so với các mAb khác. Đối với điều kiện khử, tất cả các mAb thể hiện tốc độ phân giải tương tự.

Ái lực gắn kết với đích trên Biacore

Các mẫu được thử nghiệm hoạt tính gắn kết với đích của chúng trên Biacore bằng cách xác định độ dốc ở mỗi thời điểm. Mẫu tham chiếu được thiết lập là 100% hoạt tính. Tất cả các kết quả đối với các mAb được tóm tắt trong bảng 24 và Fig. 9.

Bảng 24: Tỷ lệ % hoạt tính trên Biacore đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

39B6-AVE - Hoạt tính trên Biacore (%)			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	99,5%	99,5%
7	100,0%	111,7%	113,9%
14	100,0%	93,8%	90,2%
28	100,0%	99,0%	68,0%
56	100,0%	96,9%	31,3%
39B6-AYE - Hoạt tính trên Biacore (%)			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	93,5%	93,5%
7	100,0%	103,1%	101,5%

14	100,0%	97,5%	97,5%
28	100,0%	96,7%	96,1%
56	100,0%	103,5%	104,2%
39B6-ANK - Hoạt tính trên Biacore (%)			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	130,1%	130,1%
28	100,0%	101,1%	77,8%
56	100,0%	100,6%	62,4%
39B6-ANR - Hoạt tính trên Biacore (%)			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	100,0%	100,9%	100,9%
28	100,0%	129,1%	85,4%
56	100,0%	85,4%	46,3%

Đối với mẫu mAb được bảo quản ở 37 °C, chỉ có kháng thể 39B6-AYE duy trì được hoạt tính gắn kết với đích trong khoảng thời gian toàn bộ 56 ngày. Tất cả các kháng thể khác thể hiện việc giảm đáng kể hoạt tính gắn kết với đích trong khoảng thời gian 56 ngày khi được bảo quản ở 37 °C.

Nồng độ protein

Nồng độ protein của tất cả các mẫu được xác định cho mỗi điều kiện trên NanoDrop.

Trong bảng 25 và Fig. 10, nồng độ protein đo được đối với tất cả các mAb được thể hiện.

Bảng 25: Nồng độ protein (mg/ml) đối với mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

	39B6-AVE - Nồng độ protein (mg/ml)		
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,1	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,1
14	1,0	1,0	1,1
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,1
	39B6-AYE - Nồng độ protein (mg/ml)		
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,0	1,0
7	1,0	1,0	1,0
14	1,0	1,0	1,0
28	1,0	1,0	1,0

56	1,0	1,0	1,0
39B6-ANK - Nồng độ protein (mg/ml)			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,1	1,1	1,1
28	1,0	1,0	1,1
56	1,1	1,1	1,1
39B6-ANR - Nồng độ protein (mg/ml)			
t (ngày)	Ref	5 °C	37 °C
0	1,0	1,0	1,0
28	1,0	1,0	1,0
56	1,0	1,0	1,0

Tóm tắt và kết luận đối với thử nghiệm độ ổn định với nhiệt độ

Nghiên cứu độ ổn định với nhiệt độ đã phát hiện ra rằng một số sự khác biệt đáng kể giữa bốn mAb được thử nghiệm: mức kết tụ là 4,4% quan sát được trên SE-HPLC đối với mAb 39B6-AVE sau 56 ở 37 °C và mức phân mảnh 5,7% đối với mAb 39B6-AYE. Tuy nhiên, việc phân mảnh này đối với mAb 39B6-AYE không ảnh hưởng đến hoạt tính gắn kết với đích ở 37°C trên Biacore; sau 56 ngày kháng thể này vẫn tốt để làm mẫu tham chiếu. Trong khi đó, hoạt tính gắn kết với đích thấp hơn đối với mAbs 39B6-AVE, 39B6-ANK và 39B6-ANR rõ ràng quan sát được ở 37 °C sau 56 ngày.

2.2.2 Nghiên cứu độ ổn định đông lạnh-rã đông

Để theo dõi độ ổn định của kháng thể trong các điều kiện đông lạnh-rã đông, thiết kế thử nghiệm như sau. Một phần phân ước 1 ml của các mAb (ở 5 mg/ml) được đông lạnh trong ít nhất là 6 giờ ở -20 °C và được rã đông trong 1 giờ ở RT. Chu trình này được lặp lại 9 lần (tổng cộng 10 chu trình đông lạnh/rã đông). Các mẫu được phân tích bằng cách đánh giá trực quan, SE-HPLC, SDS-PAGE, hoạt tính gắn kết với đích trên Biacore và protein nồng độ. Mẫu tham chiếu được bảo quản ở -20 °C được sử dụng cho tất cả các phân tích song song. Do các mAb 39B6-ANR và 39B6-ANK có vị trí khử amin có thể, chỉ tiến hành phân tích bằng đánh giá trực quan.

Kiểm tra trực quan

Các kết quả đánh giá trực quan trong thử nghiệm độ ổn định đông lạnh-rã đông được thể hiện trên bảng 26. Tất cả các mAb là ở trong PBSTw, mà sẽ cho tác dụng ổn định.

Bảng 26: Đánh giá trực quan độ ổn định đông lạnh-rã đông đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

	10x FT
Mẫu	
39B6-AVE	B-B-B
39B6-AYE	B-Af-B
39B6-ANK	A-Bf-Bf
39B6-ANR	A-A-B
Kiểm soát mức kết tụ cao	C-D-D
PBSTw	B-Af-Bf

Các điểm số trung bình này đối với các mAb như sau:

39B6-AVE, 39B6-AYE và 39B-ANK: ‘Rất ít hạt’; và

39B6-ANR: ‘Mẫu sạch, không quan sát thấy các hạt’.

Dung dịch đậm PBSTw được tính điểm bởi hai người là ‘rất ít hạt’ và vì thế, các hạt được thấy trong các mẫu 39B6-AVE, 39B6-AYE và 39B-ANK có thể không liên quan đến protein. Có thể kết luận rằng tất cả các mAb vẫn không thay đổi sau 10 chu kỳ đông lạnh/rã đông.

Phân tích bằng SE-HPLC

Sự kết tụ và tạo mảnh protein được xác định bằng SE-HPLC.

Kết quả kết tụ protein đối với thử nghiệm độ ổn định đông lạnh/rã đông đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được tóm tắt trong bảng 27.

Bảng 27: Mức tạo thành khối kết tụ 27 % được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước trong thử nghiệm độ ổn định đông lạnh/rã đông đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE

	39B6-AVE		39B6-AYE	
Mẫu	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	1,0	1,0	1,0	0,9

Không có sự thay đổi nào về tỷ lệ % mức kết tụ quan sát được cho cả mAb sau 10 chu kỳ đông lạnh-ra đông so với các mẫu tham chiếu.

Các diện tích của đỉnh monome cho các lần bơm khác nhau cũng được kiểm tra. % vùng monome đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được tóm tắt trong bảng 28.

Bảng 28: Diện tích vùng monome 28 % được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước trong thử nghiệm độ ổn định đông lạnh-rã đông đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE.

	39B6-AVE		39B6-AYE	
Mẫu	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	99,0	99,0	99,0	99,1

Không có sự thay đổi về % vùng monome quan sát được đối với cả hai mAb sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông so với mẫu tham chiếu.

Phân tích bằng SDS-PAGE

Mẫu đông lạnh-rã đông được phân tích tính toàn vẹn của chúng bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử và không khử. Các kết quả được thể hiện ở bảng 29 và Fig. 11 đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE.

Bảng 29: Tổng tỷ lệ % của Ab/chuỗi nặng/Ab chiều dài đầy đủ được ước lượng bằng phân tích SDS-PAGE và quét Odyssey trong thử nghiệm độ ổn định đông lạnh-rã đông đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE

	% 39B6-AVE chiều dài đầy đủ			
	Điều kiện không khử		Điều kiện khử	
Mẫu	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	78,1	79,3	95,9	96,1
	% 39B6-AYE chiều dài đầy đủ			
	Điều kiện không khử		Điều kiện khử	

Mẫu	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	78,8	78,7	96,3	97,0

Không quan sát thấy có sự thay đổi đối với của cả hai mAb sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông.

Phân tích việc gắn kết với đích bằng Biacore

Các mẫu được thử nghiệm hoạt tính gắn kết với đích của chúng trên Biacore bằng cách xác định độ dốc sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông. Mẫu tham chiếu được thiết lập là 100% hoạt tính. Kết quả đối với cả hai mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được thể hiện ở Fig. 12.

Các kết quả chứng tỏ được rằng sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông không quan sát thấy có sự thay đổi về hoạt tính gắn kết với đích.

Phân tích nồng độ protein

Nồng độ protein của mẫu đông lạnh-rã đông được xác định trên NanoDrop.

Trong bảng 30, nồng độ protein đo được đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE sau 10 chu trình đông lạnh-rã đông được thể hiện. Tương tự, Fig. 13 thể hiện các kết quả đối với cả hai mAb.

Bảng 30: Nồng độ protein (mg/ml) trong thử nghiệm độ ổn định đông lạnh-rã đông đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE

Mẫu	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	10x FT	Ref	10x FT
	1,0	1,1	1,0	1,0

Kết luận

Nghiên cứu độ ổn định đông lạnh-rã đông đã không cho thấy có sự khác biệt đáng kể nào đối với các mAb thử nghiệm 39B6-AVE và 39B6-AYE.

2.2.3 Nghiên cứu độ ổn định với nhiệt độ

Để phân tích đường cong nóng chảy, các mAb được làm nóng theo sơ đồ dưới đây. Trong khi hoàn thành chu trình nhiệt trong thiết bị PCR, các mẫu được thử nghiệm ái lực trên Biacore.

Quy trình được sử dụng như sau:

- 1) Các phần phân ước 1 ml cho mỗi mAb được bảo quản trong các ống thủy tinh ở -20°C lúc bắt đầu thử nghiệm.
- 2) Sau một tuần bảo quản, chúng được rã đông một lần.
- 3) Các mAb được pha loãng ở nồng độ 1 mg/ml như bình thường và sau đó được pha loãng thêm ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ (độ pha loãng 10 lần: 200 μl + 1800 μl PBSTw)
- 4) Các mAb đã pha loãng được chia thành các phần phân ước trong đĩa PCR (50 μl /lỗ)
- 5) Giữ mẫu đủ và cả mẫu ở 5°C làm tham chiếu để phân tích song song.
- 6) 1 giờ trong thiết bị PCR được phơi ra ở các nhiệt độ được nêu dưới đây
- 7) 2 giờ trong thiết bị PCR ở 25°C
- 8) Ở 4°C trong thiết bị PCR
- 9) Chuẩn bị mẫu và các mẫu tham chiếu để phân tích ở nồng độ 4 $\mu\text{g/ml}$ (độ pha loãng 25 lần: 168 μl dung dịch đệm Biacore + 7 μl mẫu)

Chạy theo chương trình trong thiết bị PCR gradien:

Nhiệt độ nắp		80 $^{\circ}\text{C}$	 $(^{\circ}\text{C}/\text{giây})$
Bước 1	54,6 – 71,4 $^{\circ}\text{C}$	60 phút 120	
Bước 2	25 $^{\circ}\text{C}$	phút	
Bước 3	4 $^{\circ}\text{C}$	ngừng	

Quy trình phân tích Biacore:

- Chip CM5 tương tự, được phủ bằng ~4000 RU phức hợp GARP-TGF- β người được sử dụng
- Mở các đường cong trong chương trình BIAEvaluation và chọn giá trị '2-1' (1: trống, 2 hGARP-TGF- β)
- Chọn một đường cong tại thời điểm chồng phủ đồ thị.

- Xóa các phần tái tạo của đường cong
- Chọn đường cơ sở ngay trước khi bơm và chuyển trục Y về '0 ở trung vị của vùng chọn'.
- Chọn 'phù hợp chung' (General Fit), bắt đầu từ 120 giây sau khi bơm và kết thúc ở 155 giây.
- Để tính IC50: Độ độc với các mẫu tham chiếu ở 5°C được định mức là 100%. Tỷ lệ % (trục Y) của các nhiệt độ khác (trục X) có thể được tính.

Khả năng chịu nhiệt của bốn mAb được xác định và kết quả được tóm tắt trên Fig. 14. Nhiệt độ nóng chảy được tính là nhiệt độ mà tại đó 50% kháng thể vẫn có chức năng. Mẫu tham chiếu được giữ ở 5°C được thiết lập là có hoạt tính 100%. Các nhiệt độ nóng chảy được thể hiện trên bảng 31.

Bảng 31: Nhiệt độ nóng chảy trong thử nghiệm độ ổn định nhiệt độ

mAb	Nhiệt độ nóng chảy
39B6-AVE	67,0 °C
39B6-AYE	66,5 °C
39B6-ANK	69,1 °C
39B6-ANR	68,6 °C

Các mAb 39B6-ANK và 39B6-ANR thể hiện nhiệt độ nóng chảy cao nhất: 69,13 °C và 68,55 °C, lần lượt. Các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE cũng có nhiệt độ nóng chảy tốt, lần lượt là 66,99 °C và 66,53 °C. Tất cả các nhiệt độ nóng chảy đối với các mAb có thể được coi là cao.

Kết luận của thử nghiệm độ ổn định nhiệt độ

Bốn mAb đã chứng tỏ khả năng chịu nhiệt tốt. Các nhiệt độ nóng chảy có thể so sánh với mAb 39B6-A ban đầu trong nghiên cứu độ ổn định trước đó, 66,8 °C.

2.2.4 Nghiên cứu độ ổn định quay

Đối với nghiên cứu độ ổn định quay, thiết kế thử nghiệm như sau. Các phần phân ước 1 ml cho mỗi mAb được bảo quản trong các ống thủy tinh ở -20 °C lúc bắt

đầu thử nghiệm. Sau một tuần bảo quản các phần phân ước này được rã đông một lần và được quay ngược chiều ở tốc độ 15 vòng/phút nhiệt độ trong phòng.

Các mẫu được tính điểm về sự có mặt của các hạt ở các thời điểm được chỉ định.

- Giờ 0, 3, 6, 24, 30, 48, 54, 72 và 96

Các mẫu cũng được phân tích sau 96 giờ bằng SE-HPLC, SDS-PAGE, hoạt tính gắn kết với đích trên Biacore và nồng độ protein. Mẫu tham chiếu được bảo quản ở -20 °C được sử dụng cho tất cả các phân tích song song. Do các mAb 39B6-ANR và 39B6-ANK vẫn có vị trí khử amit có thể, nên chúng chỉ được đánh giá bằng cách đánh giá trực quan

Kiểm tra trực quan

Các kết quả đánh giá trực quan trong thử nghiệm độ ổn định quay được thể hiện trên bảng 32. Tất cả các mAbs là ở trong PBSTw, mà sẽ cho tác dụng ổn định.

