



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

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

(11)



1-0048352

(51)^{2017.01} A61K 39/395; C12N 15/85; C07K
16/18; C07K 16/28; A61K 47/68; A61P
29/00

(13) B

(21) 1-2020-06224

(22) 01/04/2019

(86) PCT/US2019/025100 01/04/2019

(87) WO 2019/195126 10/10/2019

(30) 62/651,605 02/04/2018 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/03/2021 396A

(73) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (US)

Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543, United States of America

(72) PASHINE, Achal (US); GOSSELIN, Michael L. (US); YAMNIUK, Aaron P. (CA); HOLMES, Derek A. (US); CHEN, Guodong (US); MADIA, Priyanka Apurva (US); HUANG, Richard Yu-Cheng (US); CARL, Stephen Michael (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHUỖI NẶNG, KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT MỘT CÁCH ĐẶC HIỆU VỚI THỤ THỂ KÍCH HOẠT ĐƯỢC BIỂU HIỆN TRÊN CÁC TẾ BÀO TỦY 1 (TREM-1), VÀ PHÂN TỬ ĐẶC HIỆU KÉP, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH, CHẾ PHẨM, VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-06224

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết và ức chế một cách đặc hiệu sự truyền tín hiệu TREM-1, trong đó các kháng thể này không liên kết với một hoặc nhiều FcγR và không cảm ứng các tế bào tủy để sinh ra các cytokin viêm. Các kháng thể này, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng là hữu dụng trong các ứng dụng trị liệu, như điều trị các bệnh tự miễn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic mã hóa các kháng thể này; các vectơ chứa các axit nucleic này, các tế bào chứa các vectơ này; các phân tử đặc hiệu kép và các thể liên hợp miễn dịch chứa các kháng thể này; và các chế phẩm và các kit chứa các kháng thể này, các phân tử đặc hiệu kép, các axit nucleic, các vectơ, các tế bào, hoặc các thể liên hợp miễn dịch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết và ức chế một cách đặc hiệu sự truyền tín hiệu TREM-1, trong đó các kháng thể này không liên kết với một hoặc nhiều FcγR và không cảm ứng các tế bào tủy để sinh ra các xytokin viêm. Các kháng thể này, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng là hữu dụng trong các ứng dụng trị liệu, như điều trị các bệnh tự miễn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic mã hóa các kháng thể này; các vector chứa các axit nucleic này, các tế bào chứa các vector này; các phân tử đặc hiệu kép và các thể liên hợp miễn dịch chứa các kháng thể này; và các chế phẩm và các kit chứa các kháng thể này, các phân tử đặc hiệu kép, các axit nucleic, các vector, các tế bào, hoặc các thể liên hợp miễn dịch.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

TREM-1 là thụ thể hoạt hóa được biểu hiện trên các bạch cầu đơn nhân, đại thực bào, và bạch cầu trung tính. Các tế bào này đóng vai trò trung tâm trong các bệnh viêm mạn tính bằng sự giải phóng các xytokin và các chất trung gian khác mà dẫn đến viêm. Sự biểu hiện mRNA và protein TREM-1 được điều hòa tăng ở các bệnh nhân bị viêm khớp dạng thấp (rheumatic arthritis - RA) và bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), và các tế bào dương tính với TREM-1 tích tụ ở các vị trí viêm, tương ứng với độ nặng của bệnh. Xem Bouchon *et al.*, *Nature* 410:1103-1107 (2001); Schenk *et al.*, *Clin Invest* 117:3097-3106 (2007); và Kuai *et al.*, *Rheumatology* 48:1352-1358 (2009). Protein nhận diện peptidoglycan 1 (peptidoglycan-recognition-protein 1 - PGLYRP1) được biểu hiện chủ yếu bởi các bạch cầu trung tính được hoạt hóa là phối tử của TREM-1 và dàn xếp sự truyền tín hiệu TREM-1 khi liên kết.

In vitro, sự tiếp hợp của TREM-1 kích hoạt sự tiết các xytokin tiền viêm bao gồm TNF, IL-8, và protein hóa hướng bạch cầu đơn nhân 1 (monocyte chemotactic protein-1). Ngoài ra, sự truyền tín hiệu TREM-1 tác dụng hiệp đồng cùng với nhiều thụ thể giống như Toll (Toll-like Receptor - TLR) làm gia tăng mạnh thêm nữa các tín hiệu tiền viêm. Kết quả là, điều này làm điều hòa tăng sự biểu hiện của TREM-1, dẫn đến vòng luẩn quẩn làm khuếch đại sự viêm. Xem Bouchon *et al.*, *J Immunol* 164:4991-4995 (2000). Bằng chứng gia tăng chỉ ra rằng các TLR góp phần vào sự phát triển và tiến triển của các bệnh viêm mạn tính như RA và IBD.

Các mAb kháng TREM-1 được làm giống như của người mà ức chế chức năng TREM-1 của cả người và khỉ cynomolgus đã được bộc lộ. Xem công bố đơn quốc tế số WO 2013/120553 A1 và WO 2016/009086 A1. Tuy nhiên, các kháng thể như vậy hoặc là có biên dạng độ nhớt mà có thể cản trở quy trình sản xuất hoặc là có các vấn đề khác mà có thể làm hạn chế tiềm năng trị liệu của chúng (ví dụ, bão xytokin và ADCC). Xem Shire *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 93:1390-1402 (2004); và Warncke *et al.*, *J Immunol.* 188:4405-11 (2012). Do đó, cần có kháng thể kháng TREM-1 mà có thể liên kết và ức chế một cách đặc hiệu chức năng của TREM-1 nhưng không gặp phải các vấn đề của các kháng thể kháng TREM-1 đã có.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể được phân lập, như các kháng thể đơn dòng, cụ thể là các kháng thể (ví dụ, đơn dòng) của người, mà liên kết một cách đặc hiệu với thụ thể kích hoạt được biểu hiện trên các tế bào tủy 1 (TREM-1) và có các tính chất chức năng mong muốn. Theo một số phương án, kháng thể này gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH), vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin so với vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 kiểu đại (SEQ ID NO: 9). Theo một số phương án, kháng thể này cạnh tranh chéo với mAb 0318 trong việc liên kết đến phong bế TREM-1 và gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH), vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin so với vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 kiểu đại (SEQ ID NO: 9).

Theo một số phương án, kháng thể này liên kết với epitop TREM-1 giống như mAb 0318. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết một cách đặc hiệu với epitop TREM-1 chứa một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44, L45, E46, K47, F48, A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, Y90, H91, D92, H93, G94, L95, và L96 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết một cách đặc hiệu với epitop TREM-1 chứa các axit amin D38 đến L45, E46 đến Q56, và/hoặc Y90 đến L96 của SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 của kháng thể được bộc lộ ở đây có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, L234A, L235E, G237A, D356E, và L358M, theo cách đánh số EU. Theo một số phương án, vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, D356E, và L358M, theo cách đánh số EU. Theo một số phương án, vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU. Theo một số phương án, vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU.

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây chứa CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ, trong đó CDR3 của chuỗi nặng chứa DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) hoặc DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26) ngoại trừ một hoặc hai sự thay thế. Theo một số phương án, CDR3 của chuỗi nặng chứa DQGIRRQFAY (SEQ ID NO: 72).

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây chứa CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ, trong đó CDR2 của chuỗi nặng chứa RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) hoặc RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25) ngoại trừ một hoặc hai sự thay thế.

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây chứa CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ, trong đó CDR1 của chuỗi nặng chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24) hoặc TYAMH (SEQ ID NO: 24) ngoại trừ một hoặc hai sự thay thế.

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây chứa CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ, trong đó CDR1 của chuỗi nhẹ chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27) hoặc RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27) ngoại trừ một hoặc hai sự thay thế. Theo một số phương án, CDR2 của chuỗi nhẹ chứa RASNLES (SEQ ID NO: 28) hoặc RASNLES (SEQ ID NO: 28) ngoại trừ một hoặc hai sự thay thế. Theo một số phương án, CDR3 của chuỗi nhẹ chứa QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) hoặc QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29) ngoại trừ một hoặc hai sự thay thế.

Theo một số phương án, VH của kháng thể được bộc lộ ở đây chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc khoảng 100% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14. Theo một số phương án, VL của kháng thể được bộc lộ ở đây chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc khoảng 100% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15. Theo một số phương án, VH và VL lần lượt chứa SEQ ID NO: 14 và 15.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng chứa SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, hoặc SEQ ID NO: 53. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 54.

Sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, gồm CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng; CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nhẹ; và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1, trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25), và DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26); trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28), và QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29); và trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU.

Sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, gồm CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng; CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nhẹ; và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1, trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25), và DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26); trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28), và QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29); và trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có các sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235E, G237A, A330S, và P331S, theo cách đánh số EU.

Sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, gồm CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng; CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nhẹ; và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1, trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25), và DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26); trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28), và QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29); và trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU.

Sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, gồm CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng; CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nhẹ; và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1, trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25), và DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26); trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28), và QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29); và trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU.

Theo một số phương án, TREM-1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có ái lực liên kết giảm đối với FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), hoặc kết hợp bất kỳ của chúng so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, kháng thể có ái lực liên kết đối với FcγRI (CD64) giảm khoảng ít nhất là hai lần, ít nhất là ba lần, ít nhất là bốn lần, ít nhất là năm lần, ít nhất là sáu lần, ít nhất là bảy lần, ít nhất là tám lần, ít nhất là chín lần, hoặc ít nhất là 10 lần so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây có tính sinh miễn dịch ít hơn so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, kháng thể không chủ vận sự truyền tín hiệu TREM-1 khi liên kết với TREM-1 và không có mặt chất kích thích. Theo một số phương án, kháng thể không cảm ứng sự biểu hiện của xytokin viêm ở các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành (immature dendritic cell - iDC) khi các tế bào này được ủ với sự có mặt của kháng thể và không có mặt chất kích thích so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây phong bế sự sản sinh xytokin viêm ở tế bào khi các tế bào này được hoạt hóa với sự có mặt của cả kháng thể và chất kích thích. Theo một số phương án, chất kích thích là phối tử TREM-1. Theo một số phương án, xytokin viêm được chọn từ nhóm bao gồm IL-6, TNF-α, IL-8, IL-1β, IL-12, protein giống chitinaza-3 1 (chitinase-3-like protein 1 - CHI3L1), và các kết hợp của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với FcRn của người, FcRn của khỉ cynomolgus, và/hoặc FcRn của chuột theo cách phụ thuộc độ pH. Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây có độ ổn định nhiệt tốt hơn so với kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID

NO: 54, như được đo bằng máy đo nhiệt lượng quét vi sai mao quản (Capillary Differential scanning calorimeter - CAP-DSC). Theo một số phương án, khoảng 10% đến 20%, khoảng 20% đến 30% (ví dụ, 24%), hoặc khoảng 30% đến 40% kháng thể là có thể nghịch đảo khi nó bị gia nhiệt đến 77°C. Theo một số phương án, kháng thể có nhiệt độ nóng chảy (T_m) cao hơn so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây có độ nhớt nhỏ hơn 5 cP, nhỏ hơn 4 cP, nhỏ hơn 3 cP, nhỏ hơn 2,5 cP, nhỏ hơn 2,4 cP, nhỏ hơn 2,3 cP, nhỏ hơn 2,2 cP, nhỏ hơn 2,1 cP, nhỏ hơn 2 cP, nhỏ hơn 1,9 cP, nhỏ hơn 1,8 cP, nhỏ hơn 1,7 cP, nhỏ hơn 1,6 cP, nhỏ hơn 1,5 cP, nhỏ hơn 1,4 cP, nhỏ hơn 1,3 cP, nhỏ hơn 1,2 cP, nhỏ hơn 1,1 cP, nhỏ hơn 1,0 cP, nhỏ hơn 0,9 cP, nhỏ hơn 0,8 cP, nhỏ hơn 0,7 cP, nhỏ hơn 0,6 cP, nhỏ hơn 0,5 cP, nhỏ hơn 0,4 cP, nhỏ hơn 0,3 cP, nhỏ hơn 0,2 cP, hoặc nhỏ hơn 0,1 cP ở nồng độ 80 mg/mL. Theo một số phương án, kháng thể có độ nhớt nhỏ hơn 10 cP (ví dụ, 9 cP) ở nồng độ 130 mg/mL.

Theo một số phương án, kháng thể liên kết với TREM-1 của người với K_D nhỏ hơn 4 nM (ví dụ, 3,4 nM) như được đo bằng Biacore. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với TREM-1 của khỉ cynomolgus với K_D nhỏ hơn 1 nM (ví dụ, 0,91 nM), như được đo bằng Biacore.