Bảng 32: Nghiên cứu độ ổn định quay bằng đánh giá trực quan đối với các mAb 39B6-AVE, 39B6-AYE, 39B6-ANK và 39B6-ANR

	0 giờ	3 giờ	6 giờ	24 giờ	30 giờ	48 giờ	54 giờ	72 giờ	96 giờ
Mẫu									
39B6-AVE	Af-B-Bf	Af-B-Bf	Af-B-Bf	Af-Cf-Cf	Af-Bf-Cf	Af-B-Bf	B-B-Bf	B-B-Bf	B-B-Bf
39B6-AYE	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	B-Bf-Bf	B-Bf-Bf
39B6-ANK	Af-Bf-C	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	B-Bf-Cf	B-Bf-Cf	B-Bf-Cf
39B6-ANR	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf	Af-Bf-Bf
Kiểm soát mức kết tụ cao	C-B-C	C-Df-D	C-Df-D	C-Df-Df	C-Df-Df	C-Df-Df	C-Df-Df	D-Df-Df	D-Df-Df
PBSTw	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A	A-A-A

Tất cả các mAb được phát hiện là có điểm số trung bình là ‘rất ít hạt’ vì vậy chúng vẫn không bị ảnh hưởng đáng kể sau 96 giờ quay. Dung dịch đệm PBSTw không chứa hạt bất kỳ trong điều kiện thực nghiệm được thử nghiệm. Điều này chỉ ra rằng ‘rất ít hạt’ quan sát được được liên quan đến protein trong các mẫu kháng thể.

Phân tích bằng SE-HPLC

Sự kết tụ và tạo mảnh protein được xác định bằng SE-HPLC. Các kết quả kết tụ protein đối với thử nghiệm độ ổn định quay của các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được thể hiện ở bảng 33.

Bảng 33: Mức tạo thành khối kết tụ 33 % được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước trong nghiên cứu độ ổn định quay đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE.

Mẫu	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	96 giờ	Ref	96 giờ
	1,1	1,0	1,0	1,0

Không có sự thay đổi về % mức kết tụ quan sát được đối với các mAb sau áp lực quay khi được so sánh với các mẫu tham chiếu.

Các diện tích của đỉnh monome cho các lần bơm khác nhau cũng được kiểm tra. Các kết quả % diện tích monome đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được thể hiện ở bảng 34.

Bảng 34: Diện tích monome 34 % được theo dõi bằng sắc ký loại trừ theo kích thước trong nghiên cứu độ ổn định quay đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE

Mẫu	39B6-AVE		39B6-AYE	
	Ref	96 giờ	Ref	96 giờ
	98,9	99,0	99,0	99,0

Không có sự thay đổi về % vùng monome quan sát được đối với mAb sau 96 giờ quay khi được so sánh với các mẫu tham chiếu.

Đối với cả hai kháng thể, không có sự thay đổi về profin SE-HPLC quan sát được sau 96 giờ quay khi được so sánh với các mẫu tham chiếu.

Phân tích bằng SDS-PAGE

Các mẫu quay được phân tích tính toàn vẹn của chúng bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử và không khử. Các kết quả được tóm tắt ở bảng 35 đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE.

Bảng 35: Tổng tỷ lệ % của chuỗi nặng/Ab chiều dài đầy đủ được ước lượng bằng phân tích SDS-PAGE và quét Odyssey trong thử nghiệm độ ổn định quay đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE

% 39B6-AVE chiều dài đầy đủ				
Điều kiện không khử			Điều kiện khử	
	Ref	96 giờ	Ref	96 giờ
Mẫu	81,3	76,6	91,0	90,7
% 39B6-AYE chiều dài đầy đủ				
Điều kiện không khử			Điều kiện khử	
	Ref	96 giờ	Ref	96 giờ
Mẫu	76,2	79,0	91,5	92,6

Gel SDS-PAGE đối với cả hai mAb sau 96 giờ quay có thể quan sát được trên Fig. 15.

Không có sự thay đổi quan sát được đối với cả hai kháng thể sau 96 giờ quay.

Phân tích việc gắn kết với đích bằng Biacore

Các mẫu được thử nghiệm hoạt tính gắn kết với đích của chúng trên Biacore bằng cách xác định độ dốc sau 96 giờ quay. Mẫu tham chiếu được thiết lập là 100% hoạt tính. Kết quả đối với cả hai mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được thể hiện ở Fig. 16.

Phân tích nồng độ protein

Nồng độ protein của các mẫu quay được xác định trên NanoDrop.

Trong bảng 36, nồng độ protein đo được đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE sau 96 giờ quay được thể hiện. Tương tự, Fig. 17 thể hiện các kết quả đối với cả hai mAb.

Bảng 36: Nồng độ protein (mg/ml) trong thử nghiệm độ ổn định quay đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE

39B6-AVE			39B6-AYE	
Mẫu	Ref	96 giờ	Ref	96 giờ
	1,0	1,1	1,0	1,1

Không quan sát thấy có sự thất thoát protein đối với cả hai mAb sau 96 giờ quay

Kết luận của thử nghiệm độ ổn định khi quay

Nghiên cứu độ ổn định quay không cho thấy bất kỳ sự khác biệt giữa các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE được thử nghiệm.

2.2.5 Phân tích trình tự sơ cấp bằng cách lập bản đồ peptit

Các mẫu từ nghiên cứu độ ổn định với nhiệt độ, đông lạnh-rã đông và quay được phân tích bằng phương pháp RP-HPLC-UV-MS lập bản đồ peptit thuộc họ trypsin để nhận biết các cải biến (khử amit, isome hóa và oxy hóa) ở mức protein (peptit).

Việc khử amit trong CDR3 của chuỗi nặng ở các vị trí 95-96 (axit amin NE) được thiết kế trong các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE bằng đột biến ở vị trí N95. Vị trí khử amit vẫn có mặt trong các mAb 39B6-ANK và 39B6-ANR và việc khử amit/isome hóa được phát hiện sau 28 ngày ở cả 5 °C và 37 °C trong nghiên cứu độ ổn định nhiệt và cả trong nghiên cứu độ ổn định đông lạnh-rã đông và độ ổn định khi quay. Kết luận được rằng việc khử amit không thể ngăn chặn được bằng cách đưa vào gốc tích điện dương cùng kênh xuôi chiều N95.

Ở vị trí 100f của CDR3 của chuỗi nặng có methionin mà quan trọng cho gắn kết ái lực cao. Các nghiên cứu độ ổn định với nhiệt độ, đông lạnh-rã đông và quay đã chứng tỏ rằng việc oxy hóa M100f không diễn ra ở các mAb 39B6-AYE và 39B6-ANK, trong khi việc oxy hóa vẫn quan sát thấy đối với các mAb 39B6-AVE và 39B6-ANR. Điều này chứng tỏ rằng axit amin ở các vị trí 95 và 96 ảnh hưởng đến độ nhạy của việc oxy hóa đối với methionin sau đó. Bảng 37 thể hiện tổng quan về mức oxy hóa và khử amit của các peptit bao phủ chuỗi nặng CDR3, mà được tạo ra do sự phân giải bằng trypsin.

Bảng 37: Mức độ oxy hóa và khử amit của các peptit trong chuỗi nặng CDR3

	Sự oxy hóa (%)				Sự khử amit (%)			
	5 °C ngày 28	37 °C ngày 28	Quay (96 giờ)	Đông lạnh - rã đông (10 lần)	5 °C ngày 28	37 °C ngày 28	Quay (96 giờ)	Đông lạnh - rã đông (10 lần)
39B6- AVE	1,08	10,51	1,58	3,47	0	0	0	0
39B6- AYE	Dưới giới hạn định lượng (LOQ)				0	0	0	0
39B6- ANK	Dưới giới hạn định lượng (LOQ)				4,72	11,15	3,5	4,75
39B6- ANR	9,20	20,98	19,37	12,47	12,85	34,38	12,79	12,77

* *Dưới giới hạn định lượng (LOQ) = cường độ dạng được oxy hóa gần với mức nền*

Lượng tương đối của mức khử amit và isome hóa N95, hoạt tính gắn kết tương đối của các biến thể được bảo quản ở 37°C được thể hiện trên Fig. 18. Tương tự 39B6-A ban đầu được thể hiện trên hình vẽ (39B6-ANE được đánh dấu). Do N95 được gây bột biến trong các mAb 39B6-AVE và 39B6-AYE, mức khử amit và isome hóa là 0 vì thế không được bao gồm. Mối tương quan giữa việc khử amit N95 và hoạt tính gắn kết với đích giảm quan sát được đối với các mAb 39B6-ANK và 39B6-ANR đề xuất rằng việc khử amit N95 ảnh hưởng bất lợi đến việc gắn kết của mAb với đích của nó.

Kết luận

Biến thể kháng thể GARP-TGF- β 1 39B6-AYE là kháng thể GARP-TGF- β 1 đặc biệt hiệu quả để hướng đến việc phát triển lâm sàng do nó:

- Giữ được khả năng gắn kết ái lực cao với đích của nó, phức hợp GARP-TGF- β 1;
- Thể hiện hiệu lực tốt trong thử nghiệm phosphoryl hóa SMAD2;
- Không trải qua quá trình khử amit hoặc isome hóa ở CDR3 không
- Không trải qua quá trình oxy hóa ở CDR3 không
- Biểu hiện sự tương đồng cao với người (95%)

- Biểu hiện tính ổn định được cải thiện khi được so sánh với 39B6-A, như được xác định bằng các thử nghiệm độ ổn định khác nhau.

Các trình tự CDR và miền biến đổi đối với 39B6-AYE được thể hiện ở các bảng 38 và 39 dưới đây. Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ được thể hiện ở bảng 40. Trình tự polynucleotit mã hóa các miền VH và VL và chiều dài đầy đủ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện ở bảng 41.

Bảng 38: Các trình tự CDR VH và VL đối với 39B6-AYE

39B6-AYE			SEQ ID NO:
VH	CDR1	SYVID	4
	CDR2	RIDPEDAGTKYAQKFQG	12
	CDR3	YEWETVVVGDLMEYEY	13
VL	CDR1	QASQSISSYLA	9
	CDR2	GASRLKT	10
	CDR3	QQYASVPVT	11

Bảng 39: Các trình tự miền VH và VL đối với 39B6-AYE

39B6-AYE		SEQ ID NO:
VH	QVQLVQPGAIEVRKPGASVKVSCKASGYRFTSY YIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGTKYAQK FQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRSEDYAVYY CARYEWETVVVGDLMEYEYWGQGTLLTVS S	14
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLA WYQQKPGQAPKILLYGASRLKTGVPSRFSGSGS GTSFTLTISLEPEDAATYYCQQYASVPVTFGQ GTKVEIK	15

Bảng 40: Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đối với 39B6-AYE

39B6-AYE		SEQ ID NO:
Chuỗi nặng	QVQLVQPGAIEVRKPGASVKVSCKASGYRFTSY YIDWVRQAPGQGLEWMGRIDPEDAGTKYAQK FQGRVTMTADTSTSTVYVELSSLRSEDYAVYY CARYEWETVVVGDLMEYEYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR	16

	VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLG	
Chuỗi nhẹ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLA WYQQKPGQAPKILYIGASRLKTGVPSRFSGSGS GTSFTLTISSELEPEDAATYYCQYASVPVTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	17

Bảng 41: Trình tự polynucleotit mã hóa 39B6-AYE

		SEQ ID NO:
VH	CAAGTCCAACCTTGTCGAACCGGGGGCGGAAG TGCGGAAGCCGGGGGCGAGCGTGAAAGTCT CGTGCAAGGCATCGGGATACCGATTACATC ATATTACATCGACTGGGTCAGGCAAGCGCCG GGGCAAGGGCTGGAATGGATGGGGCGGATC GACCCGGAGGATGCCGGGACGAAATATGCG CAAAAATTCCAAGGGCGCGTCACGATGACGG CCGACACATCGACGAGCACGGTATACGTGGA GCTGAGCTCGCTGAGGAGCGAGGACACCGC GGTATACTACTGCGCGCGATACGAATGGGAG ACCGTCGTCGTCGGGGACCTGATGTACGAAT ACGAATACTGGGGGCAAGGGACGCTTGTCAC GGTCTCGAGC	18
VL	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAGCC TGAGCGCCTCTGTGGGAGATAGAGTCACCAT CACATGCCAGGCTAGTCAGTCAATTTCTAGT TACCTGGCATGGTATCAGCAGAAGCCTGGCC AGGCACCTAAAATCCTGATCTACGGAGCCAG TAGGCTGAAGACAGGGGTGCCATCTCGGTTC TCCGGCAGCGGATCTGGGACATCCTTTACTC TGACCATCTCATCCCTGGAGCCAGAAGACGC CGCTACATACTATTGTCAGCAGTATGCTTCCG TGCCCGTCACATTCGGTCAGGGCACTAAGGT CGAGATCAAG	19
Chuỗi nặng	CAAGTCCAACCTTGTCGAACCGGGGGCGGAAG	20

	TGC GGAAGCCGGGGGCGAGCGTGAAAGTCT CGTGCAAGGCATCGGGATACCGATTACATC ATATTACATCGACTGGGTCAAGCAAGCGCCG GGGCAAGGGCTGGAATGGATGGGGCGGATC GACCCGGAGGATGCCGGGACGAAATATGCG CAAAAATTCCAAGGGCGCGTCACGATGACGG CCGACACATCGACGAGCACGGTATACGTGGA GCTGAGCTCGCTGAGGAGCGAGGACACCGC GGTATACTACTGCGCGCGATACGAATGGGAG ACCGTCGTCGTCGGGGACCTGATGTACGAAT ACGAATACTGGGGGCAAGGGACGCTTGTCAC GGTCTCGAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCC GTGTTCCCCCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCAC CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTG GTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACCG TGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGG CGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAATCCT CCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACA GTGCCCTCCTCCAGCCTGGGCACCAAGACCT ACACCTGTAACTGGTGGACCACAAGCCCTCCAA CACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAATCTAA ATACGGCCCTCCCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCC CTGAATTTCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTG TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGACGTGTCCCAGGAAGATCCAGAGGTG CAGTTCAACTGGTATGTTGACGGCGTGGAAG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGA CCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGA GCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAG GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCG ACATTGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCA GCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCT GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTA CTCTCGGCTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGG CAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCA GAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC	
Chuỗi nhẹ	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAGCC TGAGCGCCTCTGTGGGAGATAGAGTCACCAT	21

	CACATGCCAGGCTAGTCAGTCAATTTCTAGT TACCTGGCATGGTATCAGCAGAAGCCTGGCC AGGCACCTAAAATCCTGATCTACGGAGCCAG TAGGCTGAAGACAGGGGTGCCATCTCGGTTC TCCGGCAGCGGATCTGGGACATCCTTTACTC TGACCATCTCATCCCTGGAGCCAGAAGACGC CGCTACATACTATTGTCAGCAGTATGCTTCCG TGCCCGTCACATTCGGTCAGGGCACTAAGGT CGAGATCAAGCGTACGGTCGCGGCGCCTTCT GTGTTTCATTTTCCCCCATCTGATGAACAGCT GAAATCTGGCACTGCTTCTGTGGTCTGTCTGC TGAACAACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGT CCAGTGGAAAGTGGACAATGCTCTGCAGAGT GGGAATTCCCAGGAATCTGTCACTGAGCAGG ACTCTAAGGATAGCACATACTCCCTGTCCTCT ACTCTGACACTGAGCAAGGCTGATTACGAGA AACACAAAGTGTACGCCTGTGAAGTCACACA TCAGGGGCTGTCTAGTCCTGTGACCAAATCC TTCAATAGGGGAGAGTGC	
--	--	--

Ví dụ 3: Thử nghiệm theo mẻ 39B6-AYE (ARGX-115)

Mẻ dược chất thử nghiệm của ARGX-115 được kiểm tra độ ổn định trong khoảng thời gian ba tháng. Các mẫu thử nghiệm của mẻ dược chất thử nghiệm được bảo quản ở điều kiện bảo quản dự định là -70°C , ở điều kiện bảo quản được tăng tốc là $+5^{\circ}\text{C}$ và điều kiện bảo quản gây áp lực là $+25^{\circ}\text{C}$. Dược chất thử nghiệm được biểu hiện trong công thức 10 mM Histidin/Histidin Hydroclorua, 200 mM Sucroza, 40 mM Arginin, 0,03% (khối lượng/thể tích) polysorbat 80 ở độ pH=6,0 và nồng độ protein là $20,0 \pm 2,0$ mg/ml.

Mẻ dược chất thử nghiệm ARGX-115 được khẳng định là ổn định trong ba tháng khi được bảo quản ở điều kiện bảo quản dự định -70°C . Hoạt tính gắn kết SPR cũng được xác định là thông số đo về độ ổn định. Hoạt tính gắn kết là tỷ lệ % hoạt tính gắn kết của mẫu tham chiếu mà được giữ ở -70°C

Kết quả được thể hiện trong bảng 42 dưới đây.

Phương pháp	Mẫu	Kết quả
ARGX115 Biacore	T3M $+5^{\circ}\text{C}$	101%
	T3M -70°C	106%
	T3M $+25^{\circ}\text{C}$	107%

Các kết quả này khẳng định rằng ARGX-115 ổn định trong thời gian bảo quản kéo dài.

Ví dụ 4: Mô tả đặc điểm của ARGX-115 gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β

4.1 TGF- β trưởng thành là cần thiết để gắn kết ARGX-115

Về bản chất, phức hợp GARP-TGF- β (GARP trong phức hợp với TGF- β tiềm tàng) được thực hiện trong mạng lưới nội chất bằng các tương tác xystein cộng hóa trị (cầu nối disulphua) giữa GARP và TGF β tiềm tàng. Sau đó phức hợp này biểu hiện trên bề mặt tế bào. *In vitro*, phức hợp GARP-TGF- β có thể được tạo thành từ GARP tái tổ hợp của người và TGF- β tiềm tàng (C33S)-3xstrep-tag tái tổ hợp của người. Dạng đột biến C33S của TGF- β tiềm tàng không tạo thành tương tác cộng hóa trị với GARP (hoặc bất kỳ trong số các protein gắn kết TGF- β tiềm tàng (LTBP)) như có mặt ở phức hợp nguyên bản.

Để chứng tỏ ARGX-115 gắn kết với phức hợp GARP tái tổ hợp và TGF β tái tổ hợp tiềm tàng (C33S) được tạo thành *in vitro*, GARP tái tổ hợp được phủ lên đĩa ELISA (1 μ g/mL GARP O/N người ở 4°C), được phong bế bằng tác nhân phong bế (casein-PBS), và TGF- β tiềm tàng (5 μ g/mL 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng) được bắt giữ bằng GARP được phủ. ARGX-115 và isotyp kháng thể đối chứng (1 μ g/mL 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng) được phép gắn kết với phức hợp, và được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG người được liên hợp HRP. Như được thể hiện trên Fig. 19, ARGX-115 được gắn kết với phức hợp GARP-TGF- β tiềm tàng (C33S), trong khi đó isotyp đối chứng thì không.

Thử nghiệm cũng được phát hiện là làm việc theo cách khác. Đĩa ELISA được phủ ARGX-115, hoặc isotyp kháng thể đối chứng (1 μ g/mL ON ở 4°C) và được phong bế bằng tác nhân phong bế (casein-PBS). GARP tái tổ hợp (5 μ g/mL) được bắt giữ bằng kháng thể ARGX-115 được phủ, đĩa này được rửa, và TGF- β tiềm tàng (C33S)-3xstrep-tag tái tổ hợp (5 μ g/mL) được bắt giữ và được phát hiện bằng streptavidin-HRP. Hoạt tính HRP được phát hiện chỉ bằng sự có mặt của ARGX-115 và có trong các lỗ của đĩa được phủ isotyp đối chứng.

Để kiểm tra việc gắn kết của ARGX-115 với phức hợp GARP và peptit liên quan đến trạng thái tiềm tàng (LAP) của TGF- β , phức hợp giữa GARP tái tổ hợp và LAP tái tổ hợp được tạo thành. Đĩa ELISA được phủ bằng GARP tái tổ hợp (1 μ g/mL O/N 4°C), được phong bế bằng tác nhân phong bế (casein-PBS), và LAP (5 μ g/mL) được bắt giữ trên tái tổ hợp GARP được phủ. Việc gắn kết LAP được phát hiện bằng kháng thể kháng -LAP-HRP. Việc gắn kết của kháng thể kháng LAP-HRP chứng tỏ rằng phức hợp GARP-LAP không tạo thành *in vitro*. Tuy nhiên ARGX-115 không thể hiện sự gắn kết bất kỳ với phức hợp GARP-LAP. Hơn nữa, khi đĩa ELISA được phủ bằng ARGX-115 (1 μ g/mL ON 4°C), GARP tái tổ hợp (5 μ g/mL) được bổ sung sau đó là LAP (5 μ g/mL), không có sự gắn kết với kháng thể kháng LAP-HRP được xác định. Các kết quả này chứng tỏ rằng TGF- β trưởng thành là cần thiết cho sự gắn kết của ARGX-115 với phức hợp GARP-TGF- β .

4.2 Tác động của đột biến trong hTGF- β trong phức hợp với GARP lên hoạt tính trung hòa của ARGX-115

Các tế bào 293T biểu hiện ổn định integrin $\alpha\beta 6$ (293Tcl.ITGB6) được chuyển nhiễm tạm thời với hỗn hợp 3 plasmit (hỗn hợp plasmit): (i) plasmit thông báo dCAGA-luc; (ii) GARP của người (pEF-BOS-puro-hGARP); và (iii) TGF- β người WT hoặc TGF- β đột biến (pDisplay). Integrin $\alpha\beta 6$ là một trong hai integrin hoạt hóa TGF- β . Các tế bào 293Tcl.ITGB6 được tách ra và được thu hoạch được thu hoạch từ các chai bán tám dính 75cm², được đếm và được pha loãng thành 1E+06 tế bào/mL, và được phân phối 1mL mỗi ống eppendorf. 250 μ l hỗn hợp plasmit được bổ sung cho mỗi ống để chuyển nhiễm. Ngay sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được chuyển nhiễm được phân phối trong đĩa quang 96 lỗ, ở 50 μ l (tế bào 4E+04) cho mỗi lỗ, chứa các mAb thử nghiệm khác nhau (ARGX-115, LHG10.6, 1D11 và MHG-8 ở 100 μ l/mL). 1D11 là mAb kháng lại dạng hoạt động của isoform TGF- β 1, 2 và 3. MHG-8 và LHG10.6 được mô tả trong WO2015/015003 và WO2016/125017. Sau khi ủ trong thời gian 24 giờ ở 37°C, hoạt tính luciferaza được xác định. Giá trị thu được bằng việc chuyển nhiễm thể đột biến TGF- β được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ % giá trị thu được đối với WT-TGF- β . Kết quả được thể hiện trên Fig. 20. Như có thể quan sát được từ phần hình vẽ, hoạt tính trung hòa của ARGX-115 được xác định đối với đột biến

TGF- β bao gồm phép thế R58A đột biến TGF- β bao gồm phép thế K338E được giảm đáng kể. Điều này chỉ ra rằng hai gốc này trong phức hợp GARP-TGF- β đặc biệt quan trọng đối với hoạt tính trung hòa của ARGX-115.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, mà gắn kết với phức hợp của glycoprotein A có các trình tự lặp chiếm ưu thế (GARP - glycoprotein A repetitions predominant) và TGF- β 1 (Transforming growth factor β 1 - Yếu tố tăng trưởng biến đổi β 1) của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm

miền biến đổi chuỗi nặng (VH), trong đó:

VH CDR3 bao gồm trình tự axit amin YEWETVVVGDLMEYEY (SEQ ID NO: 13),

VH CDR2 bao gồm trình tự axit amin RIDPEDAGTKYAQKFQG (SEQ ID NO: 12), và

VH CDR1 bao gồm trình tự axit amin SYYID (SEQ ID NO: 4); và

miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

VL CDR3 bao gồm trình tự axit amin QQYASVPVT (SEQ ID NO: 11),

VL CDR2 bao gồm trình tự axit amin GASRLKT (SEQ ID NO: 10), và

VL CDR1 bao gồm trình tự axit amin QASQSISSYLA (SEQ ID NO: 9).

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14, và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, còn bao gồm miền CH1, vùng bản lề, miền CH2 và/hoặc miền CH3 của IgG người.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 3, trong đó IgG người là IgG1.

5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 3, trong đó IgG người là IgG4.

6. Polynucleotit được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1.

7. Polynucleotit được phân lập theo điểm 6, bao gồm trình tự SEQ ID NO:18.
8. Polynucleotit được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1.
9. Polynucleotit được phân lập theo điểm 8, bao gồm trình tự SEQ ID NO:19.
10. Polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1.
11. Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit theo điểm 10 được liên kết hoạt động với trình tự điều hòa cho phép biểu hiện kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, miền biến đổi chuỗi nặng, hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ trong hệ biểu hiện tế bào chủ hoặc phi tế bào.
12. Hệ biểu hiện tế bào chủ hoặc phi tế bào chứa vector biểu hiện theo điểm 11.
13. Phương pháp sản xuất kháng thể tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước:

nuôi cấy hệ biểu hiện tế bào chủ hoặc phi tế bào theo điểm 12 trong các điều kiện cho phép biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên; và

thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được biểu hiện.
14. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1 và ít nhất một chất mang hoặc tá dược dược dụng.
15. Kháng thể tái tổ hợp, mà gắn kết với phức hợp của glycoprotein A có các trình tự lặp chiếm ưu thế (GARP) và TGF- β 1 của người, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 16, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 17.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Argenx BVBA

<120> Kháng thể GARP-TGF-B tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, dược phẩm chứa kháng thể này và phương pháp sản xuất kháng thể này

<130> N415743WO

<140> PCT/EP2018/062251

<141> 2018-05-11

<150> GB1707561.5

<151> 2017-05-11

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ser Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu

100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 2

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

1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 4

Ser Tyr Tyr Ile Asp

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 5

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 6

Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu Tyr Glu

1 5 10 15

Tyr

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 7

Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 8

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 9

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 10

Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Llama glama

<400> 11

Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val Thr

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 12

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 13

Tyr Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu Tyr Glu

1 5 10 15

Tyr

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 14

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

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

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 15

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16

<211> 452

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 16

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

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

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr

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

<210> 17

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 17

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 18

<211> 378

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 18

```

caagtccaac ttgtccaacc gggggcggaa gtgcggaagc cgggggcgag cgtgaaagtc   60
tcgtgcaagg catcgggata ccgattcaca tcatattaca tcgactgggt caggcaagcg   120
ccggggcaag ggctggaatg gatggggcgg atcgacccgg aggatgccgg gacgaaatat   180
gcgcaaaaat tccaaggcgg cgtcacgatg acggccgaca catcgacgag cacggtatac   240
gtggagctga gctcgtctgag gagcgaggac accgcggtat actactgcgc gcgatacgaa   300
tgggagaccg tcgtcgtcgg ggacctgatg tacgaatacg aatactgggg gcaagggacg   360
ctgtcacgg tctcgagc                                     378

```

<210> 19

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 19

```

gacatccaga tgactcagag cccttcagc ctgagcgcct ctgtgggaga tagagtcacc   60
atcacatgcc aggctagtca gtcaatttct agttacctgg catggtatca gcagaagcct   120
ggccaggcac ctaaaatcct gatctacgga gccagtaggc tgaagacagg ggtgccatct   180
cggttctcgg gcagcggatc tgggacatcc ttactctga ccatctcatc cctggagcca   240
gaagacgccg ctacatacta ttgtcagcag tatgcttccg tgcccgtcac attcggtcag   300
ggcactaagg tcgagatcaa g                                     321

```

<210> 20

<211> 420

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 20

```

caagtccaac ttgtccaacc gggggcggaa gtgcggaagc cgggggcgag cgtgaaagtc   60
tcgtgcaagg catcgggata ccgattcaca tcatattaca tcgactgggt caggcaagcg   120
ccggggcaag ggctggaatg gatggggcgg atcgacccgg aggatgccgg gacgaaatat   180
gcgcaaaaat tccaaggcgg cgtcacgatg acggccgaca catcgacgag cacggtatac   240
gtggagctga gctcgtctgag gagcgaggac accgcggtat actactgcgc gcgatacgaa   300
tgggagaccg tcgtcgtcgg ggacctgatg tacgaatacg aatactgggg gcaagggacg   360
cttgtcacgg tctcgagcgc tagcaccaag ggcccctcgg tgttcccct ggccccttgc   420

```

<210> 21

<211> 936

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 21

tcccgggtcca cctccgagtc taccgccgct ctgggctgcc tggtgaaaga ctacttcccc 60
 gagcctgtga ccgtgagctg gaactctggc gccctgacct ccggcgtgca caccttcctt 120
 gccgtgctgc aatcctccgg cctgtactcc ctgtcctccg tggtagacagt gccctcctcc 180
 agcctgggca ccaagaccta cacctgtaac gtggaccaca agccttccaa caccaaggtg 240
 gacaagcggg tggaatctaa atacggccct ccctgcccc cctgccctgc ccctgaattt 300
 ctgggcggac ctccgtgtt tctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatctcc 360
 cggacccccg aagtacctg cgtggtggtg gacgtgtccc aggaagatcc agaggtgcag 420
 ttcaactggt atgttgacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggaa 480
 cagttcaact ccactaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 540
 aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaagggcc tgcctccag catcgaaaag 600
 accatctcca aggccaaggg ccagccccg gagccccagg tgtacaccct gcccctagc 660
 caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtgaaagg cttctacccc 720
 tccgacattg ccgtggaatg ggagtccaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 780
 cccctgtgtg tggactccga cggctccttc ttctgtact ctcggctgac agtggataag 840
 tcccgggtggc aggaaggcaa cgtgttctcc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 900
 cactataccc agaagtcctt gtcctgagc ctgggc 936

<210> 22

<211> 126

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu

100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 23

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 24

<211> 126

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Thr Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>

<223> mảnh kháng thể
<400> 25

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 126
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> mảnh kháng thể
<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Arg Asn Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

<211> 126

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 28

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

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

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Ala Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Thr Tyr Glu
 100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 29

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

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

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

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

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

Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ser Val Pro Val Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 30

<211> 126

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 30

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

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

Tyr Ile Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Glu Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Met Tyr Glu
100 105 110