Theo một số phương án, kháng thể là monome như được quan sát bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ theo kích cỡ (size-exclusion high-performance liquid chromatography - SE-HPLC). Theo một số phương án, kháng thể thể hiện nguy cơ tối thiểu đối với sự phân mảnh như được quan sát bằng phương pháp phổ khối nối tiếp sắc ký lỏng hai chiều (two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry - 2D-LC/MS) hoặc phương pháp phân tích khối lượng bảo toàn bằng cách sử dụng phương pháp phổ khối nối tiếp sắc ký lỏng (LC/MS). Theo một số phương án, kháng thể có điểm đẳng điện là từ 8 đến 9 (ví dụ, 8,75).

Theo một số phương án, kháng thể là ổn định trong chế phẩm chứa histidin, sucroza, arginin, và NaCl. Theo một số phương án, kháng thể là ổn định trong ít nhất là 2 tháng trong chế phẩm chứa histidin 20 mM, sucroza 150 mM, arginin 25 mM, và

NaCl 50 mM. Theo một số phương án, chế phẩm có độ pH bằng 6,0 và/hoặc trong đó chế phẩm được bảo quản ở 4°C, 25°C, hoặc 40°C.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử đặc hiệu kép chứa kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế, được liên kết với phân tử có tính đặc hiệu liên kết thứ hai.

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa kháng thể được bộc lộ ở đây, các vector chứa các axit nucleic này, và các tế bào được chuyển nhiễm các vector này.

Sáng chế đề xuất các thể liên hợp miễn dịch chứa các kháng thể kháng TREM-1 được bộc lộ ở đây, liên kết với một tác nhân.

Sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa các kháng thể kháng TREM-1, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng, các phân tử đặc hiệu kép, hoặc các thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây, và chất mang. Sáng chế còn đề xuất các kit chứa các kháng thể kháng TREM-1, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng, các phân tử đặc hiệu kép, hoặc các thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây, và hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoạt tính TREM-1 ở đối tượng cần thiết, bao gồm bước dùng kháng thể kháng TREM-1, phân tử đặc hiệu kép, axit nucleic, vector, tế bào, hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn ở đối tượng cần thiết, bao gồm bước dùng kháng thể kháng TREM-1, phân tử đặc hiệu kép, axit nucleic, vector, tế bào, hoặc thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế. Theo một số phương án, bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), bệnh Crohn (Crohn's disease - CD), bệnh viêm loét đại tràng (ulcerative colitis - UC), hội chứng ruột dễ bị kích thích, bệnh viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis - RA), bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh luput ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus - SLE), bệnh viêm thận luput, bệnh viêm mạch, bệnh nhiễm khuẩn, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (systemic inflammatory response syndrome - SIRS), bệnh tiểu đường typ I, bệnh Grave, bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh viêm cơ tim tự miễn, bệnh Kawasaki, bệnh động mạch vành, bệnh phổi bị tắc nghẽn mạn tính, bệnh phổi kẽ, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh cứng bì, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm da

cơ địa, bệnh bạch biến, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ, hội chứng Sjogrens, bệnh viêm thận tự miễn, hội chứng Goodpasture, bệnh viêm đa dây thần kinh hủy myelin mạn tính, bệnh dị ứng, bệnh hen, các bệnh tự miễn khác mà là kết quả của của sự viêm cấp hoặc mạn tính, và các kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung. Theo một số phương án, chất điều trị bổ sung là kháng thể kháng IP-10 hoặc kháng thể kháng TNF- α .

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig.1A và 1B thể hiện rằng tất cả các biến thể mAb 0318 liên kết với TREM-1 của người và của cynomolgus với ái lực tương đương như kháng thể mAb 0318 gốc (IgG4). Fig.1A thể hiện dữ liệu ái lực liên kết của biến thể 318-IgG1.3f đối với cả TREM-1 của người (hàng trên) và TREM-1 của khỉ cynomolgus (hàng dưới). Fig.1B thể hiện dữ liệu ái lực liên kết của một số biến thể mAb 0318 khác nhau đối với TREM-1 của người. Các biến thể khác nhau được thể hiện bao gồm: (i) 318-IgG1.1f, (ii) 318-IgG1.3f, (iii) 318-IgG4-Aba, (iv) 318-IgG1-Aba, và (v) 318-IgG1.1f (đột biến M thành Q). Dữ liệu ái lực liên kết của kháng thể mAb 0318 (IgG4 A và B) được cung cấp để nhằm mục đích so sánh trong Fig.1B.

Các Fig.2A và 2B thể hiện sự nội nhập của mAb 0318-IgG1.3f khi liên kết với TREM-1 được biểu hiện trên các bạch cầu đơn nhân CD14+ ở các thời điểm khác nhau sau khi liên kết TREM-1. Trên Fig.2A, sự biểu hiện thụ thể TREM-1 được phân tích ở các thời điểm 0, 6, và 24 giờ sau liên kết. Trên Fig.2B, sự biểu hiện thụ thể TREM-1 được phân tích ở các thời điểm 0, 4, và 20 giờ sau liên kết. Fig.2B còn cung cấp dữ liệu sử dụng kháng thể TREM26, mà không cạnh tranh với các biến thể kháng thể 0318 trong việc liên kết với TREM-1. Kháng thể TREM26 được sử dụng để đánh giá số phận của thụ thể TREM-1 khi nó được nội nhập (ví dụ, liệu nó có bị phân hủy hoặc tái trở lại bề mặt tế bào hay không).

Fig.3 thể hiện rằng các biến thể mAb 0318 không chủ vận sự truyền tín hiệu TREM-1 như được đo bằng thử nghiệm tế bào thông báo BWZ/hTREM-1 khi dòng tế bào thông báo được ủ cùng với ("cả hai") hoặc không cùng với CHO-CD32 ("chỉ mỗi BWZ 36"). Các kháng thể biến thể được thể hiện bao gồm: (i) 318-IgG1.1f ("IgG1.1f"), (ii) 318-IgG1.3f ("IgG1.3f"), (iii) 318-IgG4-Aba ("FcAba-4"), (iv) 318-

IgG1-Aba ("FcAba-1"). Kháng thể MAB1278, là chất chủ vận đã biết của sự truyền tín hiệu TREM-1, được sử dụng làm kháng thể đối chứng dương tính (xem bảng được chèn vào). Kháng thể 5C8 (đối chứng isotyp) được sử dụng làm đối chứng âm tính.

Fig.4 thể hiện hiệu lực của các biến thể mAb 0318 khác nhau khi phong bế sự sản sinh qua trung gian TREM-1 các xytokin viêm bằng các tế bào khác nhau của người. Các biến thể kháng thể mAb 0318 được thể hiện trên Fig.4 ức chế sự giải phóng qua trung gian TREM-1 các xytokin viêm (ví dụ, TNF- α , IL-6, hoặc IL-8) từ các typ tế bào khác nhau của người: PBMC, các bạch cầu đơn nhân, các bạch cầu trung tính, và máu toàn phần được lắng tụ RBC (tức là, phần lớn của các tế bào hồng cầu được loại bỏ bằng cách sử dụng kỹ thuật lắng tụ RBC trên cơ sở dextran như được mô tả trong các ví dụ). Để sản sinh các xytokin viêm, các tế bào được kích thích hoặc là bằng PGRP1 được liên kết với đĩa và peptidoglycan hòa tan mà không có hoạt tính TLR2 ("PGRP + PGN-Ecndss") hoặc là bằng các bạch cầu trung tính được kích thích bởi phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) biểu hiện PGRP1 ("PMA-Stim Neutrophil Endogenous PGRP"). Các kháng thể biến thể được thể hiện bao gồm: (i) 0318-IgG4, (ii) 0318-IgG1.3f, (iii) 0318-IgG1.1f, (iv) 0318-IgG1-Aba, và (v) 318-IgG4-Aba. "N/D" thể hiện rằng mức biểu hiện của xytokin viêm cụ thể là không xác định được.

Các Fig.5A và 5B thể hiện hiệu lực của mAb 0318-IgG1.3f trong việc phong bế sự sản sinh IL-8 từ máu toàn phần sau khi kích thích với PGN cùng với hoặc không cùng với PGRP1 với sự có mặt của chất ức chế NOD2. Fig.5A cung cấp dữ liệu ức chế được tạo ra bằng cách sử dụng thử nghiệm được lực học máu toàn phần như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Fig.5B cung cấp dữ liệu ức chế được sinh ra bằng cách sử dụng thử nghiệm xytokin nội bào máu toàn phần như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Các Fig.6A đến 6C thể hiện các mức biểu hiện ARN của protein giống chitinaza-3 1 ("CHI3L1") (Fig.6A), IL-1 β (Fig.6B), và IL-6 (Fig.6C) từ máu toàn phần được kích thích với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của mAb 0318-IgG1.3f (0-1 nM). Máu toàn phần được thu thập từ ba người cho khác nhau (#126, #290, và #322) và được kích thích bằng PGRP1 hòa tan và peptidoglycan hòa tan mà không có hoạt tính TLR2 ("PGRP hòa tan + PGN-Ecndss hòa tan"). Trong mỗi Fig.6A đến

6C, các mức biểu hiện ARN (trục y) được thể hiện dưới dạng cả % ức chế (cột phải) và $\Delta\Delta Ct$ (chênh lệch giữa giá trị của gen tham chiếu và giá trị của mẫu thử nghiệm) (cột trái). Nồng độ khác nhau của kháng thể 0318-IgG1.3f được thể hiện trên trục x.

Fig.7 thể hiện biên dạng độ nhót-nồng độ của cả hai kháng thể biến thể 318-IgG1.1f (đánh dấu bằng hình vuông) và 318-IgG1.3f (đánh dấu bằng hình tròn). Biên dạng độ nhót được tạo ra từ phác đồ pha loãng bằng cách dùng nhót kế động lực Rheosense m-VROC sử dụng phương thức quét cắt 3 điểm với mỗi điểm ở nhiệt độ không đổi. Đường nét liền cung cấp đường cong phi tuyến tính tốt nhất khớp với dữ liệu được thể hiện. Đường nét đứt thể hiện mức độ nhót cho phép tối đa về hiệu quả.

Fig.8 thể hiện rằng cả hai kháng thể biến thể 318-IgG1.1f và 318-IgG1.3f đều có nguy cơ sinh miễn dịch từ thấp đến trung bình. VL6 (mAb IL-21R sinh miễn dịch) và KLH (keyhole limpet hemocyanin) được sử dụng làm đối chứng dương tính. Avastin được sử dụng làm đối chứng âm tính.

Các Fig.9A và 9B thể hiện rằng tất cả các biến thể mAb 0318 đều có khả năng liên kết với FcRn (của người (được thể hiện bằng màu đen), của khỉ cyno (được thể hiện bằng màu trắng), và của chuột (được thể hiện bằng màu xám)) theo cách thức phụ thuộc vào độ pH. Fig.9A cung cấp dữ liệu liên kết FcRn dưới dạng % Rmax (khả năng liên kết FcRn tối đa). Fig.9B cung cấp dữ liệu liên kết FcRn dưới dạng các đồ thị đáp ứng theo thời gian. Các biến thể kháng thể 0318 được thể hiện bao gồm: (i) IgG1-Aba, (ii) IgG4-Aba, (iii) IgG1.1f, và (iv) IgG1.3f. Kháng thể mAb 0318 (IgG4) cũng được thể hiện nhằm mục đích so sánh

Các Fig.10A và 10B thể hiện rằng tất cả các biến thể kháng thể mAb 0318 đều thể hiện sự liên kết giảm đối với một hoặc nhiều FcγR của người (tức là, CD64, biến thể CD32a-H131, biến thể CD32a-R131, CD32b, biến thể CD16a-V158, và biến thể CD16B-NA2). Fig.10A thể hiện ái lực liên kết dưới dạng % Rmax (khả năng FcγR tối đa). Fig.10B thể hiện các đồ thị đáp ứng theo thời gian. Các biến thể kháng thể 0318 được thể hiện bao gồm: (i) IgG1-Aba, (ii) IgG4-Aba, (iii) IgG1.1f, và (iv) IgG1.3f. Kháng thể mAb 0318 (IgG4) được thể hiện nhằm mục đích so sánh. Kháng thể 1F4-hIgG1f, mà được biết là liên kết với nhiều FcγR, được sử dụng làm đối chứng.