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 31

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mảnh kháng thể

<400> 32

Asn Glu Trp Glu Thr Val Val Val Gly Asp Leu Thr Tyr Glu Tyr Glu
1 5 10 15

Tyr

<210> 33

<211> 662

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Arg Pro Gln Ile Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Thr Leu Gly Leu
1 5 10 15

Ala Ala Gln His Gln Asp Lys Val Pro Cys Lys Met Val Asp Lys Lys
20 25 30

Val Ser Cys Gln Val Leu Gly Leu Leu Gln Val Pro Ser Val Leu Pro
35 40 45

Pro Asp Thr Glu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Asn Gln Leu Arg Ser Ile
50 55 60

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

Ser Thr Asn Glu Ile Ser Phe Leu Gln Pro Gly Ala Phe Gln Ala Leu
85 90 95

Thr His Leu Glu His Leu Ser Leu Ala His Asn Arg Leu Ala Met Ala
100 105 110

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

Leu Asp Leu Ser Gly Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Leu Glu Arg Leu
130 135 140

Leu Gly Glu Ala Pro Ser Leu His Thr Leu Ser Leu Ala Glu Asn Ser
145 150 155 160

Leu Thr Arg Leu Thr Arg His Thr Phe Arg Asp Met Pro Ala Leu Glu
165 170 175

Gln Leu Asp Leu His Ser Asn Val Leu Met Asp Ile Glu Asp Gly Ala
180 185 190

Phe Glu Gly Leu Pro Arg Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Arg Asn Ser
195 200 205

Leu Thr Cys Ile Ser Asp Phe Ser Leu Gln Gln Leu Arg Val Leu Asp
210 215 220

Leu Ser Cys Asn Ser Ile Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ser Gln Pro Gln
225 230 235 240

Ala Glu Phe Gln Leu Thr Trp Leu Asp Leu Arg Glu Asn Lys Leu Leu
245 250 255

His Phe Pro Asp Leu Ala Ala Leu Pro Arg Leu Ile Tyr Leu Asn Leu
260 265 270

Ser Asn Asn Leu Ile Arg Leu Pro Thr Gly Pro Pro Gln Asp Ser Lys
275 280 285

Gly Ile His Ala Pro Ser Glu Gly Trp Ser Ala Leu Pro Leu Ser Ala
290 295 300

Pro Ser Gly Asn Ala Ser Gly Arg Pro Leu Ser Gln Leu Leu Asn Leu
305 310 315 320

Asp Leu Ser Tyr Asn Glu Ile Glu Leu Ile Pro Asp Ser Phe Leu Glu
325 330 335

His Leu Thr Ser Leu Cys Phe Leu Asn Leu Ser Arg Asn Cys Leu Arg
340 345 350

Thr Phe Glu Ala Arg Arg Leu Gly Ser Leu Pro Cys Leu Met Leu Leu
355 360 365

Asp Leu Ser His Asn Ala Leu Glu Thr Leu Glu Leu Gly Ala Arg Ala

370 375 380
Leu Gly Ser Leu Arg Thr Leu Leu Leu Gln Gly Asn Ala Leu Arg Asp
385 390 395 400
Leu Pro Pro Tyr Thr Phe Ala Asn Leu Ala Ser Leu Gln Arg Leu Asn
405 410 415
Leu Gln Gly Asn Arg Val Ser Pro Cys Gly Gly Pro Asp Glu Pro Gly
420 425 430
Pro Ser Gly Cys Val Ala Phe Ser Gly Ile Thr Ser Leu Arg Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Val Asp Asn Glu Ile Glu Leu Leu Arg Ala Gly Ala Phe Leu
450 455 460
His Thr Pro Leu Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Pro Gly Leu Glu
465 470 475 480
Val Ala Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Glu Ala Ser Leu Glu Val Leu
485 490 495
Ala Leu Gln Gly Asn Gly Leu Met Val Leu Gln Val Asp Leu Pro Cys
500 505 510
Phe Ile Cys Leu Lys Arg Leu Asn Leu Ala Glu Asn Arg Leu Ser His
515 520 525
Leu Pro Ala Trp Thr Gln Ala Val Ser Leu Glu Val Leu Asp Leu Arg
530 535 540
Asn Asn Ser Phe Ser Leu Leu Pro Gly Ser Ala Met Gly Gly Leu Glu
545 550 555 560
Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Gln Gly Asn Pro Leu Ser Cys Cys
565 570 575
Gly Asn Gly Trp Leu Ala Ala Gln Leu His Gln Gly Arg Val Asp Val
580 585 590
Asp Ala Thr Gln Asp Leu Ile Cys Arg Phe Ser Ser Gln Glu Glu Val
595 600 605
Ser Leu Ser His Val Arg Pro Glu Asp Cys Glu Lys Gly Gly Leu Lys
610 615 620
Asn Ile Asn Leu Ile Ile Ile Leu Thr Phe Ile Leu Val Ser Ala Ile
625 630 635 640

Leu Leu Thr Thr Leu Ala Ala Cys Cys Cys Val Arg Arg Gln Lys Phe
 645 650 655

Asn Gln Gln Tyr Lys Ala
 660

<210> 34
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
 20 25 30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
 35 40 45

Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
 50 55 60

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
 85 90 95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
 100 105 110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
 115 120 125

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
 145 150 155 160

Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn
 165 170 175

Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
 180 185 190

Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
 195 200 205

Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
210 215 220

Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
225 230 235 240

Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro
245 250 255

Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln
260 265 270

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
275 280 285

Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
290 295 300

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
305 310 315 320

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
325 330 335

Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
340 345 350

Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
355 360 365

Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
370 375 380

Arg Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 35

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
100 105 110

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

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg
245

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

1 5 10

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 41

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro

20 25 30

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

35 40 45

Cys Pro

50

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Cys Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46
Glu Arg Lys
1

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 47
Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
1 5

Fig.1

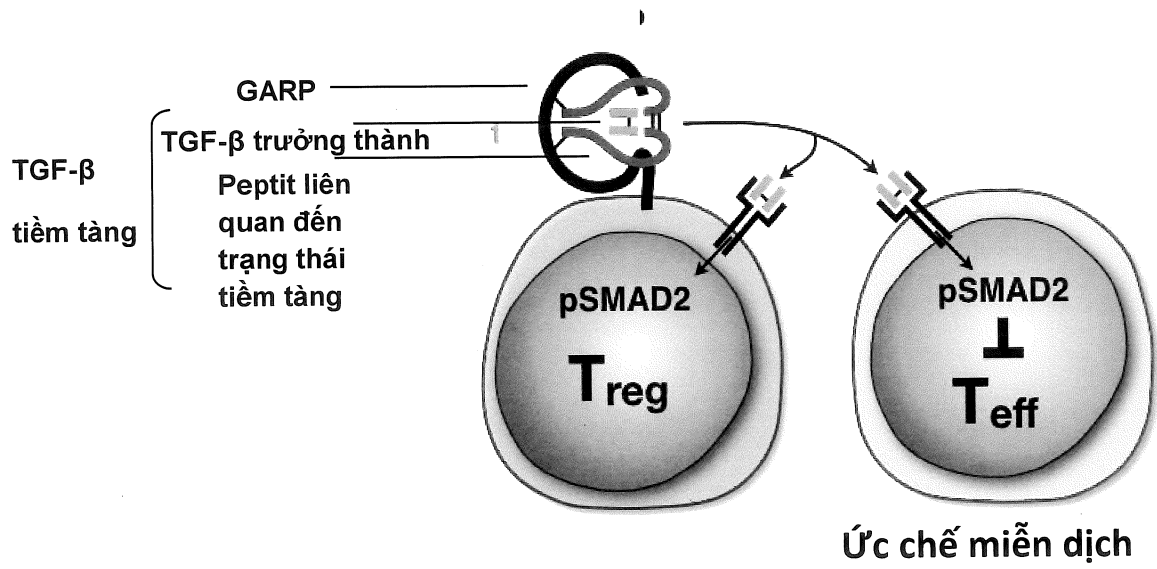


Fig.2

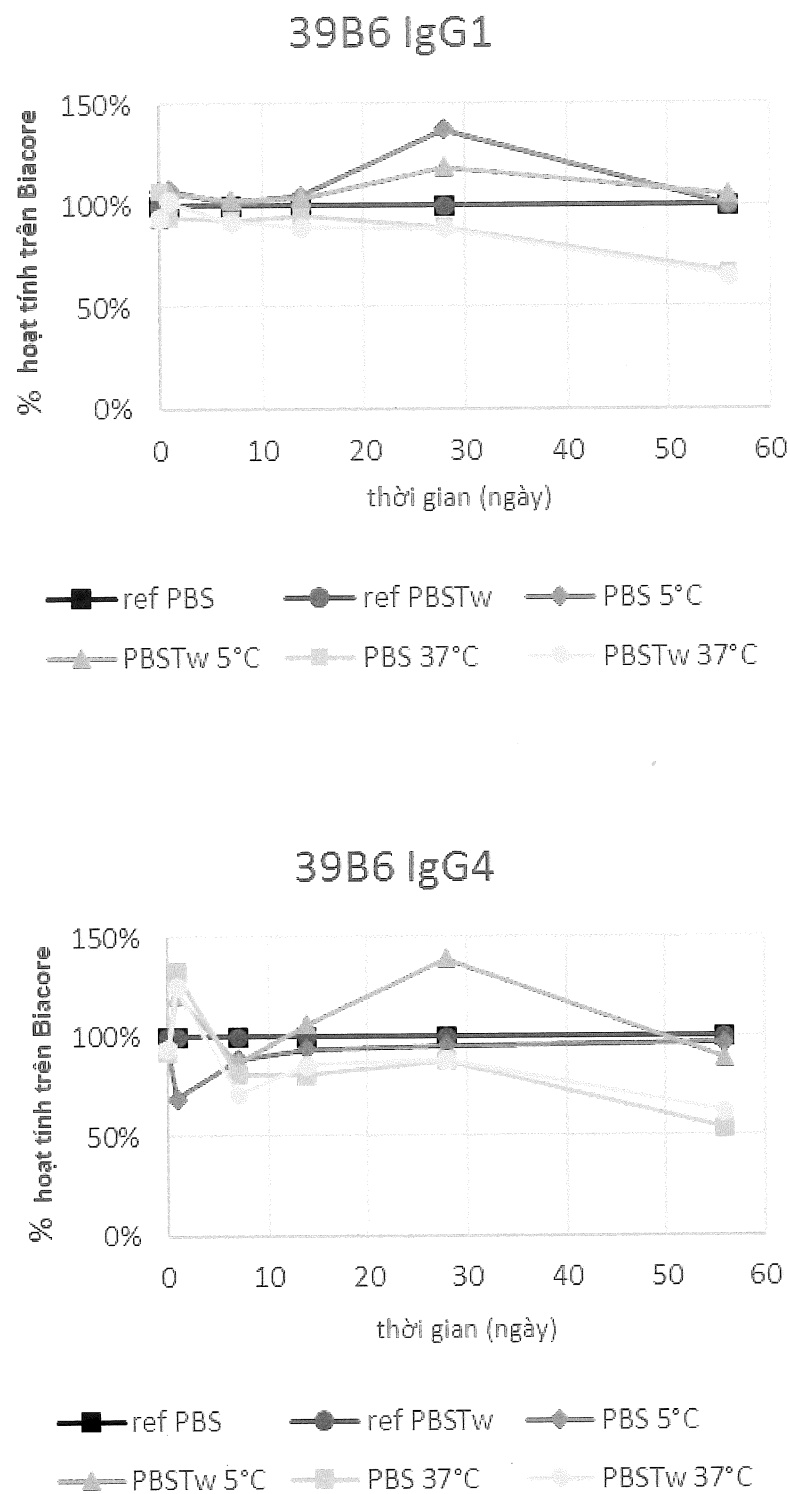


Fig.3

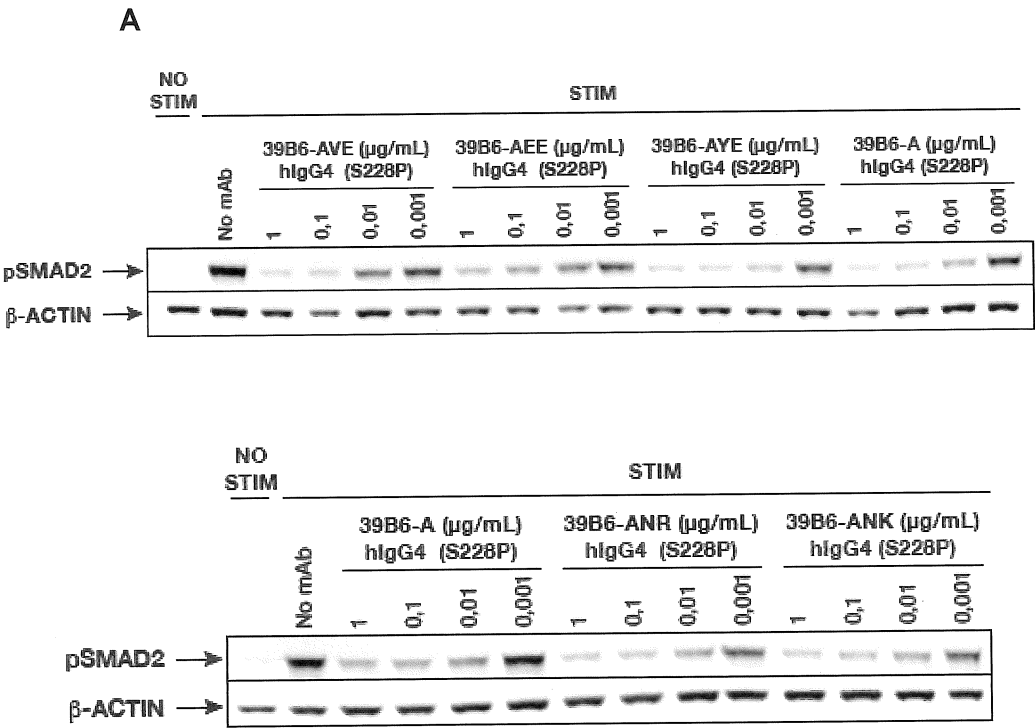
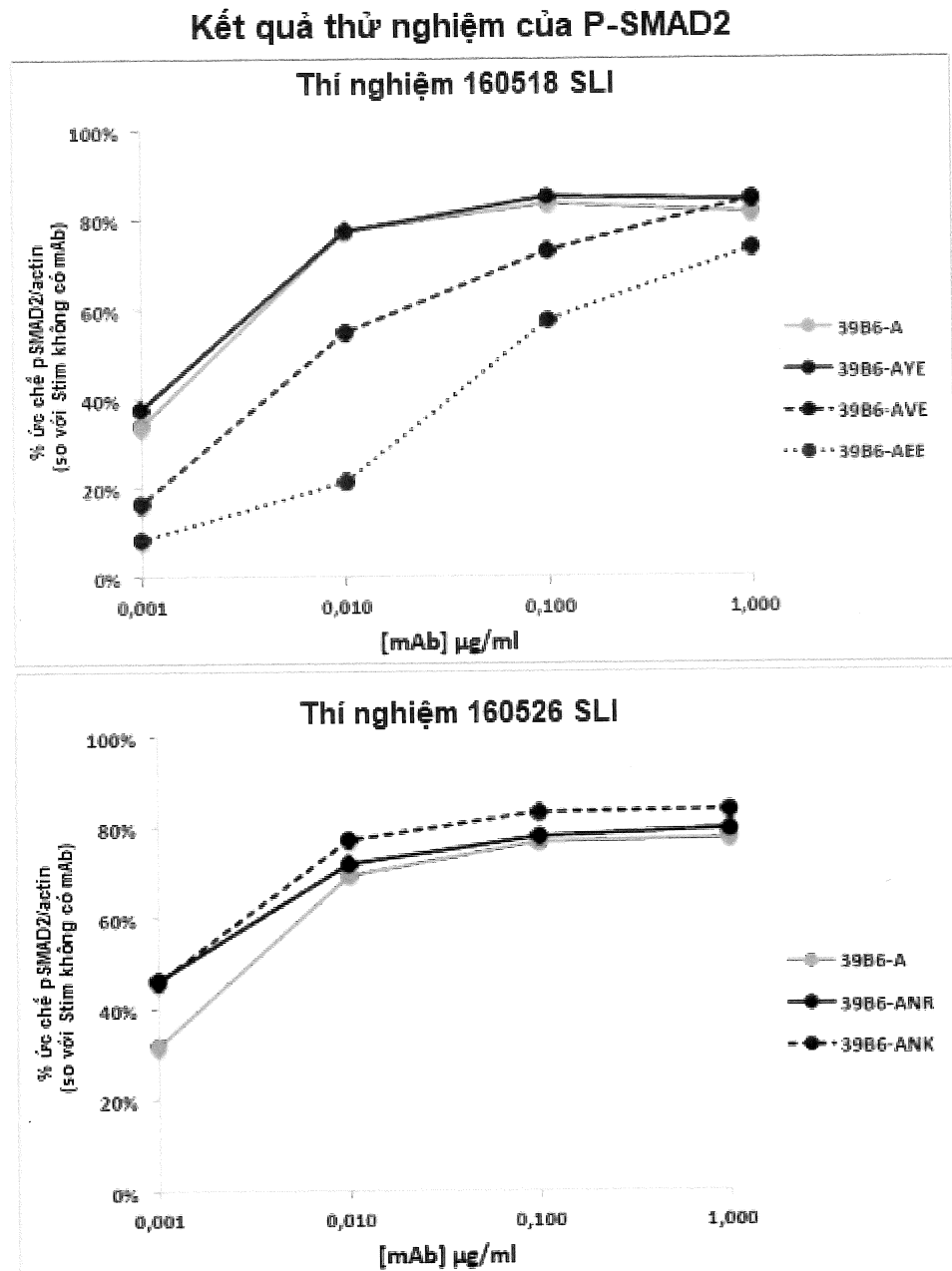


Fig. 3 tiếp theo

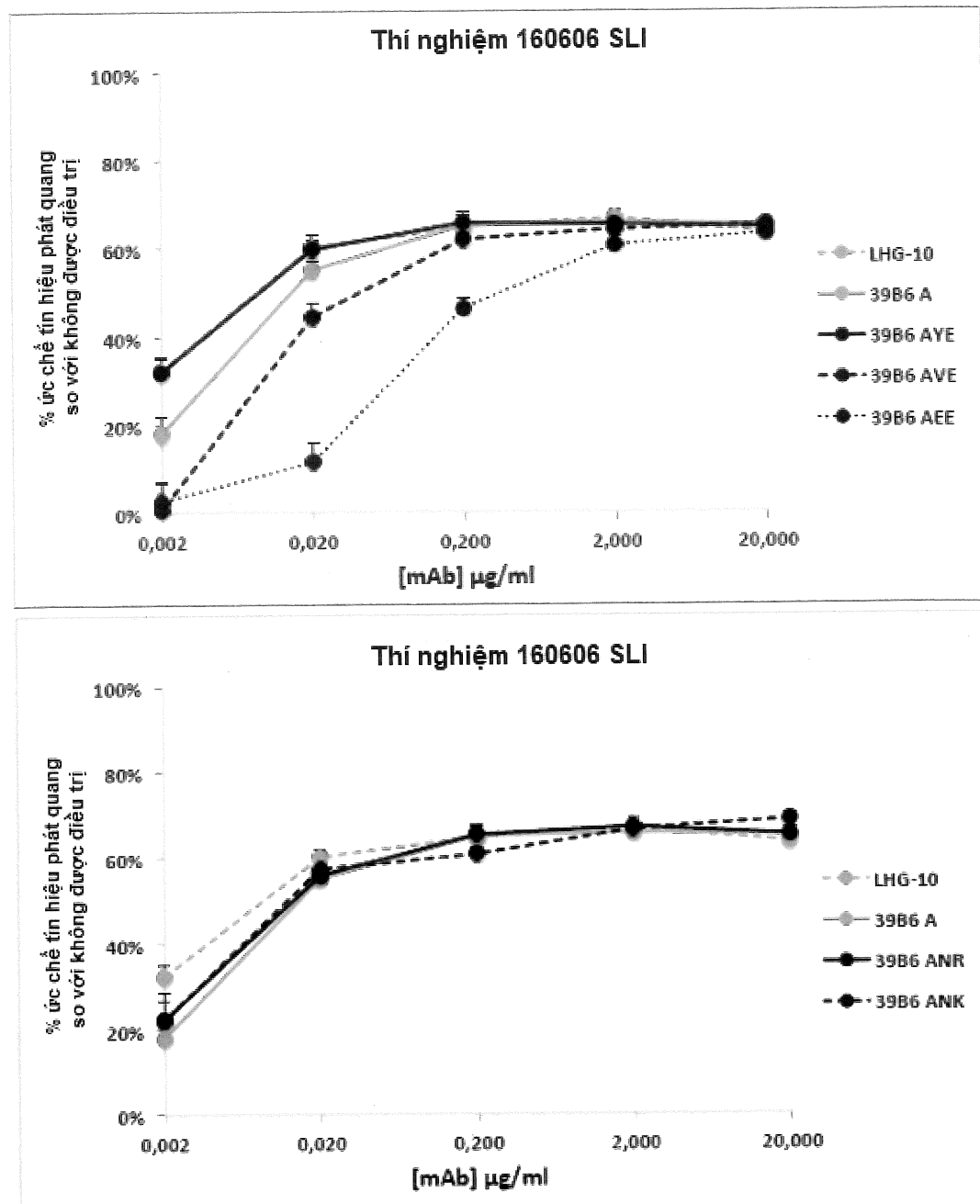
B



5/25

Fig. 4

Kết quả của thí nghiệm GAGA-luc



6/25

Fig. 5

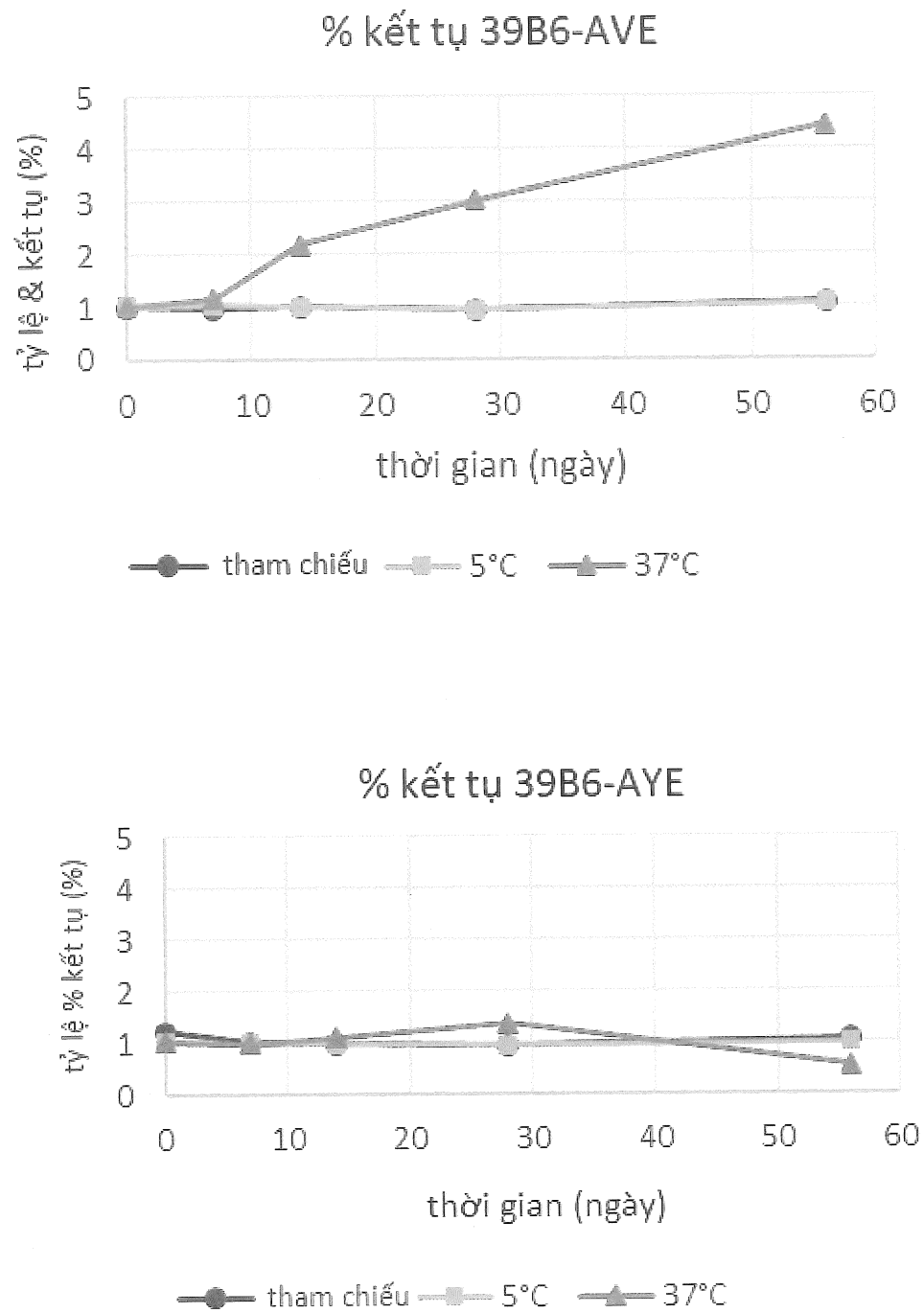


Fig. 5 tiếp theo

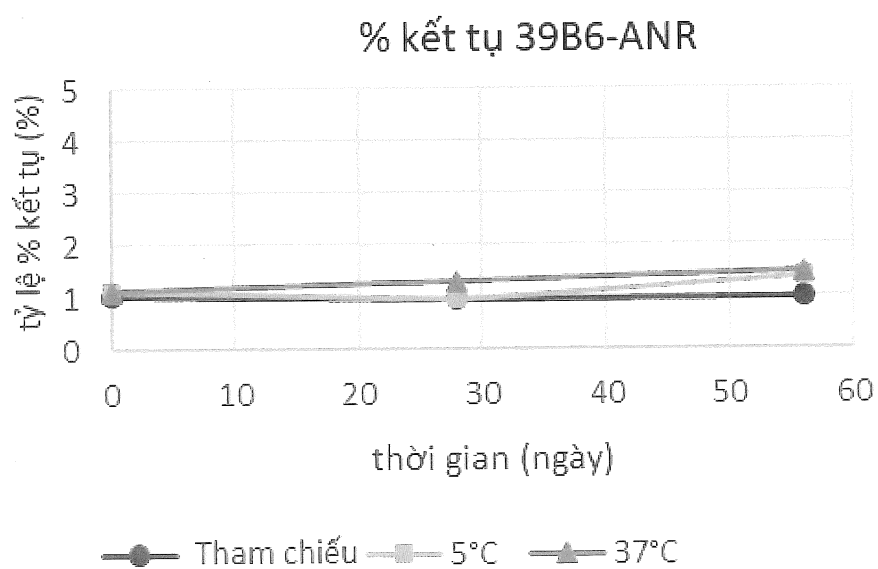
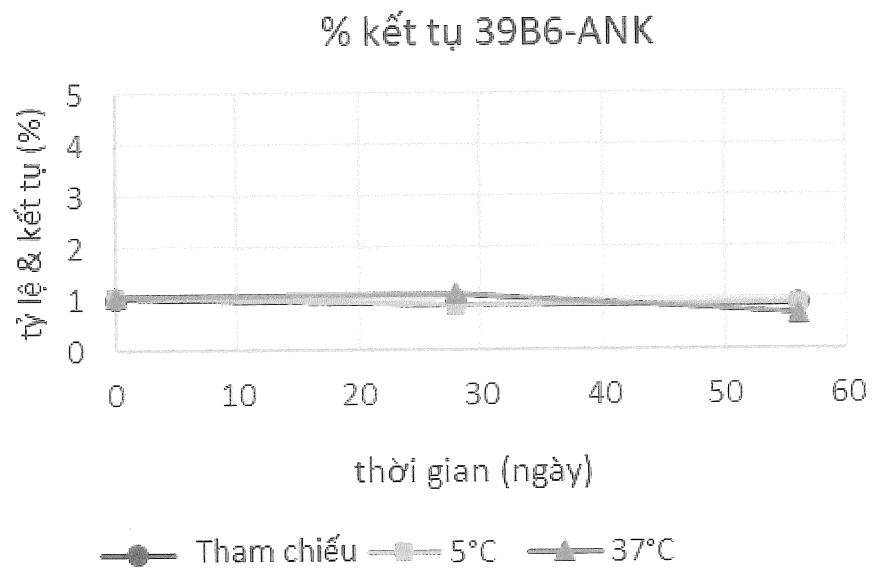
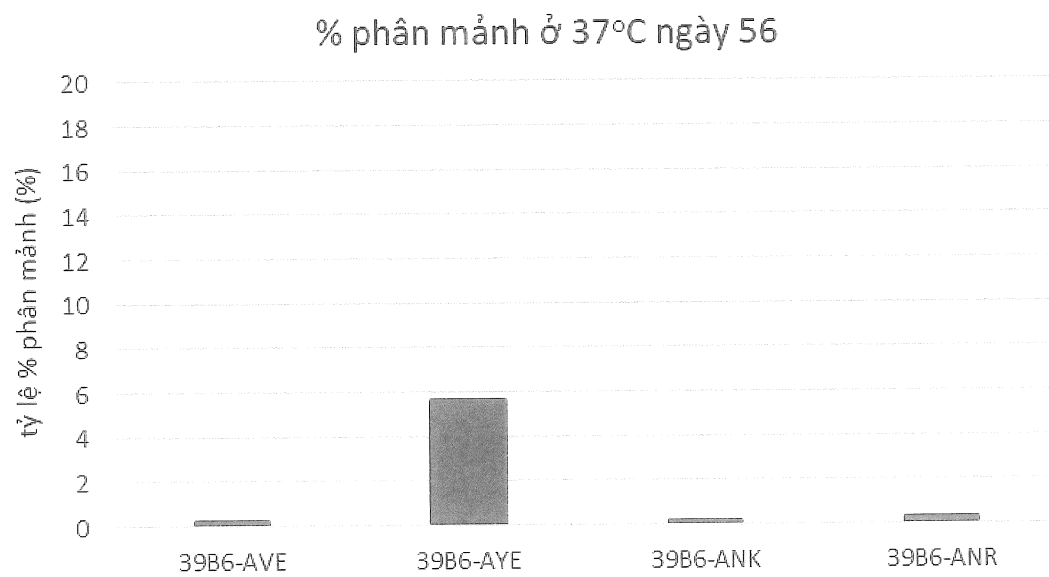
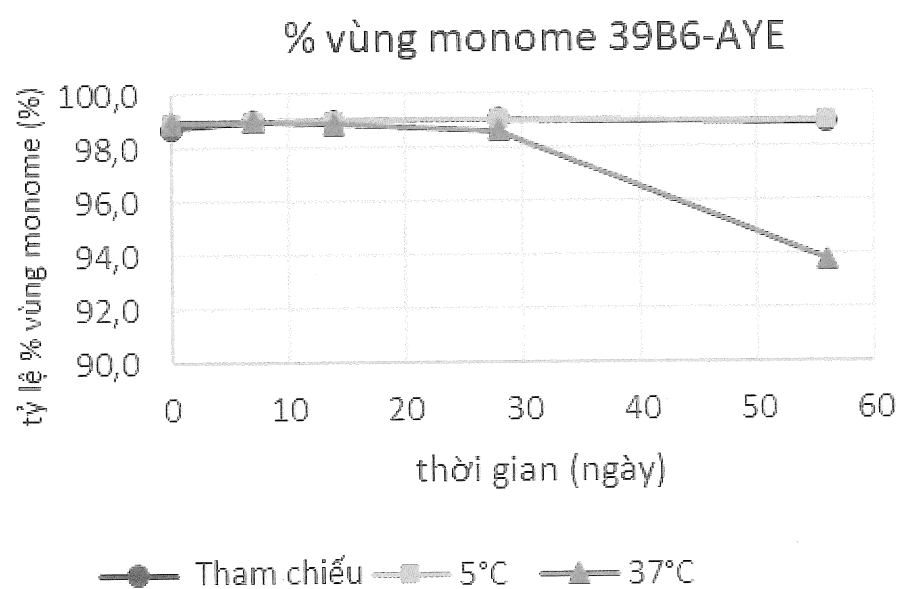
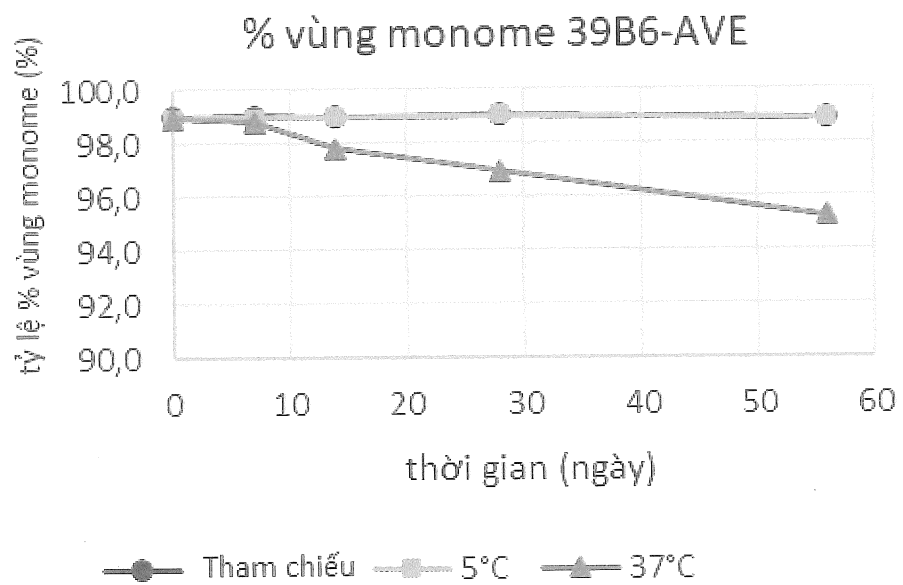