Các Fig.11A đến 11I thể hiện rằng các kháng thể biến thể 0318 bản chất không phải là chủ vận (tức là, không có sự kích thích), như được đo bằng sự giải phóng của

các xytokin viêm khác nhau (ví dụ, IL-6, TNF- α , và IL-12) khi được nuôi cấy với các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành. Các Fig.11A, 11B, và 11C cung cấp lượng IL-6 được sản sinh đối với các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành được phân lập lần lượt từ người cho D179, D276, và D341. Các Fig.11D, 11E, và 11F cung cấp lượng TNF- α được sản sinh đối với các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành được phân lập lần lượt từ người cho D179, D276, và D341. Các Fig.11G, 11H, và 11I cung cấp lượng IL-12 được sản sinh đối với các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành được phân lập lần lượt từ người cho D179, D276, và D341. Các biến thể kháng thể 0318 được thể hiện bao gồm: (i) IgG1.1f, (ii) IgG1.3f, và (iii) IgG1-Aba. Liều lượng ($\mu\text{g/mL}$) của các kháng thể được sử dụng được thể hiện trong dấu ngoặc đơn. Các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành được nuôi cấy với các biến thể kháng thể kháng TREM-1 cùng với và không cùng với các tế bào CHO biểu hiện CD32a màng (để kích thích liên kết ngang Fc). Trime PGRP+PGN, CD40L ("Trimer"), và kháng thể chủ vận kháng CD40 của Pfizer ("CP870") được sử dụng làm các đối chứng dương tính. Kháng thể isotyp ("CHIL-6") được sử dụng làm đối chứng âm tính. Đường nét đứt thể hiện giới hạn phát hiện thấp nhất của thử nghiệm.

Fig.12 thể hiện được động học của liều đơn biến thể mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ cynomolgus sau khi dùng dưới da. Mỗi con vật nhận một trong số các liều sau: (i) 0,1 mg/kg (n=4) ("1"), (ii) 0,5 mg/kg (n=4) ("2"), (iii) 2 mg/kg (n=3) ("3"), hoặc (iv) 10 mg/kg (n=4) ("4"). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

Fig.13 thể hiện sự phân bố thuốc qua trung gian đích dạng sơ đồ dùng để mô tả dữ liệu được động học (pharmacokinetic - PK), dược lực học (pharmacodynamics - PD), và sự chiếm giữ của thụ thể (receptor occupancy - RO) ở khỉ cynomolgus.

Các Fig.14A và 14B thể hiện tổng mật độ thụ thể TREM-1 trên các bạch cầu đơn nhân (Fig.14A) và các bạch cầu hạt (FIG.14B) theo liều đơn (dùng dưới da (sc) hoặc trong tĩnh mạch (iv)) của biến thể mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ cynomolgus. Mật độ thụ thể TREM-1 được thể hiện dưới dạng phần trăm mật độ thụ thể TREM-1 trước khi dùng kháng thể. Mỗi con vật nhận một trong số các liều sau: (a) 0,1 mg/kg (sc) (n=4) ("A"), (b) 0,5 mg/kg (n=4) (sc) ("B"), (c) 2 mg/kg (n=3) (sc) ("C"), (d) 2 mg/kg (n=3) (iv) ("D"), hoặc (e) 10 mg/kg (n=4) (sc) ("E"). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

Các Fig.15A và 15B thể hiện sự chiếm giữ của thụ thể TREM-1 trên các bạch cầu đơn nhân (Fig.15A) và các bạch cầu hạt (FIG.15B) sau khi dùng liều đơn của biến thể mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ cynomolgous. Dữ liệu sự chiếm giữ của thụ thể được thể hiện dưới dạng phần trăm tổng lượng thụ thể TREM-1 được biểu hiện trên các tế bào. Mỗi con vật nhận một trong số các liều sau: (a) 0,1 mg/kg (sc) (n=4) ("A"), (b) 0,5 mg/kg (n=4) (sc) ("B"), (c) 2 mg/kg (n=3) (sc) ("C"), (d) 2 mg/kg (n=3) (iv) ("D"), hoặc (e) 10 mg/kg (n=4) (sc) ("E"). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Đường nét đứt thể hiện mức chiếm giữ của thụ thể là 85%.

Các Fig.16A và 16B thể hiện dữ liệu quan sát được (ký hiệu bằng đường tròn hở) và được dự báo bằng mô hình (đường nét liền đậm) về PK (bảng trên bên trái), PD (bảng trên bên phải), RO (bảng dưới bên trái), và tổng mức biểu hiện thụ thể TREM-1 bề mặt (bảng dưới bên phải) sau khi dùng liều đơn của biến thể mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ cynomolgus được mô tả bằng mô hình PK 2 ngăn với TMDD ở ngăn trung tâm. Trên Fig.16A, mỗi con khỉ nhận liều đơn kháng thể ở mức 0,1 mg/kg bằng cách dùng dưới da. Trên Fig.16B, các con vật nhận liều đơn kháng thể ở mức 10 mg/kg bằng cách dùng dưới da.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để sáng chế có thể được dễ hiểu hơn, một số thuật ngữ được định nghĩa trước tiên. Các định nghĩa khác được nêu trong toàn bộ phần mô tả chi tiết sáng chế.

Lưu ý rằng các danh từ đếm được mà không được chỉ rõ số lượng có nghĩa là một hoặc nhiều danh từ đó; ví dụ, "trình tự nucleotit" sẽ được hiểu là thể hiện một hoặc nhiều trình tự nucleotit. Như vậy, danh từ, "một hoặc nhiều danh từ này" và "ít nhất là một danh từ này" có thể được sử dụng thay thế nhau ở đây.

Thêm nữa, "và/hoặc" được sử dụng ở đây được hiểu như là bộ lọc cụ thể của mỗi trong số hai dấu hiệu hoặc thành phần cùng hoặc không cùng nhau. Vì vậy, thuật ngữ "và/hoặc" khi được sử dụng trong cụm từ như "A và/hoặc B" ở đây được dự định bao gồm "A và B," "A hoặc B," "A" (một mình), và "B" (một mình). Tương tự, thuật ngữ "và/hoặc" khi được sử dụng trong cụm từ như "A, B, và/hoặc C" được dự định

bao hàm mỗi trong số các khía cạnh sau: A, B, và C; A, B, hoặc C; A hoặc C; A hoặc B; B hoặc C; A và C; A và B; B và C; A (một mình); B (một mình); và C (một mình).

Cần hiểu rằng ở bất cứ nơi nào các khía cạnh được mô tả ở đây với cụm từ "bao gồm," các khía cạnh tương tự khác được mô tả dưới dạng "gồm có" và/hoặc "về cơ bản gồm có" cũng được đề cập.

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này đề cập đến. Ví dụ, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; và Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, cung cấp cho chuyên gia trong lĩnh vực từ điển chung của nhiều trong số các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế này.

Các đơn vị, tiền tố, và ký hiệu được biểu thị ở dạng được chấp nhận theo hệ thống đơn vị quốc tế (Système International de Unites (SI)) của chúng. Các khoảng bằng số bao gồm cả các số xác định khoảng này. Trừ khi có quy định khác, các trình tự nucleotit được viết từ trái sang phải theo hướng 5' đến 3'. Các trình tự axit amin được viết từ trái sang phải theo hướng amino đến carboxy. Các đề mục được đưa ra ở đây không nhằm giới hạn các khía cạnh khác của sáng chế, mà nó có thể có được bằng cách tham khảo toàn bộ bản mô tả. Vì vậy, các thuật ngữ được định nghĩa ngay dưới đây được định nghĩa đầy đủ hơn bằng cách tham khảo toàn bộ bản mô tả.

Thuật ngữ "khoảng" được sử dụng ở đây có nghĩa là xấp xỉ, khoảng chừng, xung quanh, hoặc trong vùng đó. Khi thuật ngữ "khoảng" được sử dụng kết hợp với khoảng số liệu thì nó biến đổi khoảng đó bằng cách mở rộng tới các biên trên và dưới các giá trị số được nêu. Nói chung, thuật ngữ "khoảng" có thể biến đổi giá trị số liệu tới biên trên và biên dưới của giá trị được nêu một biên độ, ví dụ, 10 phần trăm, lên hoặc xuống (cao hơn hoặc thấp hơn).

Thuật ngữ "thụ thể kích hoạt được biểu hiện trên các tế bào tủy 1" (triggering receptor expressed on myeloid cells 1 - còn được gọi là TREM1, TREM-1, và CD354) đề cập đến thụ thể mà được biểu hiện trên các bạch cầu đơn nhân, các đại thực bào, và các bạch cầu trung tính. Phối tử chính đối với TREM-1 bao gồm protein nhận

diện peptidoglycan 1 (peptidoglycan-recognition-protein 1 - PGLYRP1), mà thuộc họ protein liên kết peptidoglycan (PGN) (PGRP). Khi được hoạt hóa, TREM-1 kết hợp với protein thích ứng việc truyền tín hiệu chứa ITAM, DAP12. Việc truyền tín hiệu xuôi dòng có thể bao gồm sự hoạt hóa yếu tố phiên mã NFAT, gây ra sự điều hòa tăng sự sản sinh xytokin tiền viêm. Thuật ngữ "TREM-1" bao gồm các biến thể bất kỳ hoặc các isoform của TREM-1 mà được biểu hiện một cách tự nhiên bởi các tế bào. Do đó, theo một số phương án, các kháng thể được mô tả ở đây có thể phản ứng chéo với TREM-1 của các loài khác không phải là người (ví dụ, TREM-1 của khỉ cynomolgus).

Ba isoform của TREM-1 của người đã được nhận diện. Isoform 1 (Số truy cập NP_061113.1; SEQ ID NO: 1) bao gồm 234 axit amin và thể hiện trình tự chính tắc. Isoform 2 (Số truy cập NP_001229518.1; SEQ ID NO: 2) bao gồm 225 axit amin và khác với trình tự chính tắc ở các gốc axit amin 201-234. Các gốc axit amin mã hóa một phần của miền xuyên màng và miền tế bào chất. Isoform 3 (Số truy cập NP_001229519; SEQ ID NO: 3) bao gồm 150 axit amin, và là hòa tan. Nó thiếu các gốc axit amin 151-234, mà mã hóa miền xuyên màng, miền tế bào chất, và một phần của miền ngoại bào. Các gốc axit amin 138-150 cũng khác với trình tự chính tắc nêu trên.

Dưới đây là các trình tự axit amin của ba isoform TREM-1 đã biết của người.

(A) Isoform TREM-1 của người 1 (Số truy cập NP_061113.1; SEQ ID NO: 1; được mã hóa bằng trình tự nucleotit có số truy cập NM_018643; SEQ ID NO: 4):

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFFAS
 SQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLLRVRMV
 NLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVY
 KIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVFNI
 VILLAGGFLSKSLVFSVLFAVTLRSFVP (trình tự tín hiệu được gạch chân);

(B) Isoform TREM-1 của người 2 (số truy cập NP_001229518.1; SEQ ID NO: 2; được mã hóa bằng trình tự nucleotit có số truy cập NM_001242589; SEQ ID NO: 5):

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFFAS
 SQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHDHGLLRVRMV

NLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVY
KIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIRYSFQVP
GPLVWTLSPFLPSLCAERM (trình tự tín hiệu được gạch chân);

(C) Isoform TREM-1 của người 3 (số truy cập NP_001229519; SEQ ID NO: 3; được mã hóa bằng trình tự nucleotit có số truy cập NM_001242590; SEQ ID NO: 6):

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLEKFAS
SQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLLRVRMV
NLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFRCSLTSFSWLVD
(trình tự tín hiệu được gạch chân).

Protein TREM-1 của khỉ cynomolgus (số truy cập XP_001082517; SEQ ID NO: 7) được dự đoán là có trình tự axit amin dưới đây:

MRKTRLWGLLWMLFVSELRAATTELTEEKYEYKEGQTLEVKCDYALEKYA
NSRKAWQKMEGKMPKILAKTERPSENSHPVQVGRITLEDYDPDHGLLQVQM
TNLQVEDSGLYQCVIYQHHPKESHVLFNPICLVVTKGSSGTPGSSENSTQNVY
RTPSTTAKALGPRYTSPRTVTQAPPESTVVVSTPGSEINLTNVTDIIRVPVFNI
VIIVAGGFLSKSLVFSVLFAVTLRSFGP (trình tự tín hiệu được gạch chân).

Sáng chế đề cập đến các kháng thể mà liên kết và phong bế một cách đặc hiệu chức năng của TREM-1. Các kháng thể này phong bế chức năng TREM-1 bằng cách giảm/phong bế sự hoạt hóa TREM-1 và sự truyền tín hiệu xuôi dòng.

Các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế phong bế sự truyền tín hiệu TREM-1 bằng một hoặc kết hợp một số cơ chế khác nhau, phong bế TREM-1 một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo một phương án, các kháng thể ngăn chặn phối tử tự nhiên của TREM-1, protein nhận biết peptidoglycan 1 (PGLYRP1), khỏi tạo ra phức hợp chức năng với TREM-1. Theo phương án khác, các kháng thể phong bế TREM-1 bằng cách ngăn chặn các phân tử TREM-1 riêng rẽ khỏi tạo thành các dime hoặc các multimer. Theo một số phương án, sự dime hóa hoặc multimer hóa TREM-1 được giảm đi hoặc được ngăn chặn bởi các kháng thể kháng TREM-1 mà có khả năng liên kết với một phần của TREM-1 mà nếu không sẽ cư trú ở bề mặt chung của dime TREM-1, do đó ngăn chặn các phân tử TREM-1 riêng rẽ khỏi kết hợp với nhau. Theo các phương án khác, sự dime hóa hoặc multimer hóa TREM-1 được giảm đi hoặc được

ngăn chặn bởi các kháng thể kháng TREM-1 mà can thiệp vào sự tương tác của TREM-1 với phối tử của nó.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 có thể phong bế sự hoạt hóa TREM-1 cảm ứng bởi PGLYRP1. PGLYRP1, là protein dài 196 axit amin, được bảo tồn cao, bao gồm peptit tín hiệu và miền liên kết peptidoglycan, được biểu hiện trong các bạch cầu trung tính và được giải phóng khi hoạt hóa chúng. Trình tự axit amin của PGLYRP1 (số truy cập NP_005082.1; SEQ ID NO: 8) được cung cấp dưới đây:

MSRRSMLLAWALPSLLRLGAAQETEDPACCSPIVPRNEWKALASECAQHLS
LPLRYVVVSHTAGSSCNTPASCQQQARNVQHYHMKTLGWCDVGYNFLIGE
DGLVYEGRGWNFTGAHSGHLWNPMSIGISFMGNYMDRVPTPQAIRAAQGL
LACGVAQGALRSNYVLKGHRDVQRTLSPGNQLYHLIQNWPHYRSP (trình tự
tín hiệu được gạch chân).

Do đó, theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế điều hòa giảm hoặc phong bế sự giải phóng của các xytokin tiền viêm từ các tế bào tủy (ví dụ, các tế bào đuôi gai và các bạch cầu đơn nhân). Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 phong bế sự giải phóng TNF- α , MIP-1beta, MCP-1, IL-1beta, GM-CSF, IL-6 và/hoặc IL-8 ra khỏi các đại thực bào, các bạch cầu trung tính, các tế bào mô hoạt dịch và/hoặc tế bào thông báo, như được bộc lộ ở đây.

Trong khi sự giải phóng có kiểm soát các xytokin viêm đáp ứng lại các kháng nguyên lạ có thể là có lợi (ví dụ, tạo ra đáp ứng miễn dịch thích nghi hữu hiệu) thì sự giải phóng quá nhiều xytokin có thể có các hậu quả thảm khốc. Ví dụ, một biến chứng lâm sàng thông thường và độc hại mà đã quan sát được khi dùng các kháng thể nhất định kháng lại các thụ thể miễn dịch bề mặt tế bào *in vivo* (ví dụ, các kháng thể kháng CD3 của người như OKT3) là hội chứng giải phóng xytokin (cytokine release syndrome - CRS), mà được kết hợp với sự giải phóng quá mức nhiều xytokin khác nhau (ví dụ, TNF-alpha, IFN-gamma, và IL-2) vào vòng tuần hoàn. CRS có thể diễn ra như là kết quả của sự liên kết đồng thời của các kháng thể với kháng nguyên cùng nguồn (ví dụ, CD3 trên các tế bào T) (thông qua vùng biến đổi của kháng thể) và các thụ thể Fc (ví dụ, các Fc γ R) và/hoặc các thụ thể bổ sung (thông qua vùng hằng định của kháng thể) trên các tế bào phụ (ví dụ, các tế bào trình diện kháng nguyên). Tương

tác này dẫn đến sự hoạt hóa của các tế bào (ví dụ, các tế bào T và/hoặc các tế bào phụ) và sự giải phóng của các xytokin khác nhau mà tạo ra đáp ứng viêm toàn thân được đặc trưng bằng chứng giảm huyết áp, sốt, và rét run. Các triệu chứng khác của CRS bao gồm sốt, ớn lạnh, buồn nôn, nôn mửa, và khó thở.

Ngoài việc phong bế sự sản sinh các xytokin viêm cảm ứng bởi PGLYRP1, theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế làm giảm tỷ lệ mắc phải hoặc dẫn đến không mắc phải hội chứng giải phóng xytokin khi được dùng cho đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 không cảm ứng sự biểu hiện của các xytokin viêm bởi các tế bào (ví dụ, các tế bào đuôi gai) khi các tế bào này được ủ với sự có mặt của một mình kháng thể, so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 có sự liên kết giảm đối với một hoặc nhiều FcγR, mà có thể giúp giảm sự khởi phát CSR.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế liên kết với cả TREM-1 của người và TREM-1 của các loài khác. Thuật ngữ "TREM-1", như được sử dụng ở đây, do đó bao gồm dạng có trong tự nhiên bất kỳ của TREM-1 mà có thể thu được từ sinh vật thích hợp bất kỳ. Ví dụ, TREM-1 để sử dụng như được mô tả ở đây có thể là TREM-1 của động vật có xương sống, như TREM-1 của động vật có vú, như TREM-1 của loài linh trưởng (như người, tinh tinh, khỉ cynomolgus, hoặc khỉ rhesus); loài gặm nhấm (như chuột nhắt hoặc chuột cống), bộ thỏ (như thỏ), hoặc động vật có guốc (như bò sữa, cừu, lợn hoặc lạc đà). Theo các phương án nhất định, TREM-1 là SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người, isoform 1). TREM-1 có thể là dạng trưởng thành của TREM-1, như protein TREM-1 mà đã trải qua việc xử lý sau dịch mã trong tế bào thích hợp. Protein TREM-1 trưởng thành như vậy có thể, ví dụ, được glycosyl hóa. TREM-1 có thể là protein TREM-1 có chiều dài đầy đủ.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng, theo ý nghĩa là chúng thu được trực tiếp hoặc gián tiếp từ dòng đơn của các lympho bào B. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 được sản xuất, sàng lọc, và tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong công bố đơn quốc tế số WO

2013/120553. Ngắn gọn là, chuột nhất thích hợp như chuột nhất đã được làm bất hoạt (knock-out - KO) TREM-1 hoặc TREM-1/TREM-3 được gây miễn dịch bằng TREM-1, tế bào biểu hiện TREM-1, hoặc kết hợp cả hai. Theo phương án khác, các kháng thể kháng TREM-1 là các kháng thể đa dòng, theo ý nghĩa là chúng là hỗn hợp của các kháng thể đơn dòng như được bộc lộ ở đây.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế được biểu hiện theo cách tái tổ hợp trên các tế bào nhân sơ hoặc các tế bào nhân chuẩn. Theo một số phương án, tế bào nhân sơ là *E. coli*. Theo các phương án nhất định, tế bào nhân chuẩn là tế bào nấm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào động vật có vú, như tế bào thu được từ sinh vật mà là loài linh trưởng (như người, tinh tinh, khỉ cynomolgus hoặc khỉ rhesus), loài gặm nhấm (như chuột nhất hoặc chuột cống), bộ thỏ (như thỏ) hoặc động vật có guốc (như bò sữa, cừu, lợn hoặc lạc đà). Các dòng tế bào động vật có vú thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào HEK293, các tế bào CHO, và các tế bào HELA. Các kháng thể kháng TREM-1 như được bộc lộ ở đây cũng có thể được sản xuất bằng các phương pháp khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như biểu hiện trên thể thực khuẩn hoặc biểu hiện trên nấm men. Khi được sản xuất, các kháng thể có thể được sàng lọc để liên kết với, ví dụ, TREM-1 có độ dài đầy đủ hoặc các thể đột biến của nó bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong phần ví dụ thực hiện của công bố đơn quốc tế số WO 2013/120553.

Thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng ở đây đề cập đến protein, thu được từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm, mà có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (TREM-1) hoặc một phần của nó. Thuật ngữ này bao gồm các kháng thể có độ dài đầy đủ thuộc lớp hoặc isotyp bất kỳ (tức là, IgA, IgE, IgG, IgM và/hoặc IgY) và chuỗi đơn hoặc mảnh bất kỳ của nó. Kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với kháng nguyên, hoặc một phần của nó, có thể liên kết duy nhất với kháng nguyên đó, hoặc một phần của nó, hoặc nó có thể liên kết với một số giới hạn các kháng nguyên tương đồng, hoặc một phần của chúng. Các kháng thể có chiều dài đầy đủ thường gồm ít nhất là bốn chuỗi polypeptit: hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) mà được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua. Một phân lớp globulin miễn dịch đặc biệt quan tâm trong lĩnh vực được là họ IgG. Ở người, lớp IgG có thể được phân chia tiếp

thành 4 phân lớp: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, dựa trên trình tự của các vùng hằng định của chuỗi nặng của chúng. Các chuỗi nhẹ có thể được phân chia thành hai typ, kappa và lambda, dựa trên các khác biệt về thành phần trình tự của chúng. Các phân tử IgG bao gồm hai chuỗi nặng, được liên kết với nhau bằng hai hoặc nhiều liên kết disulfua, và hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi được gắn với chuỗi nặng bằng liên kết disulfua. Chuỗi nặng có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và có tới ba vùng hằng định của chuỗi nặng (CH): CH1, CH2 và CH3. Chuỗi nhẹ có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ (CL). Các vùng VH và VL có thể được phân chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining region - CDR), đặt rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (framework region - FR). Các vùng VH và VL điển hình là bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự dưới đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng siêu biến của các chuỗi nặng và nhẹ tạo thành miền liên kết mà có khả năng tương tác với kháng nguyên, trong khi đó vùng hằng định của kháng thể có thể dàn xếp sự liên kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (các tế bào tác động), các thụ thể Fc và thành phần thứ nhất (C1q) của hệ thống bổ thể cổ điển. Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập. Thuật ngữ "kháng thể được phân lập" được dùng để chỉ kháng thể mà đã được tách và/hoặc thu hồi từ (các) thành phần khác trong môi trường trong đó nó được sản xuất và/hoặc kháng thể mà được tinh chế từ hỗn hợp các thành phần có trong môi trường trong đó nó được sản xuất. Các mảnh liên kết kháng nguyên nhất định của các kháng thể có thể thích hợp trong trường hợp của sáng chế, vì đã chỉ ra rằng chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể được dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà vẫn có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, như TREM-1, như được mô tả ở đây. Ví dụ về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, F(ab)S, Fv (điển hình là các miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể), Fv chuỗi đơn (scFv; xem, ví dụ, Bird *et al.*, *Science* 242:42S-426 (1988); Huston *et al.*, *PNAS* 85: 5879-5883 (1988)), các mảnh dsFv, Fd (điển hình là miền VH và CH1), và dAb (điển hình là miền VH); các miền VH, VL,

VhH, và V-NAR; các phân tử hóa trị một chứa chuỗi VH đơn và chuỗi VL đơn; các minibody, diabody, triabody, tetrabody, và kappa body (xem, ví dụ, Ill *et al.*, *Protein Eng* 10:949-57 (1997)); IgG lạc đà; IgNAR; cũng như một hoặc nhiều CDR được phân lập hoặc paratop chức năng, trong đó các CDR được phân lập hoặc các gốc hoặc các polypeptit liên kết kháng nguyên có thể được kết hợp hoặc liên kết với nhau để tạo thành mảnh kháng thể chức năng. Các typ khác nhau của các mảnh kháng thể đã được mô tả hoặc xem xét trong, ví dụ, Holliger and Hudson, *Nat Biotechnol* 2S :1126-1136 (2005) ; công bố đơn quốc tế số WO 2005/040219, và các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0238646 và 2002/0161201. Các mảnh kháng thể này có thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, và các mảnh này có thể được sàng lọc về tính hữu dụng theo cách giống như đối với các kháng thể nguyên vẹn.

Kháng thể "của người" (HuMAb) được dùng để chỉ kháng thể có các vùng biến đổi trong đó cả hai vùng khung và CDR đều thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Hơn nữa, nếu kháng thể chứa vùng hằng định thì vùng hằng định này còn thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể chứa các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đoạn đột biến được đưa vào bằng hiện tượng đột biến ngẫu nhiên hoặc đột biến điểm đặc hiệu in vitro hoặc bởi đột biến soma in vivo). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người," như được sử dụng ở đây, không được dự tính bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột nhắt, mà đã được ghép vào các trình tự khung của người. Các thuật ngữ các kháng thể "của người" và các kháng thể "hoàn toàn của người" được sử dụng với cùng ý nghĩa.