Fig. 6



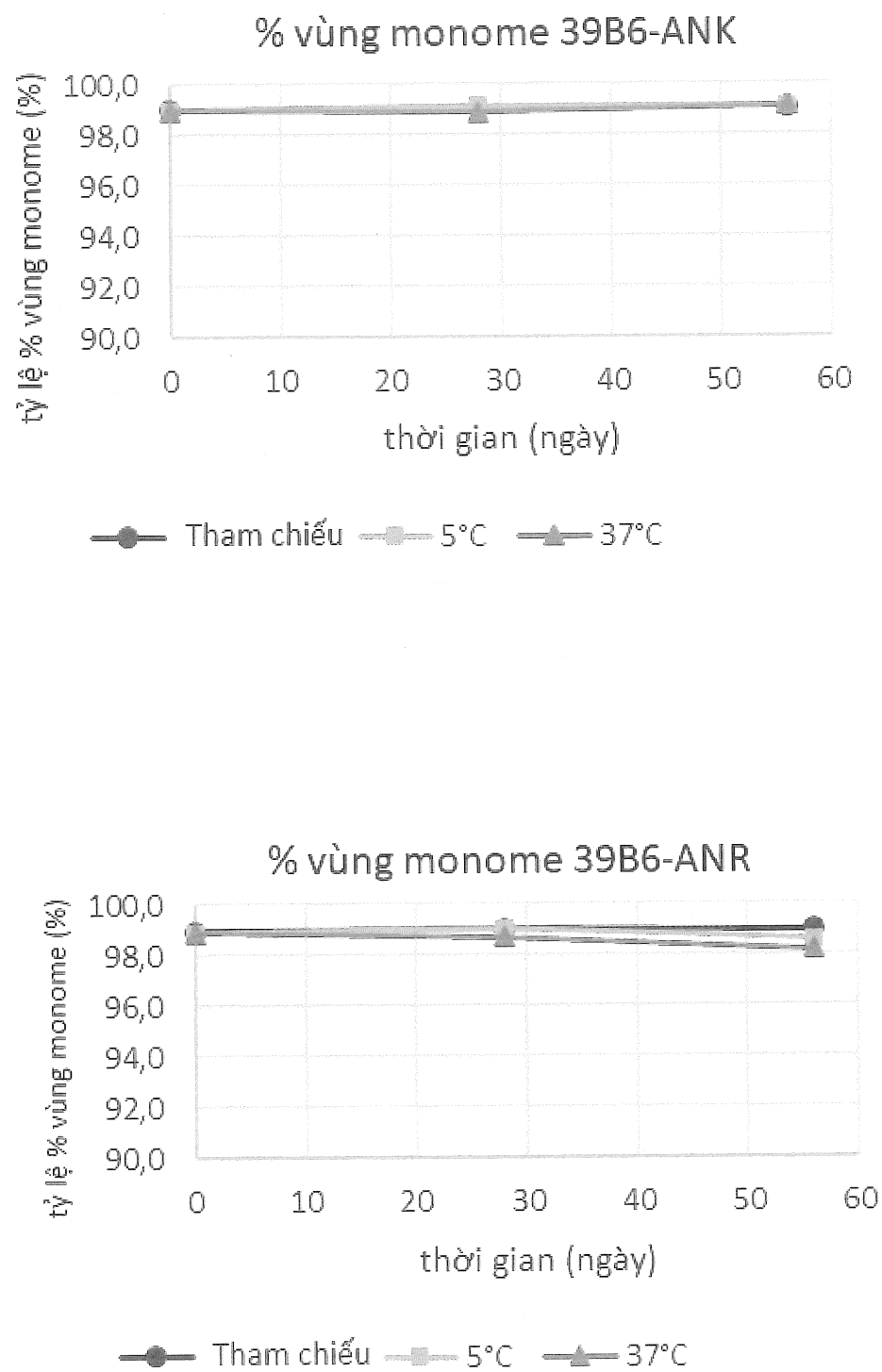
9/25

Fig. 7



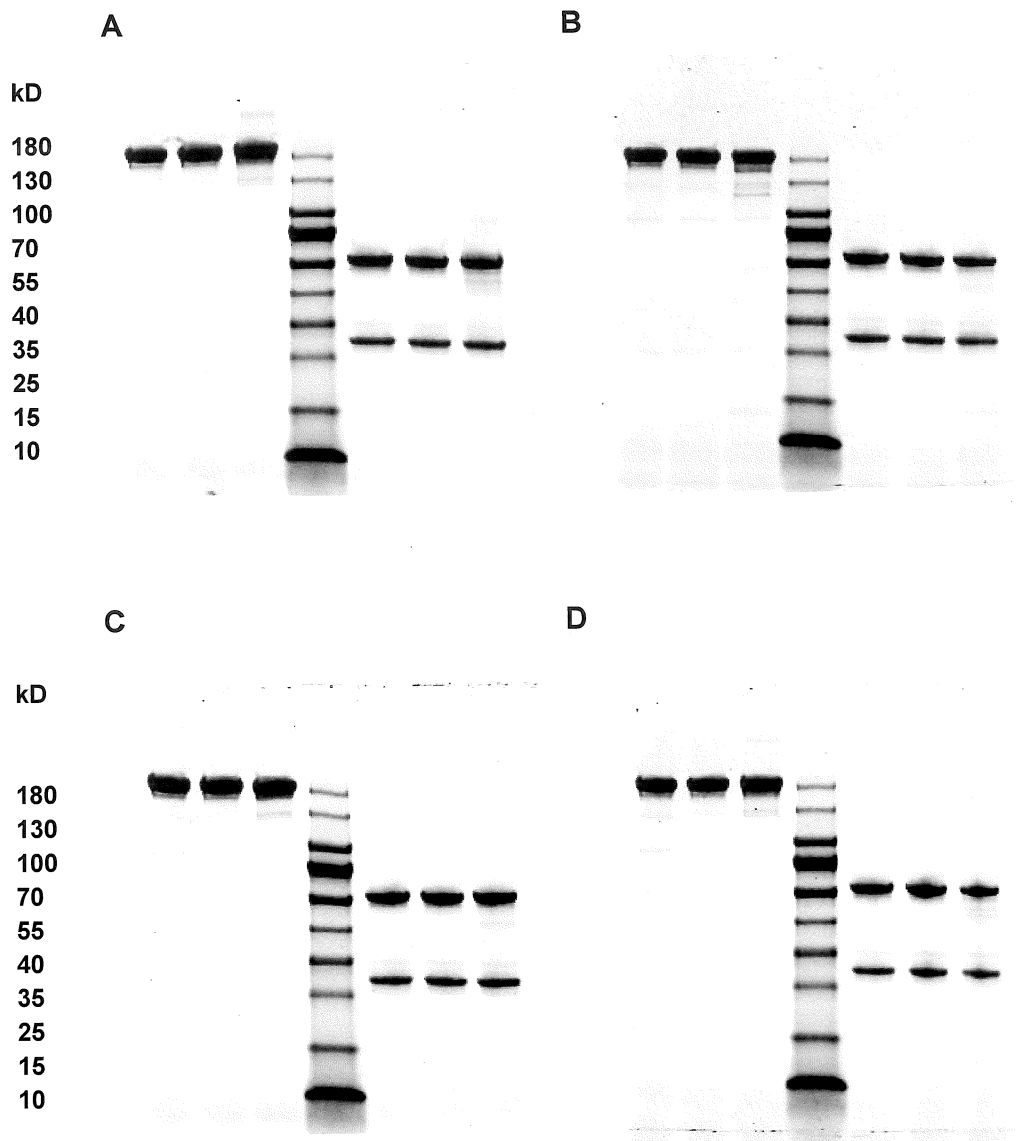
10/25

Fig. 7 tiếp theo



11/25

Fig. 8



12/25

Fig. 9

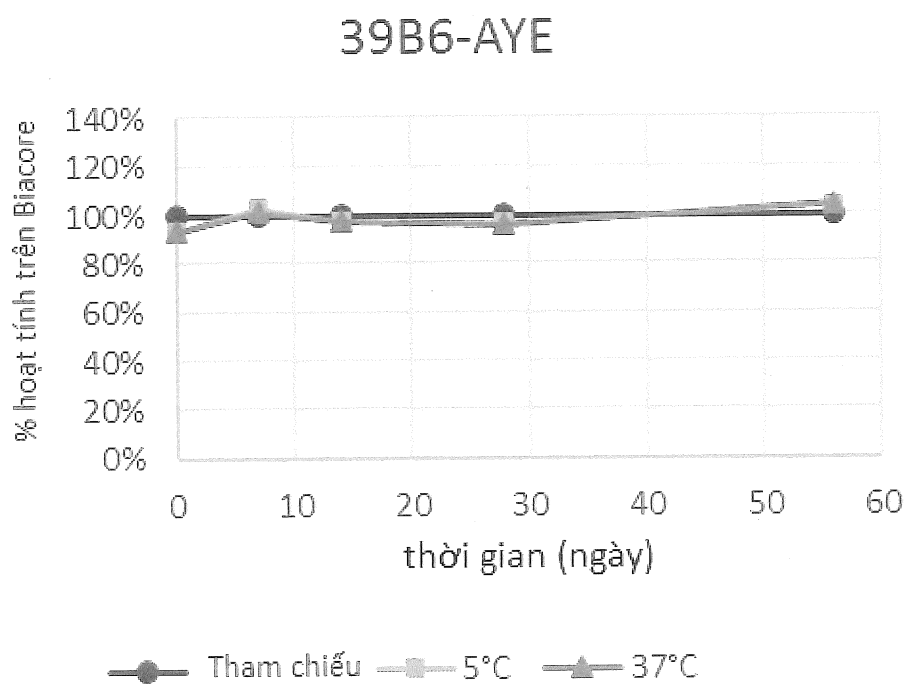
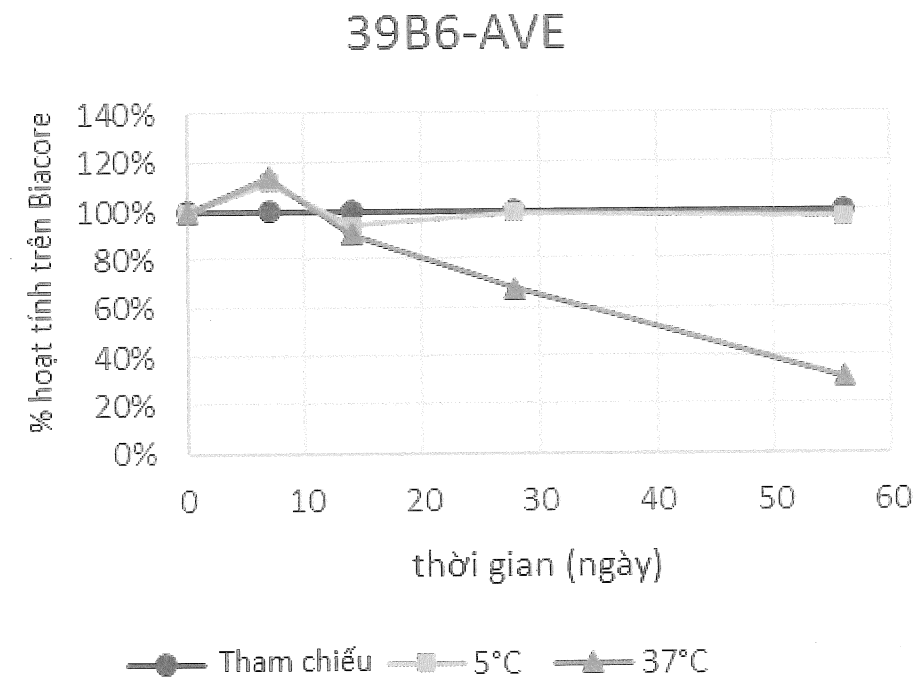