Kháng thể "được làm giống như của người" được dùng để chỉ kháng thể khả năng của người/không phải của người mà chứa một hoặc nhiều trình tự (các vùng CDR hoặc các phần của chúng) mà thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Do đó, kháng thể được làm giống như của người là globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó ít nhất là các gốc từ vùng siêu biến của kháng thể nhận này được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến của kháng thể từ các loài không phải

người (kháng thể cho) ví dụ như từ chuột nhắt, chuột cống, thỏ hoặc linh trưởng không phải người, mà có độ đặc hiệu, ái lực, thành phần trình tự và chức năng mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc FR của globulin miễn dịch của người được thay bằng các gốc tương ứng không phải của người. Ví dụ về sự cải biến như vậy là việc đưa vào một hoặc nhiều cái gọi là các đột biến ngược mà thường là các gốc axit amin thu được từ kháng thể cho. Việc làm giống như của người đối với kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến (xem, ví dụ, Antibody Engineering, Methods in Molecular Biology, vol. 248, biên tập bởi Benny K. C. Lo). Khung nhận thích hợp của người đối với cả miền biến đổi của chuỗi nặng và miền biến đổi của chuỗi nhẹ có thể được nhận diện bằng, ví dụ, độ tương đồng về trình tự hoặc cấu trúc. Cách khác, các khung nhận cố định có thể được sử dụng, ví dụ, dựa trên hiểu biết về các tính chất về cấu trúc, sinh lý, và hóa sinh. Các khung nhận có thể thu được từ dòng mầm hoặc thu được từ trình tự kháng thể trưởng thành. Các vùng CDR từ kháng thể cho có thể được truyền vào bằng cách ghép CDR. Kháng thể được làm giống như của người được ghép CDR có thể được tối ưu hóa tiếp, ví dụ, về ái lực, chức năng và các tính chất sinh lý bằng cách nhận diện các vị trí khung quyết định tại đó việc tái đưa vào (đột biến ngược) gốc axit amin từ kháng thể cho có tác động có lợi đối với các tính chất của kháng thể được làm giống như của người. Ngoài các đột biến ngược thu được từ kháng thể cho, kháng thể được làm giống như của người có thể được xử lý bằng cách đưa vào các gốc dòng mầm trong vùng CDR hoặc vùng khung, loại bỏ các epitop sinh miễn dịch, đột biến định hướng điểm, làm thành thực ái lực, v.v..

Hơn thế nữa, các kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm các gốc mà không có ở kháng thể nhận hoặc ở kháng thể cho. Các cải biến này được thực hiện để cải thiện thêm hiệu quả của kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được làm giống như của người sẽ bao gồm ít nhất một, điển hình là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người và trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các gốc FR là các gốc FR của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm giống như của người có thể, tùy ý, còn bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định (Fc) của globulin miễn dịch, điển hình là vùng hằng định của globulin miễn dịch của người. Thuật ngữ "dẫn xuất kháng thể được làm giống như của người" được dùng để

chỉ dạng được cải biến bất kỳ của kháng thể được làm giống như của người, như thể liên hợp của kháng thể và tác nhân hoặc kháng thể khác.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp của người", như được sử dụng ở đây, bao gồm tất cả các kháng thể của người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các biện pháp tái tổ hợp, như (a) các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) mà là chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với các gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được điều chế từ đó, (b) các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể, ví dụ, từ tế bào chuyển nhiễm, (c) các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người được tổ hợp, tái tổ hợp, và (d) các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các biện pháp bất kỳ khác mà bao gồm sự cắt ghép các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp của người như vậy bao gồm các vùng biến đổi và vùng hằng định mà sử dụng các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm nhất định của người được mã hóa bằng các gen dòng mầm, nhưng có các sắp xếp lại và các đột biến tiếp sau mà diễn ra, ví dụ, trong quá trình trưởng thành kháng thể. Như được biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Lonberg *Nature Biotech.* 23(9): 1117- 1125 (2005)), vùng biến đổi chứa miền liên kết kháng nguyên, mà được mã hóa bằng các gen khác nhau mà sắp xếp lại để tạo thành kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên lạ. Ngoài việc sắp xếp lại, vùng biến đổi có thể còn được cải biến tiếp bằng nhiều thay đổi axit amin đơn (được gọi là đột biến soma hoặc siêu đột biến) để tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên lạ. Vùng hằng định sẽ thay đổi để đáp ứng thêm đối với kháng nguyên (tức là, chuyển isotyp). Do đó, các phân tử axit nucleic được sắp xếp lại và được đột biến soma mà mã hóa các polypeptit globulin miễn dịch chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đáp ứng với kháng nguyên không thể tương đồng hoàn toàn về trình tự với các phân tử axit nucleic ban đầu, nhưng thay vào đó chúng sẽ về cơ bản là giống hoặc tương tự (tức là có độ tương đồng ít nhất là 80%).

"Kháng thể khảm" được dùng để chỉ kháng thể trong đó các vùng biến đổi thu được từ một loài và các vùng hằng định thu được từ một loài khác, như kháng thể trong đó các vùng biến đổi thu được từ kháng thể của chuột nhắt và các vùng hằng định thu được từ kháng thể của người.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế là các kháng thể IgG. "Kháng thể IgG", ví dụ, IgG1 của người, như được sử dụng ở đây, theo các phương án nhất định, có cấu trúc của kháng thể IgG có trong tự nhiên, tức là, nó có số lượng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các liên kết disulfua giống như kháng thể IgG có trong tự nhiên của cùng phân lớp. Ví dụ, kháng thể IgG1 TREM-1 bao gồm hai chuỗi nặng (HC) và hai chuỗi nhẹ (LC), trong đó hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết bởi số lượng và vị trí các cầu disulfua giống như số lượng và vị trí các cầu disulfua có trong kháng thể IgG1 có trong tự nhiên (trừ khi kháng thể này đã được đột biến để biến đổi các cầu disulfua).

Như được sử dụng ở đây, "isotyp" được dùng để chỉ lớp kháng thể (ví dụ, kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, và IgE) mà được mã hóa bằng các gen của vùng hằng định của chuỗi nặng.

"Alotyp" được dùng để chỉ các biến thể có trong tự nhiên trong nhóm isotyp cụ thể, các biến thể này khác ở một vài axit amin (xem, ví dụ, Jefferis *et al.*, *mAbs* 1:1 (2009)). Các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể là alotyp bất kỳ. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 là alotyp "IgG1.3f", mà có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU, so với isotyp IgG1 kiểu đại (ví dụ, SEQ ID NO: 9). Theo các phương án khác, các kháng thể kháng TREM-1 là alotyp "IgG1.1f", mà có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235E, G237A, A330S, và P331S, theo cách đánh số EU, so với isotyp IgG1 kiểu đại (ví dụ, SEQ ID NO: 9). Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TREM-1 là alotyp "IgG1-Aba", mà có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU, so với isotyp IgG1 kiểu đại (ví dụ, SEQ ID NO: 9). Theo các phương án thêm nữa, các kháng thể kháng TREM-1 là alotyp "IgG4-Aba", mà chứa miền CH1 của isotyp IgG4 kiểu đại (ví dụ, SEQ ID NO: 10) và các miền CH2 và CH3 của IgG1. Theo một số phương án, kháng thể alotyp IgG4-Aba có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU, so với isotyp IgG1 kiểu đại (ví dụ, SEQ ID NO: 9).

Cụm từ "kháng thể nhận biết kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên" ở đây được sử dụng một cách có thể thay thế nhau và có thể thay thế với cụm từ "kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với kháng nguyên".

Thuật ngữ "kháng thể được phân lập", như được dùng ở đây, được dự định để chỉ kháng thể mà đã được tách và/hoặc thu hồi từ (các) thành phần khác trong môi trường trong đó nó được sản xuất và/hoặc kháng thể mà được tinh chế từ hỗn hợp các thành phần có trong môi trường trong đó nó được sản xuất.

"Chức năng tác động" được dùng để chỉ tương tác của vùng Fc của kháng thể với thụ thể hoặc phối tử Fc, hoặc sự kiện hóa sinh mà thu được từ đó. Các "chức năng tác động" ví dụ bao gồm liên kết C1q, gây độc hại tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC), liên kết thụ thể Fc, các chức năng tác động qua trung gian Fc γ R như ADCC và sự thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (kháng thể dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP), và sự điều hòa giảm của thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR). Các chức năng tác động như vậy thường đòi hỏi vùng Fc được kết hợp với miền liên kết (ví dụ, miền biến đổi của kháng thể). Theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa các vùng Fc mà không liên kết với một hoặc nhiều Fc γ R và do đó, thiếu chức năng tác động (tức là, không tác động).

"Thụ thể Fc" hoặc "FcR" là thụ thể mà liên kết với vùng Fc của globulin miễn dịch. Các FcR mà liên kết với kháng thể IgG bao gồm các thụ thể thuộc họ Fc γ R, bao gồm các biến thể alen và các dạng được ghép nối khác của các thụ thể này. Họ Fc γ R bao gồm ba thụ thể hoạt hóa (Fc γ RI, Fc γ RIII, và Fc γ RIV ở chuột nhắt; Fc γ RIA, Fc γ RIIA, và Fc γ RIIIA ở người) và một thụ thể ức chế (Fc γ RIIB). Các tính chất khác nhau của các Fc γ R của người đã được biết trong lĩnh vực này. Phần lớn kiểu tế bào tác động bẩm sinh đồng biểu hiện một hoặc nhiều Fc γ R hoạt hóa và Fc γ RIIB ức chế, trong khi đó các tế bào sát thủ tự nhiên (natural killer - NK) lại biểu hiện chọn lọc một thụ thể Fc hoạt hóa (Fc γ RIII ở chuột nhắt và Fc γ RIIIA ở người) mà không biểu hiện Fc γ RIIB ức chế ở chuột nhắt và người. IgG1 của người liên kết với hầu hết các thụ thể Fc của người và được xem như là tương đương với IgG2a chuột về mặt kiểu thụ thể Fc hoạt hóa mà nó liên kết.

"Vùng Fc" (vùng kết tinh được thành mảnh) hoặc "miền Fc" hoặc "Fc" được dùng để chỉ vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng của kháng thể mà đảm xếp sự liên kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm liên kết với các thụ thể Fc nằm trên các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào tác động) hoặc với thành phần thứ nhất (C1q) của hệ thống bổ thể cổ điển. Do đó, vùng Fc bao gồm vùng hằng định của kháng thể ngoại trừ miền globulin miễn dịch vùng hằng định thứ nhất (ví dụ, CH1 hoặc CL).

Trên IgG, vùng Fc bao gồm các miền globulin miễn dịch CH2 và CH3 và vùng bản lề giữa các miền CH1 và CH2. Mặc dù định nghĩa về các biên của vùng Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch có thể thay đổi, như được định nghĩa ở đây, nhưng vùng Fc của chuỗi nặng IgG của người được định nghĩa là kéo dài từ gốc axit amin D221 đối với IgG1, V222 đối với IgG2, L221 đối với IgG3 và P224 đối với IgG4 đến đầu tận cùng carboxy của chuỗi nặng, trong đó việc đánh số là theo chỉ số EU như theo Kabat. Miền CH2 của vùng Fc IgG của người kéo dài từ axit amin 237 đến axit amin 340, và miền CH3 được nằm ở phía đầu tận cùng C của miền CH2 trong vùng Fc, tức là, nó kéo dài từ axit amin 341 đến axit amin 447 hoặc 446 (nếu không có gốc lysin đầu tận cùng C) hoặc 445 (nếu không có các gốc glyxin và lysin đầu tận cùng C) của IgG. Như được sử dụng ở đây, vùng Fc có thể là Fc có trình tự tự nhiên, bao gồm biến thể alotyp bất kỳ, hoặc Fc biến thể (ví dụ, Fc không có trong tự nhiên). Fc cũng có thể được dùng để chỉ vùng này dưới dạng phân lập hoặc trong trường hợp polypeptit protein chứa Fc như "protein liên kết chứa vùng Fc", còn để chỉ "protein dung hợp Fc" (ví dụ, kháng thể hoặc thể bám dính miễn dịch).