Fig. 9 tiếp theo

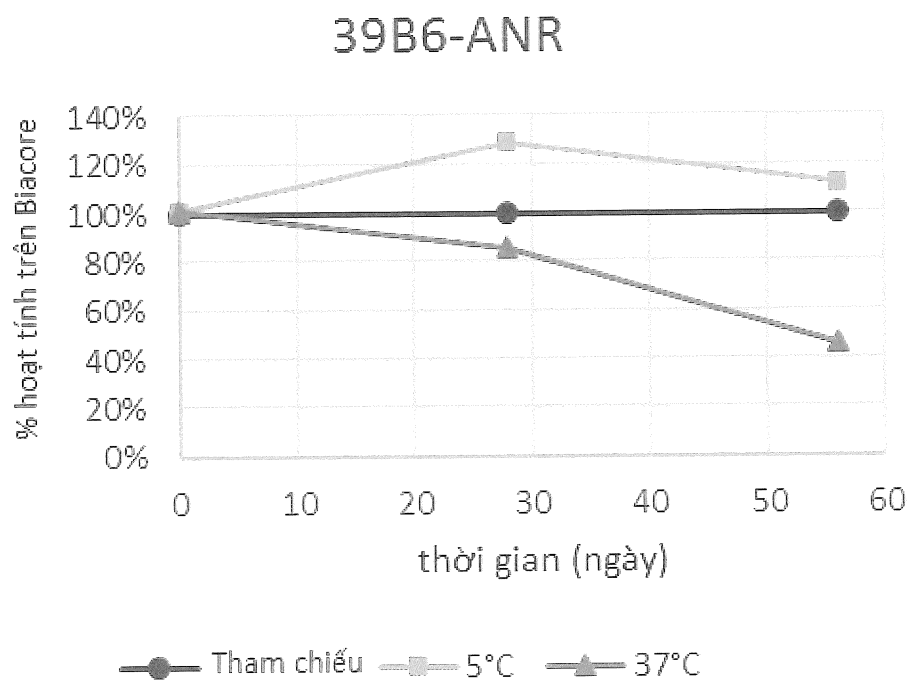
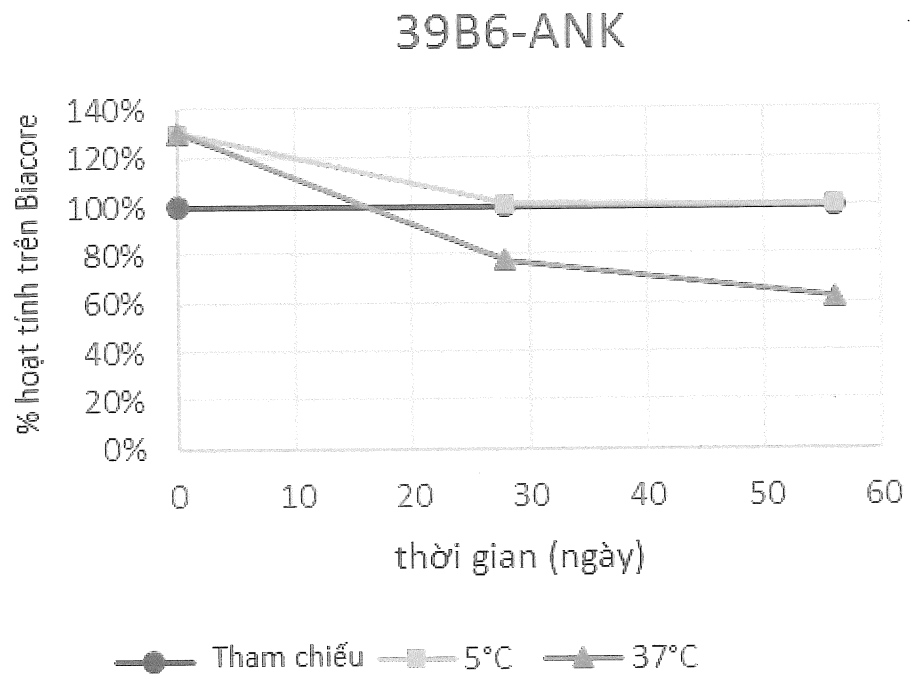
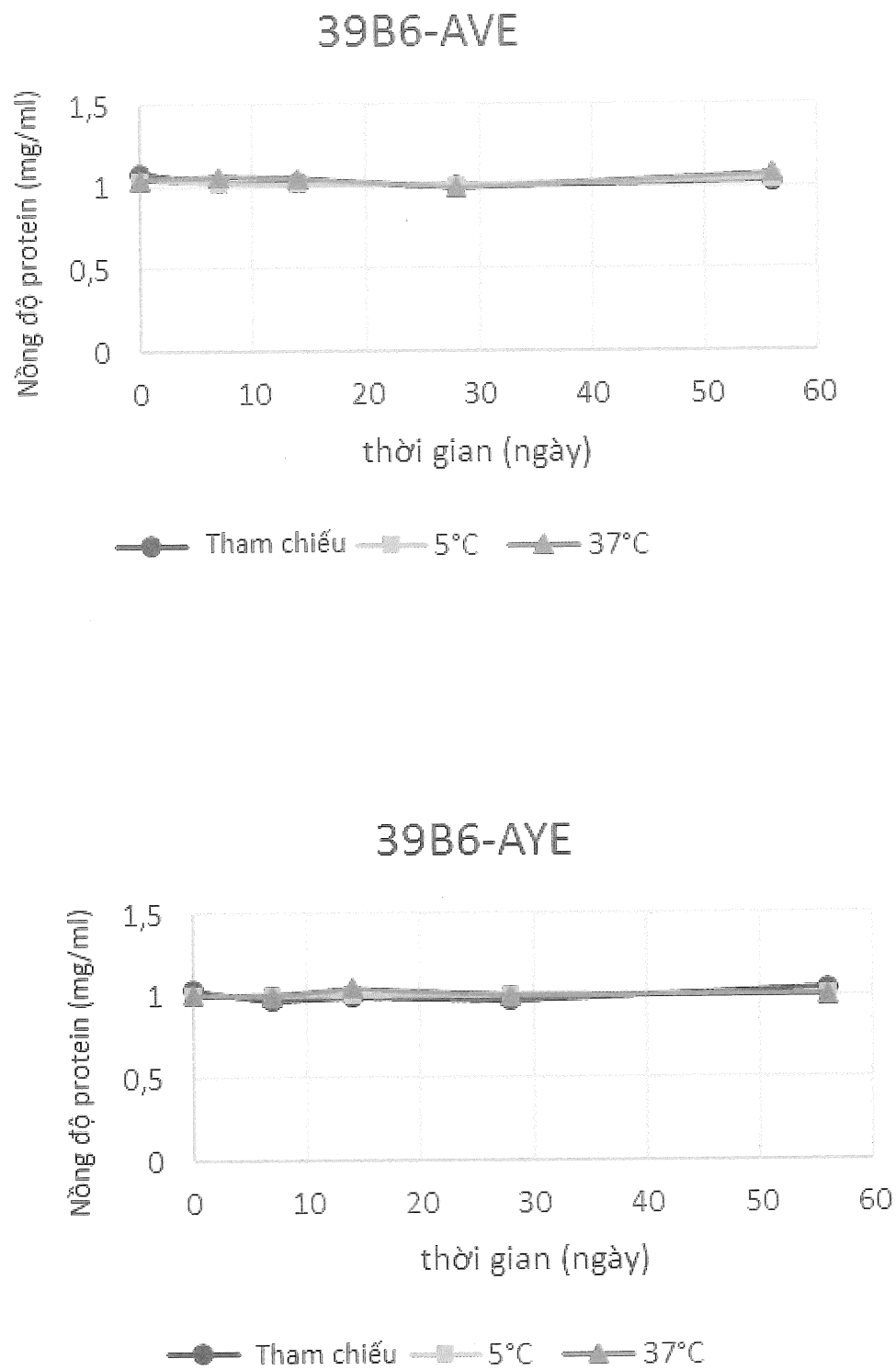
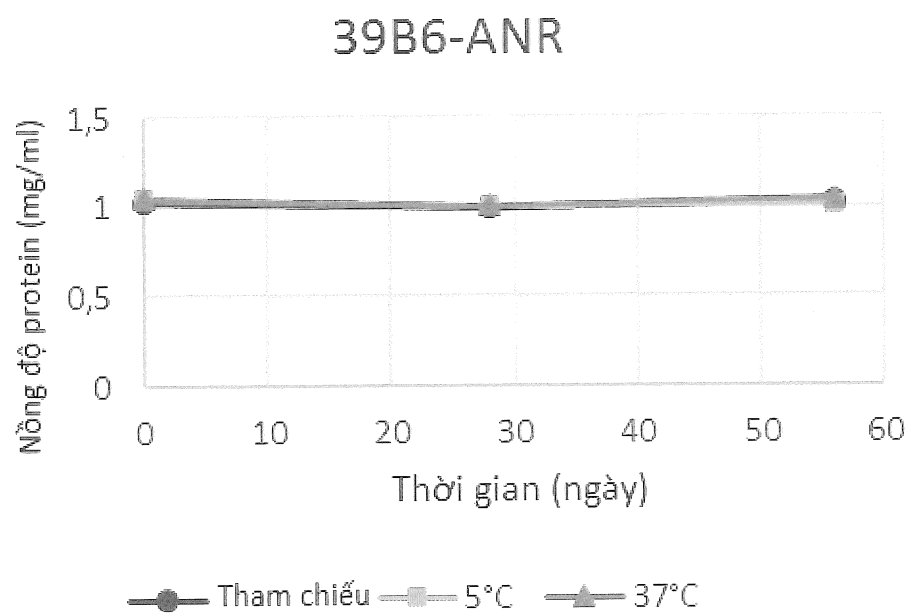
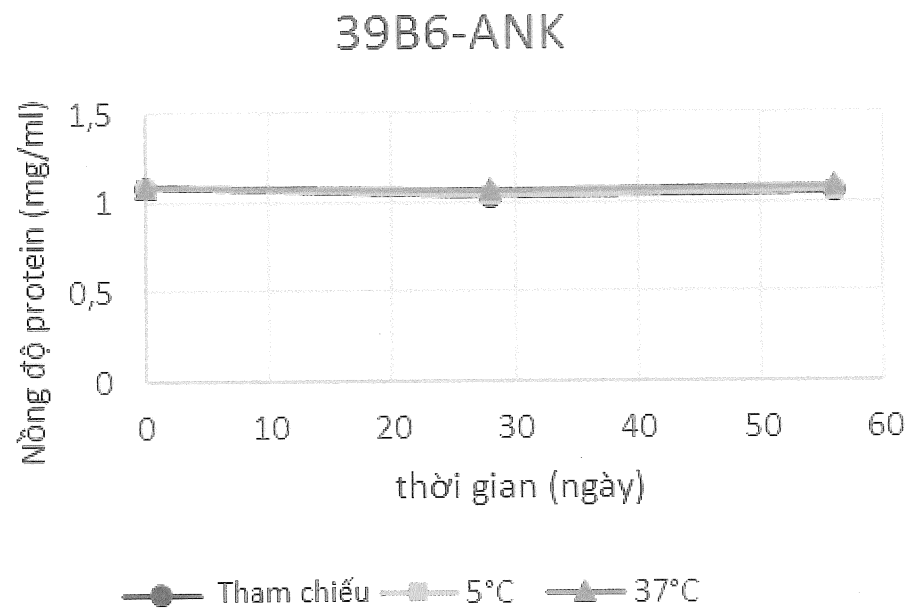


Fig. 10



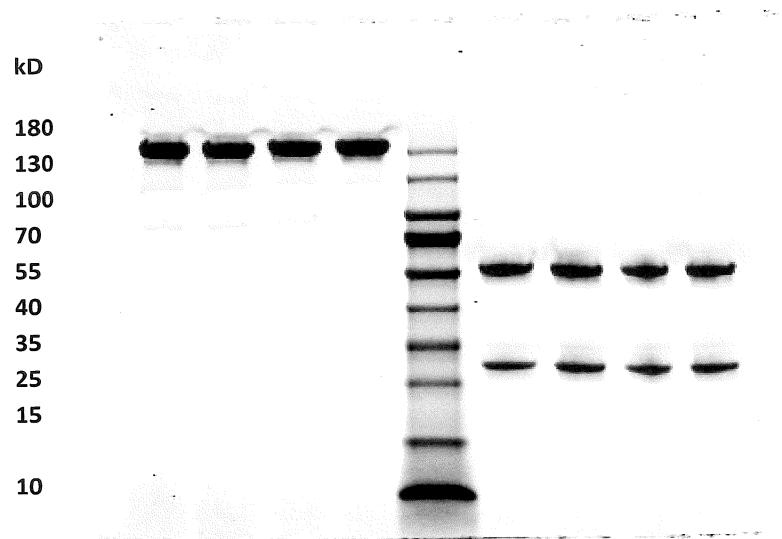
15/25

Fig. 10 tiếp theo



16/25

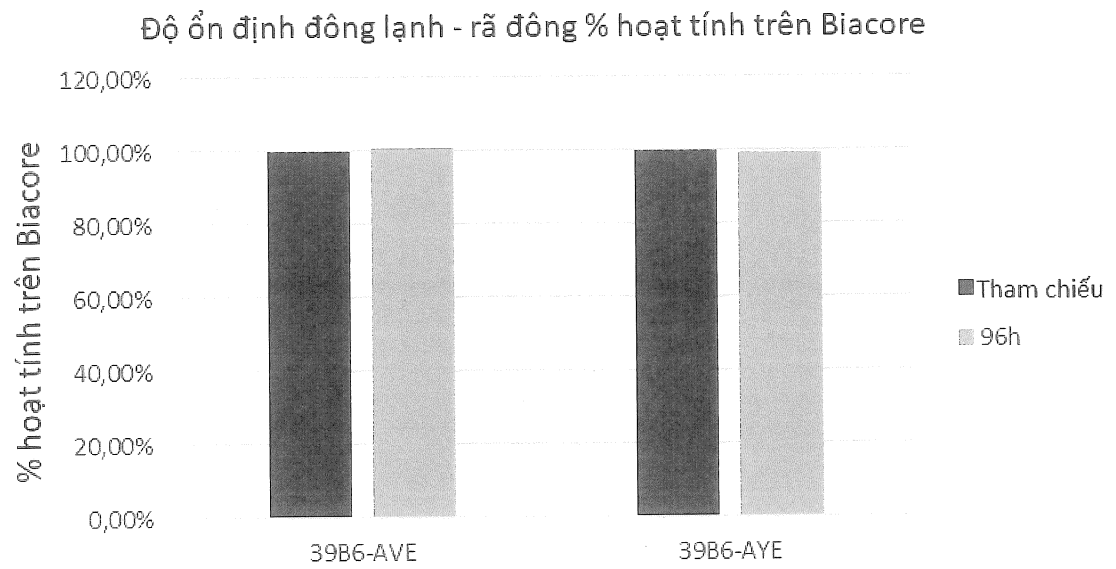
Fig.11



	10 chu trình đông lạnh rã đông			
	Điều kiện không khử		Điều kiện khử	
	Tham chiếu	10x FT	Tham chiếu	10x FT
39B6-AVE	1	2	5	6
39B6-AYE	3	4	7	8