"Vùng Fc trình tự tự nhiên" hoặc "Fc trình tự tự nhiên" chứa trình tự axit amin mà giống với trình tự axit amin của vùng Fc được phát hiện trong tự nhiên. Các vùng Fc trình tự tự nhiên của người bao gồm vùng Fc IgG1 trình tự tự nhiên của người; vùng Fc IgG2 trình tự tự nhiên của người; vùng Fc IgG3 trình tự tự nhiên của người; và vùng Fc IgG4 trình tự tự nhiên của người cũng như các biến thể có trong tự nhiên của chúng. Fc trình tự tự nhiên bao gồm các alotyp khác nhau của các Fc (xem, ví dụ, Jefferis *et al.*, *mAbs* 1: 1 (2009)).

"Vùng Fc trình tự biến thể" hoặc "Fc không có trong tự nhiên" bao gồm sự cải biến, điển hình là thay đổi một hoặc nhiều tính chất chức năng của nó, như thời gian

bán thải trong huyết thanh, tính chất cố định bổ thể, tính chất liên kết thụ thể-Fc, độ ổn định protein và/hoặc tính chất gây độc hại tế bào phụ thuộc kháng nguyên, hoặc không có các tính chất này, trong số các yếu tố khác. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế có thể được cải biến hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc được cải biến để thay đổi khả năng glycosyl hóa của nó, cũng như để thay đổi một hoặc nhiều tính chất chức năng của kháng thể. Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 là isotyp IgG1 và chứa miền Fc được cải biến gồm một hoặc nhiều, và có lẽ tất cả các đột biến dưới đây mà sẽ dẫn đến sự giảm ái lực đối với các thụ thể Fc nhất định (L234A, L235E, và G237A) và dẫn đến giảm khả năng cố định bổ thể qua trung gian C1q (A330S và P331S) (việc đánh số gốc là theo chỉ số EU).

Thuật ngữ "bản lề", "miền bản lề", "vùng bản lề", và "vùng bản lề của kháng thể" được dùng để chỉ miền của vùng hằng định của chuỗi nặng mà kết nối miền CH1 với miền CH2 và bao gồm các phần bên trên, ở giữa, và bên dưới của bản lề (Roux *et al.*, *J Immunol* 161:4083 (1998)). Bản lề cung cấp mức độ linh hoạt thay đổi giữa vùng liên kết và vùng tác động của kháng thể và còn cung cấp các vị trí để liên kết disulfua nội phân tử giữa hai vùng hằng định của chuỗi nặng. Như được sử dụng ở đây, bản lề bắt đầu ở Glu216 và kết thúc ở Gly237 của tất cả các isotyp IgG (Roux *et al.*, *J Immunol* 161:4083 (1998)). Trình tự của các bản lề IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 kiểu đại đã được biết đến trong lĩnh vực này (ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 2017/087678). Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 của các kháng thể kháng TREM-1 được cải biến sao cho số gốc xystein trong vùng bản lề này được thay đổi, chẳng hạn, được tăng hoặc giảm. Phương pháp này được mô tả cụ thể hơn, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,677,425.

Vùng hằng định có thể được cải biến để ổn định hóa kháng thể, ví dụ, để giảm nguy cơ kháng thể hóa trị hai tách thành hai mảnh VH-VL hóa trị một. Ví dụ, trong vùng hằng định IgG4, gốc S228 (đánh số gốc theo chỉ số EU) có thể được đột biến thành gốc prolin (P) để ổn định hóa sự tạo thành cầu disulfua giữa chuỗi nặng ở bản lề (xem, ví dụ, Angal *et al.*, *Mol Immunol.* 30: 105-8(1995)). Các kháng thể hoặc các mảnh của chúng cũng có thể được xác định về các vùng quyết định bổ trợ (complementarity-determining region - CDR) của chúng. Thuật ngữ "vùng quyết định

bổ trợ" hoặc "vùng siêu biến", như được dùng ở đây, để chỉ các vùng của kháng thể trong đó các gốc axit amin liên quan đến việc liên kết kháng nguyên được bố trí. Vùng siêu biến hoặc các CDR có thể được nhận diện như là các vùng có tính biến đổi cao nhất về sự sắp xếp thẳng hàng axit amin của các miền biến đổi của kháng thể. Các dữ liệu có thể được sử dụng để nhận diện CDR như dữ liệu Kabat, các CDR, ví dụ, được định nghĩa là chứa các gốc axit amin 24-34 (CDR1), 50-59 (CDR2) và 89-97 (CDR3) của miền biến đổi của chuỗi nhẹ, và 31-35 (CDR1), 50-65 (CDR2) và 95-102 (CDR3) trong miền biến đổi của chuỗi nặng; (Kabat et al. 1991 ; Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health và Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Cách khác, các CDR có thể được định nghĩa như là các gốc từ "vùng siêu biến" (các gốc 26-33 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong miền biến đổi của chuỗi nhẹ và 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) trong miền biến đổi của chuỗi nặng (Chothia và Lesk, *J. Mol. Biol* 196 : 901-917 (1987)). Điển hình là, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng này được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong Kabat et al., xem phần trên đây. Các cụm từ như "vị trí Kabat", "gốc Kabat", và "theo Kabat" ở đây là chỉ hệ thống đánh số này dùng cho các miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc các miền biến đổi của chuỗi nhẹ. Sử dụng hệ thống đánh số Kabat, trình tự axit amin tuyến tính thực tế của một peptit có thể chứa ít hoặc nhiều axit amin hơn tương ứng với việc rút ngắn, hoặc chèn thêm vào, khung (FR) hoặc CDR của miền biến đổi. Ví dụ, miền biến đổi của chuỗi nặng có thể bao gồm các đoạn chèn axit amin (gốc 52a, 52b và 52c theo Kabat) vào sau gốc 52 của CDR H2 và các gốc được chèn (ví dụ các gốc 82a, 82b, và 82c, v.v. theo Kabat) vào sau gốc 82 của FR của chuỗi nặng. Việc đánh số các gốc theo Kabat có thể được xác định cho kháng thể nhất định bằng cách sắp xếp thẳng hàng ở các vùng đồng nhất về trình tự của kháng thể với trình tự được đánh số "chuẩn" theo Kabat.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "thể quyết định kháng nguyên" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên (ví dụ, TREM-1) mà globulin miễn dịch hoặc kháng thể liên kết một cách đặc hiệu với nó, ví dụ, như được xác định bằng phương pháp cụ thể được sử dụng để nhận dạng nó. Các epitop có thể được tạo thành cả từ các axit amin kề nhau (thường là epitop tuyến tính) hoặc các axit amin không kề nhau được đặt kề nhau bằng sự cuộn gập bậc ba của protein (thường là epitop cấu tạo). Các epitop được tạo thành từ các axit amin kề nhau thường, nhưng không luôn luôn, vẫn còn lại khi

tiếp xúc với các dung môi làm biến tính, trong khi đó các epitop được tạo thành bằng sự cuộn gập bậc ba thường bị mất đi khi xử lý với các dung môi làm biến tính. Epitop điển hình là bao gồm ít nhất là 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin trong cấu trúc không gian duy nhất. Các phương pháp để xác định các epitop nào được liên kết bởi kháng thể nhất định (tức là, lập bản đồ epitop) đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm thẩm tách miễn dịch và kết tủa miễn dịch, trong đó các peptit chồng chập hoặc liên kề so với, ví dụ, so với TREM-1 được thử nghiệm về tính phản ứng với kháng thể nhất định (ví dụ, kháng thể kháng TREM-1). Phương pháp xác định cấu tạo không gian của các epitop bao gồm các kỹ thuật trong lĩnh vực này và các kỹ thuật được mô tả ở đây, ví dụ, tinh thể học tia X, phân tích đột biến kháng nguyên, cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều và HDX-MS (*xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)*).

Thuật ngữ "liên kết với cùng một epitop" liên quan đến hai hoặc nhiều kháng thể có nghĩa là các kháng thể liên kết với cùng một đoạn gốc các gốc axit amin, như được xác định bằng phương pháp nhất định. Các kỹ thuật để xác định liệu các kháng thể có liên kết với "cùng một epitop trên TREM-1" so với các kháng thể được mô tả ở đây hay không bao gồm, ví dụ, các phương pháp lập bản đồ epitop, như, phương pháp phân tích tia X đối với các tinh thể của các phức chất kháng nguyên:kháng thể mà cung cấp sự phân giải về mặt nguyên tử đối với epitop và phương pháp đo khối phổ trao đổi hydro/deuteri (HDX-MS). Các phương pháp khác theo dõi sự liên kết của kháng thể với các mảnh kháng nguyên hoặc các dạng biến đổi đột biến của kháng nguyên trong đó sự mất liên kết do sự cải biến gốc axit amin trong trình tự kháng nguyên thường được xem như là dấu hiệu chỉ báo thành phần epitop. Ngoài ra, các phương pháp tổ hợp điện toán để lập bản đồ epitop cũng có thể được sử dụng. Các phương pháp này dựa vào khả năng của kháng thể quan tâm trong việc phân tách ái lực đặc hiệu các peptit ngắn ra khỏi các thư viện peptit biểu hiện thể thực khuẩn tổ hợp. Các kháng thể có cùng VH và VL hoặc cùng trình tự CDR1, 2 và 3 được kỳ vọng là liên kết với cùng một epitop.

Các kháng thể mà "cạnh tranh với kháng thể khác trong việc liên kết với đích" là để chỉ các kháng thể mà ức chế (một phần hoặc toàn bộ) sự liên kết của kháng thể

khác với đích. Liệu hai kháng thể có cạnh tranh với nhau trong việc liên kết với đích hay không, tức là liệu và đến mức độ nào một kháng thể sẽ ức chế sự liên kết của kháng thể khác với đích, có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm cạnh tranh đã biết, ví dụ, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) BIACORE®. Theo các phương án nhất định, một kháng thể cạnh tranh, và ức chế sự liên kết của kháng thể khác với đích khoảng ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 100%. Mức độ ức chế hoặc cạnh tranh có thể khác nhau tùy thuộc vào kháng thể nào là "kháng thể phong bế" (tức là, kháng thể lạnh mà được ủ đầu tiên với đích). Các thử nghiệm cạnh tranh có thể được thực hiện như được mô tả, ví dụ, trong Ed Harlow và David Lane, Cold Spring Harb Protoc ; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 hoặc trong Chương 11 của "Using Antibodies" của Ed Harlow và David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Hai kháng thể "cạnh tranh chéo" nếu các kháng thể này phong bế nhau cả hai chiều khoảng ít nhất là 50%, tức là bất kể liệu một kháng thể hay kháng thể còn lại có tiếp xúc trước tiên với kháng nguyên trong thử nghiệm cạnh tranh hay không.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", "liên kết chọn lọc", "liên kết một cách chọn lọc", và "liên kết một cách đặc hiệu", được dùng để chỉ sự liên kết của kháng thể với epitop trên kháng nguyên đã định. Điển hình là, kháng thể (i) liên kết với hằng số phân ly cân bằng (K_D) xấp xỉ nhỏ hơn 10^{-7} M, như xấp xỉ nhỏ hơn 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn khi được xác định bằng, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trong thiết bị BIACORE® 2000 sử dụng kháng nguyên đã định, ví dụ, TREM-1 tái tổ hợp của người, làm chất phân tích và kháng thể làm phối tử, hoặc phương pháp phân tích Scatchard phân tích sự liên kết của kháng thể với các tế bào dương tính với kháng nguyên, và (ii) liên kết với kháng nguyên đã định với ái lực mà ít nhất là lớn gấp hai lần so với ái lực của nó trong việc liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein) khác với kháng nguyên đã định hoặc kháng nguyên có liên quan gần. Do đó, kháng thể mà "liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1 của người" được dùng để chỉ kháng thể mà liên kết với TREM-1 hòa tan của người hoặc TREM-1 của người gắn với tế bào với K_D bằng 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, như xấp xỉ nhỏ hơn 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn nữa. Kháng thể mà "phản ứng chéo với TREM-1 của khỉ cynomolgus" được dùng để chỉ kháng thể mà liên kết với TREM-1 của khỉ

cynomolgus với K_D bằng 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, như xấp xỉ nhỏ hơn 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn. Theo các phương án nhất định, các kháng thể mà không phản ứng chéo với TREM-1 của các loài không phải là người thể hiện sự liên kết về cơ bản là không thể phát hiện được đối với các protein này trong các thử nghiệm liên kết chuẩn.

Thuật ngữ "độ đặc hiệu liên kết" ở đây để chỉ sự tương tác của một phân tử như kháng thể, hoặc mảnh của nó, với duy nhất một kháng nguyên, hoặc với một số giới hạn các kháng nguyên (hoặc các epitop) có độ tương đồng cao. Ngược lại, các kháng thể mà có khả năng liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1 không có khả năng liên kết với các phân tử không tương tự. Các kháng thể theo sáng chế có thể không có khả năng liên kết Nkp44, protein có liên quan đến tế bào sát thủ tự nhiên p44.

Độ đặc hiệu của tương tác và giá trị của hằng số liên kết cân bằng có thể được xác định trực tiếp bằng các phương pháp đã được biết rõ. Các thử nghiệm chuẩn để đánh giá khả năng của các phối tử (như các kháng thể) trong việc liên kết với các đích của chúng là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các phương pháp ELISA, thẩm tách Western, RIA, và phân tích đếm tế bào theo dòng. Động lực liên kết và ái lực liên kết của kháng thể cũng có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như SPR.

Các thử nghiệm liên kết cạnh tranh để xác định liệu hai kháng thể có cạnh tranh hoặc cạnh tranh chéo với nhau trong việc liên kết bao gồm: cạnh tranh để liên kết với các tế bào tủy biểu hiện TREM-1, ví dụ, bằng cách đếm tế bào theo dòng, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Các phương pháp khác bao gồm: SPR (ví dụ, BIACORE®), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm miễn dịch enzym trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn (enzyme immunoassay - EIA), thử nghiệm cạnh tranh kẹp (xem Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); thử nghiệm đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm kẹp đánh dấu trực tiếp pha rắn (xem Harlow và Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA đánh dấu trực tiếp pha rắn sử dụng nhãn đánh dấu 1-125 (xem Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988));

EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); và RIA đánh dấu trực tiếp. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nhóm" ("bin") được định nghĩa bằng cách sử dụng kháng thể tham chiếu. Nếu kháng thể thứ hai là không thể liên kết với kháng nguyên ở cùng thời điểm như kháng thể tham chiếu thì kháng thể thứ hai được cho là thuộc cùng "nhóm" như kháng thể tham chiếu. Trong trường hợp này, kháng thể tham chiếu và kháng thể thứ hai liên kết cạnh tranh với cùng một phần của kháng nguyên và là "các kháng thể cạnh tranh" tự tạo. Nếu kháng thể thứ hai có khả năng liên kết với kháng nguyên ở cùng thời điểm như kháng thể tham chiếu, thì kháng thể thứ hai được nêu là thuộc "nhóm" riêng biệt. Trong trường hợp này, kháng thể tham chiếu và kháng thể thứ hai không liên kết cạnh tranh với cùng một phần của kháng nguyên và là "các kháng thể không cạnh tranh" tự tạo.

Việc "tạo nhóm" ("binning") kháng thể không cung cấp thông tin trực tiếp về epitop. Các kháng thể cạnh tranh, tức là, các kháng thể thuộc cùng một "nhóm" có thể có các epitop giống nhau, các epitop chồng chập, hoặc thậm chí các epitop tách biệt. Trường hợp các epitop tách biệt là trường hợp nếu kháng thể tham chiếu liên kết với epitop của nó trên kháng nguyên tiếp nhận không gian cần thiết cho kháng thể thứ hai tiếp xúc với epitop của trên kháng nguyên ("gây trở ngại không gian"). Các kháng thể không cạnh tranh thường có các epitop riêng biệt.

Thuật ngữ "ái lực liên kết" ở đây đề cập đến số đo lực tương tác không đồng hóa trị giữa hai phân tử, ví dụ kháng thể, hoặc mảnh của nó, và kháng nguyên. Thuật ngữ "ái lực liên kết" được sử dụng để mô tả các tương tác hóa trị một (hoạt tính nội tại).

Ái lực liên kết giữa hai phân tử, ví dụ kháng thể, hoặc mảnh của nó, và kháng nguyên, thông qua tương tác hóa trị một có thể được định lượng bằng cách xác định hằng số phân ly cân bằng (K_D). Kết quả là, K_D có thể được xác định bằng số đo động lực tạo thành và phân ly phức hợp, ví dụ bằng phương pháp SPR. Các hằng số tỷ lệ tương ứng với sự kết hợp và phân ly của phức hợp hóa trị một được đề cập lần lượt là hằng số tỷ lệ kết hợp k_a (hoặc k_{on}) và hằng số tỷ lệ phân ly k_d (hoặc k_{off}). K_D liên quan đến k_a và k_d thông qua phương trình $K_D = k_d / k_a$. Theo định nghĩa nêu trên, ái lực liên kết kết hợp với các tương tác phân tử khác nhau, như so sánh ái lực liên kết

của các kháng thể khác nhau đối với kháng nguyên nhất định, có thể được so sánh bằng cách so sánh các giá trị K_D đối với các phức hợp kháng thể/kháng nguyên riêng rẽ.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực cao" đối với kháng thể IgG là để chỉ kháng thể có K_D đối với kháng nguyên đích bằng 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn. Tuy nhiên, liên kết "ái lực cao" có thể thay đổi đối với các isotyp kháng thể khác. Ví dụ, liên kết "ái lực cao" đối với isotyp IgM là để chỉ kháng thể có K_D bằng 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ " EC_{50} " trong trường hợp thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* sử dụng mảnh liên kết kháng thể hoặc kháng nguyên của nó, để chỉ nồng độ của kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó mà tạo ra đáp ứng bằng 50% đáp ứng tối đa, tức là, một nửa giữa đáp ứng tối đa và đáp ứng cơ sở.

Thuật ngữ "có trong tự nhiên" như được sử dụng ở đây để áp dụng cho một đối tượng là để chỉ rằng đối tượng này có thể được thấy trong tự nhiên. Ví dụ, trình tự polypeptit hoặc polynucleotit mà có trong sinh vật (bao gồm các virus) mà có thể được phân lập từ nguồn trong tự nhiên và chưa được cố tình cải biến trong phòng thí nghiệm bởi con người là có trong tự nhiên.

"Polypeptit" để chỉ chuỗi chứa ít nhất là hai gốc axit amin được liên kết liên tiếp với nhau, mà không có giới hạn trên về độ dài của chuỗi. Một hoặc nhiều gốc axit amin trong protein có thể có sự cải biến như, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự glycosyl hóa, sự phosphoryl hóa, hoặc sự tạo thành liên kết disulfua. "Protein" có thể chứa một hoặc nhiều polypeptit.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic", như được sử dụng ở đây, được dự tính là bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là phân tử chuỗi đơn hoặc chuỗi kép, và có thể là cADN.

"Phép thế axit amin bảo toàn" để chỉ phép thế gốc axit amin bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Các họ các gốc axit amin có mạch bên tương tự đã được định nghĩa trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm các axit amin có các mạch bên có tính kiềm (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các mạch bên có tính axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên không có điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin,

glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein, tryptophan), các mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), các mạch bên có nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Theo các phương án nhất định, gốc axit amin không thiết yếu được dự báo trong kháng thể kháng TREM-1 được thay thế bằng gốc axit amin khác từ họ có cùng mạch bên. Các phương pháp nhận diện sự thay thế bảo toàn nucleotit và axit amin mà không loại bỏ khả năng liên kết kháng nguyên đã được biết rõ trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); và Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Đối với các axit nucleic, thuật ngữ "tương đồng đáng kể" thể hiện là hai axit nucleic, hoặc các trình tự được thiết kế của chúng, khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu và so sánh, với các phần chèn hoặc xóa nucleotit thích hợp, là có độ tương đồng về các nucleotit ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 90% đến 95%, hoặc ít nhất là khoảng 98% đến 99,5%. Cách khác, sự tương đồng đáng kể tồn tại khi các đoạn sẽ lai hóa dưới các điều kiện lai hóa chọn lọc, với bộ thể của sợi.

Đối với các polypeptit, thuật ngữ "tương đồng đáng kể" thể hiện là hai polypeptit, hoặc các trình tự được thiết kế của chúng, khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu và so sánh, với các phần chèn hoặc xóa axit amin thích hợp, là có độ tương đồng về các axit amin ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 90% đến 95%, hoặc ít nhất là khoảng 98% đến 99,5%.

Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm số của số lượng các vị trí giống hệt nhau của hai trình tự (tức là, % tương đồng = số lượng vị trí giống hệt/tổng số các vị trí $\times 100$), tính đến số lượng chỗ trống, và độ dài của mỗi chỗ trống, mà cần được đưa vào để sắp xếp thẳng hàng tối ưu hai trình tự này. Việc so sánh các trình tự và xác định phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán toán học, như được mô tả trong các ví dụ không giới hạn dưới đây.

Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có sẵn ở trang web worldwideweb.gcg.com), sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và trọng số chỗ trống là 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và trọng số độ dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Phần trăm tương

đồng giữa hai trình tự nucleotit hoặc axit amin cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller (*CABIOS*, 4: 11-17 (1989)) thuật toán này đã được đưa vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), sử dụng bảng gốc trọng số PAM120, điểm phạt độ dài chỗ trống là 12 và điểm phạt chỗ trống là 4. Ngoài ra, phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể xác định bằng cách sử dụng thuật toán của Needleman và Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)), thuật toán này đã được đưa vào chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có sẵn tại trang web worldwideweb.gcg.com), sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, trọng số chỗ trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng số độ dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Các trình tự axit nucleic và protein được mô tả ở đây có thể còn được sử dụng làm "trình tự truy vấn" để thực hiện tra cứu đối với các cơ sở dữ liệu công khai, ví dụ, để nhận diện các trình tự có liên quan. Các tra cứu như vậy có thể được thực hiện nhờ sử dụng các chương trình NBLAST và XBLAST (phiên bản 2.0) của tác giả Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Các tra cứu nucleotit BLAST có thể được thực hiện với chương trình NBLAST, điểm ghi=100, độ dài từ=12, để thu được các trình tự nucleotit đồng nhất với các phân tử axit nucleic được mô tả ở đây. Tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình XBLAST, điểm ghi = 50, độ dài từ = 3 để thu được các trình tự axit amin tương đồng với các phân tử protein được mô tả ở đây. Để thu được sự sắp xếp thẳng hàng có chỗ trống nhằm các mục đích so sánh, chương trình Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong tài liệu của Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Khi sử dụng các chương trình BLAST và Gapped BLAST, thông số mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ, XBLAST và NBLAST) có thể được sử dụng. Xem worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov.

Các axit nucleic có thể có mặt trong toàn bộ tế bào, trong phần dung giải tế bào, hoặc dưới dạng được tinh chế một phần hoặc dạng hầu như tinh khiết. Axit nucleic được "phân lập" hoặc "được làm cho về cơ bản là tinh khiết" khi tinh chế từ các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ, các axit nucleic tế bào khác (ví dụ, các phân khác của nhiễm sắc thể) hoặc các protein tế bào khác, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý kiềm/SDS, hiện băng CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel

thạch tinh và các kỹ thuật khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Các axit nucleic, ví dụ, các cADN, có thể được đột biến, theo các kỹ thuật chuẩn để tạo ra các trình tự gen. Để mã hóa trình tự, các đột biến này có thể tác động đến trình tự axit amin nếu muốn. Cụ thể là, các trình tự ADN về cơ bản là tương đồng hoặc thu được từ các trình tự V, D, J tự nhiên, hằng định, thay đổi và các trình tự như vậy được mô tả ở đây là được tính đến ở đây (trong đó "thu được" thể hiện là một trình tự là tương đồng hoặc được cải biến so với trình tự khác).

Thuật ngữ "vector", như được sử dụng ở đây, được dự tính để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà đã được liên kết với nó. Một loại vector là "plasmid", mà dùng để chỉ vòng ADN sợi kép hình tròn mà các đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào. Một loại vector khác là vector virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào bộ gen virus này. Các vector nhất định có khả năng sao chép độc lập trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (chẳng hạn, các vector vi khuẩn có gốc sao chép từ vi khuẩn và vector động vật có vú thể episom). Các vector khác (chẳng hạn, không phải vector động vật có vú thể episom) có thể được hợp nhất vào bộ gen của tế bào chủ nhờ việc đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với bộ gen vật chủ. Ngoài ra, các vector nhất định có khả năng điều khiển sự biểu hiện của các gen mà chúng liên kết theo cách hoạt động được. Các vector như vậy được đề cập ở đây là "vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc một cách đơn giản là, "vector biểu hiện"). Thông thường, các vector biểu hiện hữu dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng các plasmid. Trong bản mô tả này, "plasmid" và "vector" có thể được sử dụng thay cho nhau do plasmid là dạng thường được sử dụng nhất của vector. Tuy nhiên, sáng chế cũng bao gồm các dạng khác của các vector biểu hiện, như các vector virus (chẳng hạn, các retrovirus bất hoạt sao chép, adenovirus và các virus liên kết adeno), mà có các chức năng tương đương.