17/25

Fig.12



18/25

Fig. 13

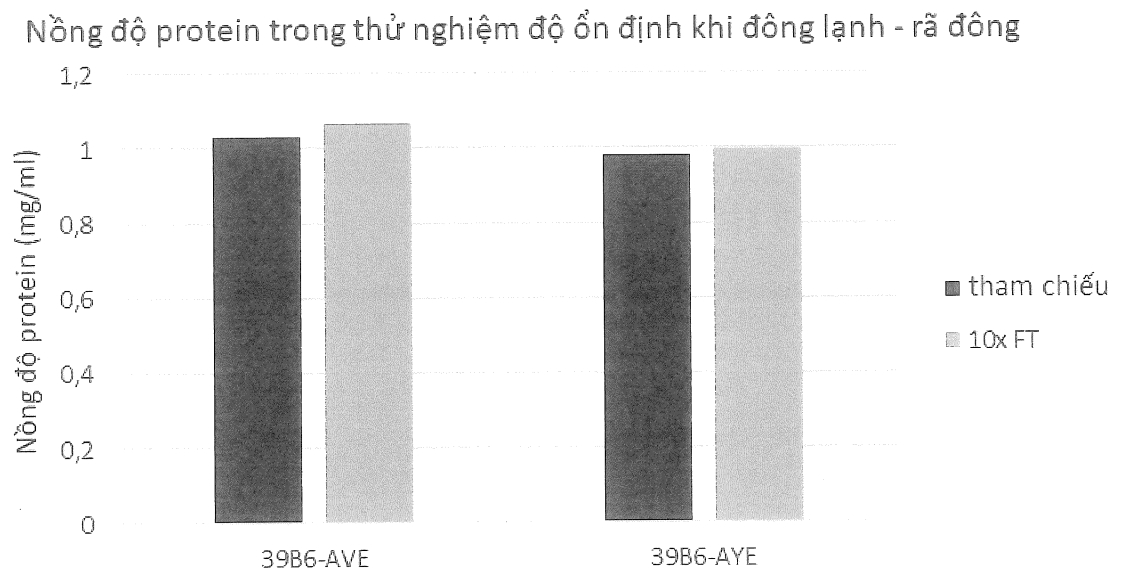
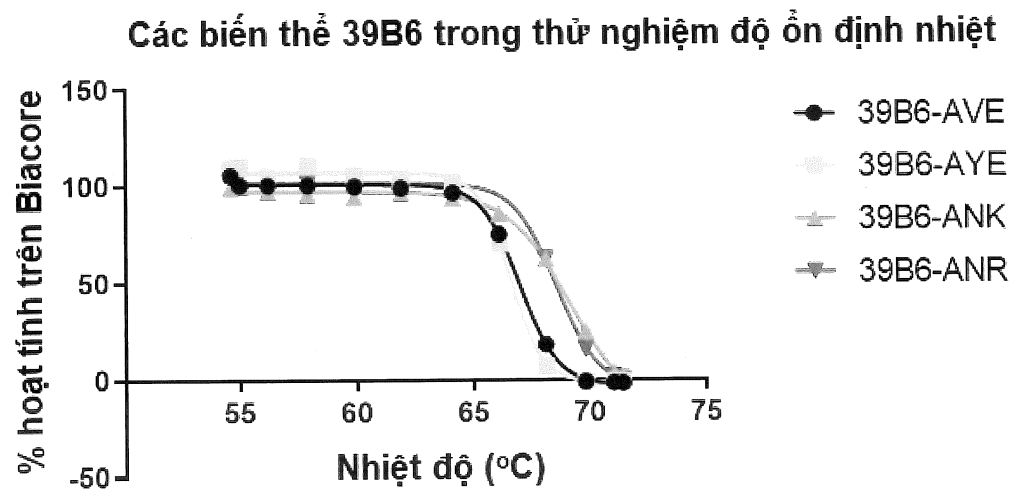
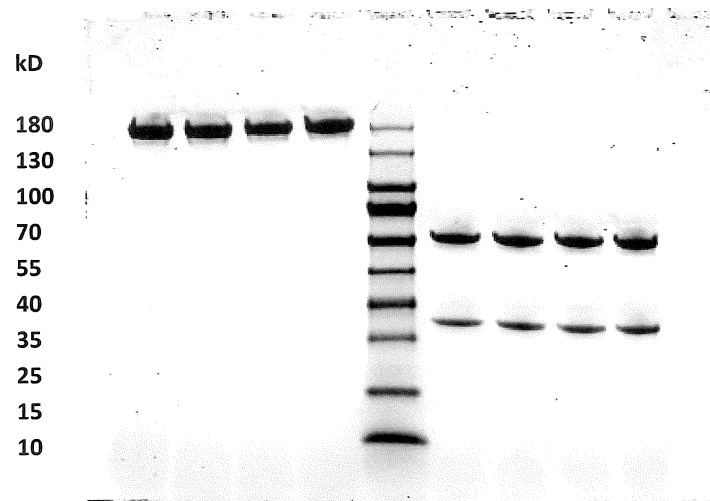


Fig. 14



20/25

Fig. 15



	96 giờ quay			
	Điều kiện không khử		Điều kiện khử	
	Tham chiếu	96h	Tham chiếu	96h
39B6-AVE	1	2	5	6
39B6-AYE	3	4	7	8

Fig. 16

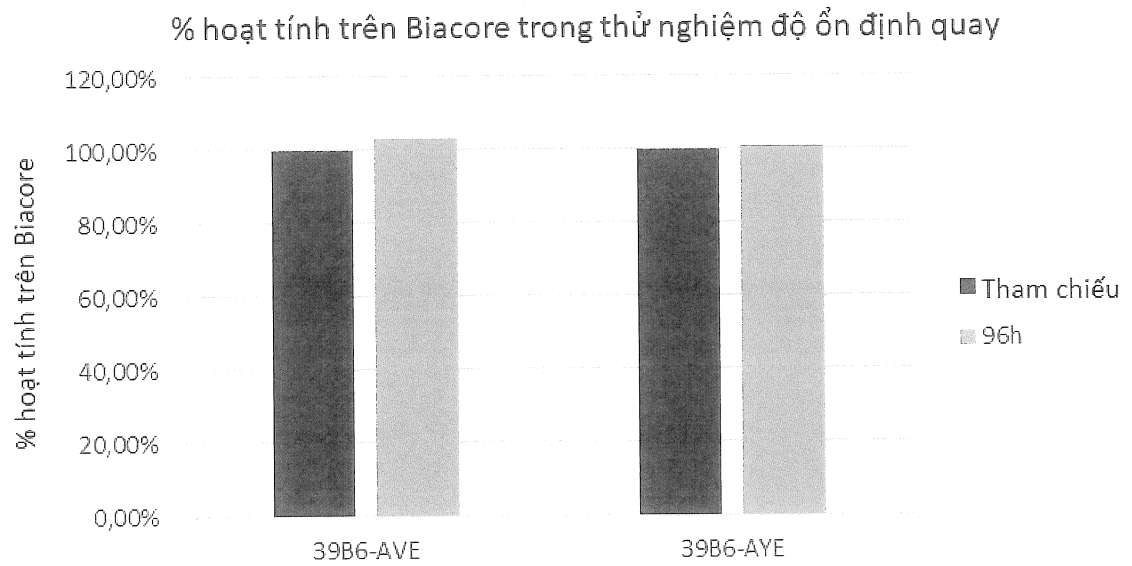
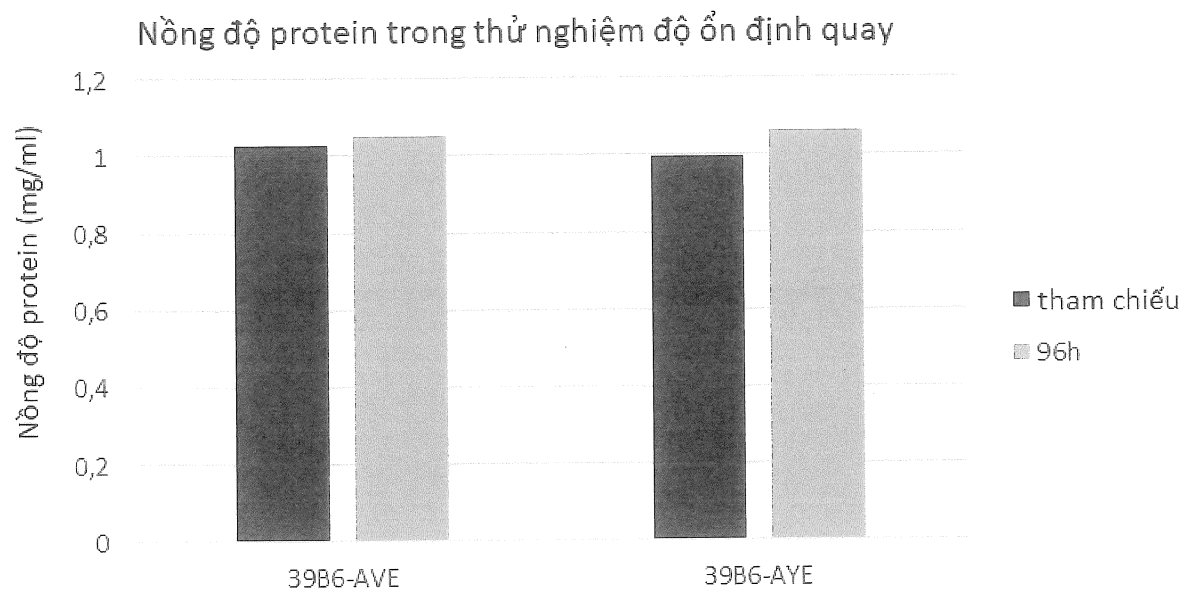
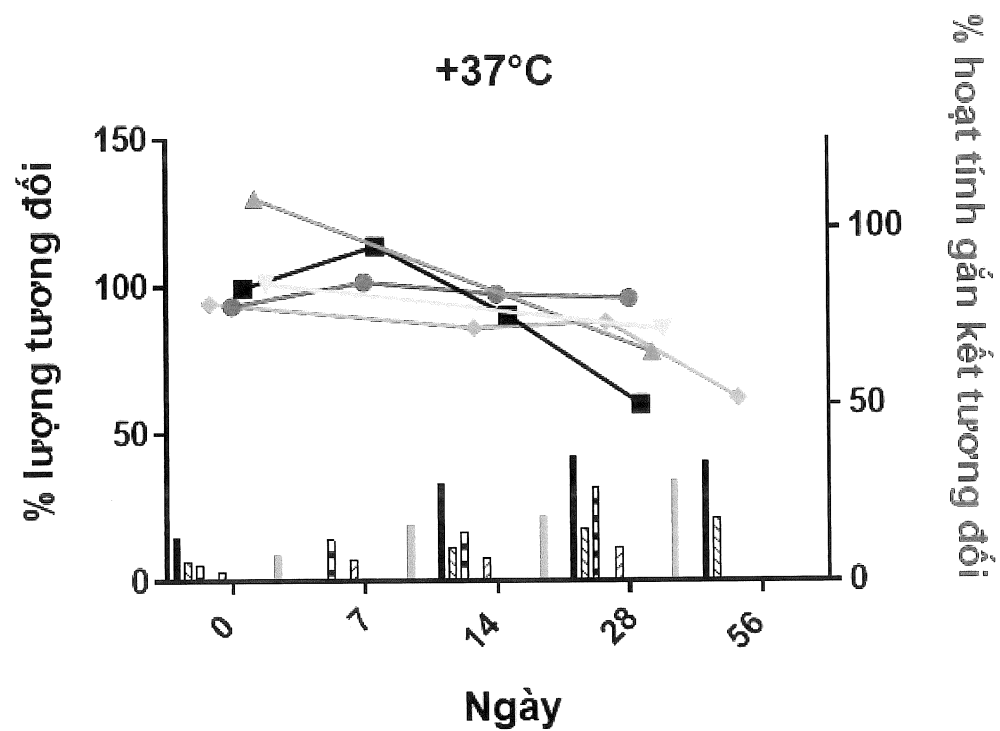


Fig. 17



23/25

Fig. 18



Hoạt tính gắn kết (SPR)

- 39B6-AVE
- 39B6-AYE
- ▲ 39B6-ANK
- ◆ 39B6-ANE
- ★ 39B6-ANR
- N DeamD 39B6-ANE
- N DeamD 39B6-ANR
- ▨ N IsoD 39B6-ANE
- ▨ N DeamD 39B6-ANK
- ▨ N IsoD 39B6-ANK
- N IsoD 39B6-ANR

24/25

Fig. 19

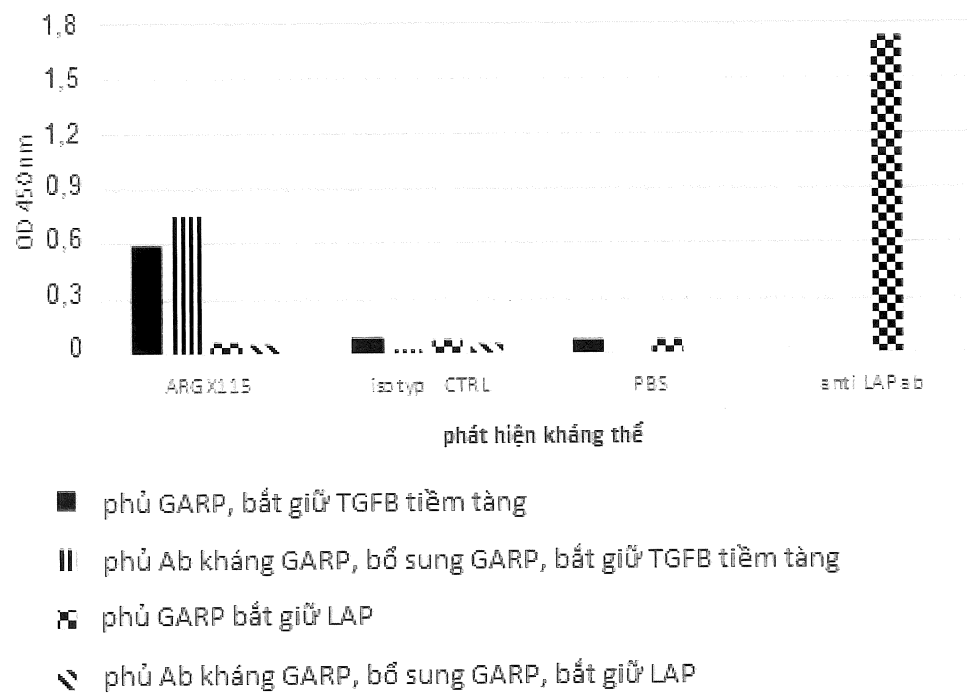


Fig. 20