Thuật ngữ "tế bào chủ tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "tế bào chủ"), như được sử dụng ở đây, được dự tính là để chỉ tế bào mà chứa axit nucleic mà không có mặt một cách tự nhiên trong tế bào, và có thể là tế bào mà vector biểu hiện tái tổ hợp đã được đưa vào đó. Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ như vậy được dự định để chỉ

không chỉ tế bào của đối tượng cụ thể mà còn thể hệ con của tế bào này. Vì các cải biến nhất định có thể xảy ra ở các thể hệ kế tiếp do sự đột biến hoặc do các ảnh hưởng của môi trường, thể hệ con như vậy trên thực tế có thể không giống với tế bào bố mẹ, nhưng vẫn được bao hàm trong phạm vi của thuật ngữ “tế bào chủ” như được sử dụng ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được liên kết" được dùng để chỉ sự kết hợp của hai hoặc nhiều phân tử. Liên kết có thể là liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị. Liên kết cũng có thể có tính di truyền (tức là, được dung hợp tái tổ hợp). Các liên kết như vậy có thể đạt được bằng cách sử dụng rất nhiều kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực này, như kỹ thuật liên hợp hóa học và sản xuất protein tái tổ hợp.

Như được sử dụng ở đây, “dùng” dùng để chỉ sự đưa theo cách vật lý một chế phẩm chứa chất điều trị vào một đối tượng, bằng cách sử dụng các phương pháp và hệ phân phối khác nhau bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các đường dùng khác nhau đối với các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây bao gồm đường dùng trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, dưới da, trong cột sống hoặc các đường dùng ngoài đường tiêu hóa khác, chẳng hạn bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ "dùng ngoài đường tiêu hóa" như được sử dụng ở đây có nghĩa các phương thức dùng khác ngoài dùng qua đường ruột và dùng tại chỗ, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong võ, trong mạch bạch huyết, trong thương tổn, trong nang, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, trong khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, ngoài màng cứng và trong xương ức, cũng như là điện chuyển *in vivo*. Cách khác, kháng thể được mô tả ở đây có thể được dùng qua đường không phải ngoài đường tiêu hóa, như đường dùng tại chỗ, qua biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ, trong mũi, qua đường miệng, qua âm đạo, qua trực tràng, dưới lưỡi, hoặc tại chỗ. Việc dùng cũng có thể được thực hiện, chẳng hạn, một lần, nhiều lần, và/hoặc trong một hoặc nhiều khoảng thời gian kéo dài.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "ức chế" hoặc "phong bế" (ví dụ, đề cập đến việc ức chế/phong bế liên kết của phối tử TREM-1 với TREM-1 trên các tế

bào) được sử dụng thay cho nhau và bao hàm cả việc ức chế/phong bế một phần và hoàn toàn. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 ức chế liên kết của phối tử TREM-1 với TREM-1 ít nhất là khoảng 50%, ví dụ, khoảng 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, hoặc 100%, được xác định, ví dụ, như được mô tả thêm ở đây. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 ức chế sự liên kết của phối tử TREM-1 với TREM-1 ở mức không lớn hơn 50%, ví dụ khoảng 40%, 30%, 20%, 10%, 5% hoặc 1%, được xác định, ví dụ, như được mô tả thêm ở đây.

Thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị" và "sự điều trị", như được sử dụng ở đây, để chỉ loại can thiệp hoặc xử lý bất kỳ được thực hiện trên, hoặc việc dùng hoạt chất cho, đối tượng nhằm mục đích làm đảo chiều, làm nhẹ bớt, làm cải thiện, làm ức chế, làm chậm lại hoặc ngăn ngừa sự tiến triển, sự phát triển, tính nghiêm trọng hoặc sự tái phát của một triệu chứng, biến chứng, tình trạng bệnh, hoặc dấu hiệu sinh hóa có liên quan đến bệnh hoặc tăng cường khả năng sống sót nói chung. Việc điều trị có thể là cho đối tượng bị bệnh hoặc đối tượng không bị bệnh (ví dụ, để phòng ngừa).

Thuật ngữ "liều hữu hiệu" hoặc "liều lượng hữu hiệu" được định nghĩa là lượng đủ để đạt được hoặc ít nhất một phần đạt được tác dụng mong muốn. "Lượng hữu hiệu trong điều trị" hoặc "liều lượng hữu hiệu trong điều trị" của một thuốc hoặc một tác nhân trị liệu là lượng bất kỳ của thuốc mà, khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một tác nhân trị liệu khác, giúp thúc đẩy sự thoái triển của bệnh được chứng minh bởi sự giảm mức nghiêm trọng của triệu chứng bệnh, sự gia tăng về tần suất và khoảng thời gian không có triệu chứng bệnh, hoặc sự ngăn ngừa sự suy yếu hoặc sự tàn phế do bệnh tật gây ra. Lượng hoặc liều lượng hữu hiệu trong điều trị của thuốc bao gồm "lượng hữu hiệu trong phòng ngừa" hoặc "liều lượng hữu hiệu trong phòng ngừa", mà là lượng thuốc bất kỳ mà, khi được dùng một mình hoặc kết hợp với một tác nhân trị liệu khác cho đối tượng có nguy cơ phát triển bệnh hoặc đang bị tái phát bệnh, sẽ làm ức chế sự phát triển hoặc sự tái phát của bệnh. Khả năng thúc đẩy sự thoái triển hoặc ức chế sự phát triển hoặc tái phát của bệnh của bệnh có thể được đánh giá bằng cách sử dụng nhiều phương pháp khác nhau đã biết đối với các chuyên gia có kỹ năng trong lĩnh vực này, như các phương pháp ở các đối tượng là người trong quá trình thử nghiệm lâm sàng, ở hệ mô hình động vật dự báo hiệu quả ở người, hoặc bằng cách thử nghiệm hoạt tính của tác nhân trong thử nghiệm *in vitro*.

Thuật ngữ "bệnh nhân" bao gồm đối tượng người và động vật có vú khác mà nhận việc điều trị trị liệu hoặc điều trị dự phòng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" bao gồm người hoặc động vật bất kỳ không phải là người. Ví dụ, các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư. Thuật ngữ "động vật không phải là người" bao gồm tất cả động vật có xương sống, chẳng hạn, động vật có vú và động vật không có vú, như động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, bò, gà, động vật lưỡng cư, loài bò sát. v.v.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ug" và "uM" được sử dụng một cách có thể thay thế lẫn lộn cho "μg" và "μM".

Các khía cạnh khác nhau được mô tả ở đây được mô tả chi tiết hơn trong các tiểu phần dưới đây.

I. Các kháng thể kháng TREM-1

Được mô tả ở đây là các kháng thể, ví dụ, các kháng thể đầy đủ của người, mà được đặc trưng bằng các dấu hiệu hoặc các tính chất chức năng cụ thể. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1 của người, và cụ thể hơn là một miền cụ thể (ví dụ, miền chức năng) trong miền ngoại bào của TREM-1 của người. Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với một vị trí trên TREM-1 mà phối tử TREM-1 (ví dụ, PGLYRP1) liên kết với vị trí này. Theo các phương án nhất định, các kháng thể là các kháng thể đối kháng, tức là, chúng ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính của TREM-1 (tức là, không chủ vận khi liên kết) trên các tế bào, ví dụ, các bạch cầu đơn nhân, các đại thực bào, và các bạch cầu trung tính. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 phản ứng chéo với TREM-1 từ một hoặc nhiều loài linh trưởng không phải người, như TREM-1 của khỉ cynomolgus. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 phong bế sự sản sinh các xytokin viêm (ví dụ, IL-6, TNF-α, IL-8, IL-1β, IL-12, và các kết hợp của chúng) bởi các tế bào (ví dụ, các đại thực bào, các tế bào đuôi gai, các bạch cầu trung tính) khi hoạt hóa. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng TREM-1 gồm các vùng Fc mà không liên kết với một hoặc nhiều FcγR. Theo các phương án khác, các kháng thể kháng TREM-1 không gây ra sự giải phóng các xytokin tiền viêm bởi các tế bào tùy

(ví dụ, các tế bào đuôi gai) và, nhờ đó làm giảm hoặc ngăn chặn sự khởi phát của bão xytokin viêm sau khi dùng các kháng thể kháng TREM-1 vào đối tượng cần điều trị.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 cụ thể được mô tả ở đây là các kháng thể, ví dụ, đơn dòng, tái tổ hợp, và/hoặc các kháng thể của người, mà cạnh tranh chéo với mAb 0318 trong việc liên kết với TREM-1 của người. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 còn cạnh tranh chéo với mAb 0318 trong việc liên kết với TREM-1 của khỉ cynomolgus. Nói cách khác, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế thuộc cùng "nhóm" như mAb 0318 trong các phương án nhất định.

Kháng thể mAb 0318 có vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) chứa SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) chứa SEQ ID NO: 15. Xem công bố đơn quốc tế số WO 2016/009086. mAb 0318 còn có CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng, mà lần lượt tương ứng với các axit amin 31-35, 50-68, và 101-110 của SEQ ID NO: 14. CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể mAb 0318 tương ứng với các axit amin 24-38, 54-60, và 93-101 của SEQ ID NO: 15.

Do đó, theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa VH và VL có trình tự SEQ ID NO.: 14 và 15. Theo phương án khác, VH của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR1 gồm các axit amin 31-35 (TYAMH) của SEQ ID NO: 14, trong đó một trong số các axit amin này có thể được thay thế bằng axit amin khác. Theo phương án nhất định, VH của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR2 gồm các axit amin 50-68 (RIRTKSSNYATYYAASVKG) của SEQ ID NO: 14, trong đó một, hai hoặc ba trong số các axit amin này có thể được thay thế bằng axit amin khác. Theo một số phương án, VH của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR3 gồm các axit amin 101-110 (DMGIRRQFAY) của SEQ ID NO: 14, trong đó một, hai hoặc ba trong số các axit amin này có thể được thay thế bằng axit amin khác.

Theo một số phương án, VL của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR1 gồm các axit amin 24-38 (QQSNQDPYT) của SEQ ID NO: 15, trong đó một, hai hoặc ba trong số các axit amin này có thể được thay thế bằng axit amin khác. Theo các phương án khác, VL của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR2 gồm các axit amin 54-60 (RASNLES) của SEQ ID NO: 15, trong đó một hoặc hai trong số các

axit amin này có thể được thay thế bằng axit amin khác. Theo một số phương án, VL của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR3 gồm các axit amin 93-101 (QQSNQDPYT) của SEQ ID NO: 15, trong đó một hoặc hai trong số các axit amin này có thể được thay thế bằng axit amin khác.

Các gốc methionin ở các CDR của các kháng thể có thể được oxy hóa, dẫn đến sự thoái biến hóa học tiềm năng và hệ quả là sự giảm hiệu lực của kháng thể. Do đó, các kháng thể kháng TREM-1 được bộc lộ ở đây có thể có một hoặc nhiều gốc methionin trong các CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được thay thế bằng các gốc axit amin mà không trải qua sự thoái biến oxy hóa. Theo một số phương án, các gốc methionin trong CDR1 và CDR3 của chuỗi nặng được thay thế bằng các gốc axit amin mà không trải qua sự thoái biến oxy hóa (ví dụ, glutamin hoặc leuxin). Do đó, theo một phương án VH của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR3 gồm các axit amin 101-110 (DQGIRRQFAY) của SEQ ID NO: 81 hoặc các axit amin 101-110 (DLGIRRQFAY) của SEQ ID NO: 82. Theo các phương án khác, VH của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR1 gồm các axit amin 31-35 (TYAQH) của SEQ ID NO: 83 hoặc các axit amin 31-35 (TYALH) của SEQ ID NO: 84. Tương tự, theo một số phương án, các vị trí khử amit có thể được loại bỏ khỏi các kháng thể kháng TREM-1, đặc biệt là trong các CDR.

Theo một số phương án, VH và VL của kháng thể kháng TREM-1 chứa các trình tự VH và VL của các kháng thể kháng TREM-1 được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102 A2, toàn bộ công bố đơn này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, VL của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 9 đến 27 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 28 đến 40 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102, và/hoặc trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 41 đến 119 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102. Theo một phương án, VH của kháng thể kháng TREM-1 chứa trình tự CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 120 đến 143 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 144 đến 172 trong công bố đơn quốc tế số WO

2017/152102, và/hoặc trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 173 đến 247 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa trình tự CDR và/hoặc trình tự vùng biến đổi mà có độ tương đồng ít nhất là 80% (ví dụ, độ tương đồng ít nhất là 85%, ít nhất là 95%, ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 99%) so với trình tự CDR và/hoặc trình tự vùng biến đổi của kháng thể mAb 0318.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) gồm các SEQ ID NO: 14 và 15. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 chứa chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC), trong đó HC chứa SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, hoặc SEQ ID NO: 53. Theo một số phương án, LC chứa SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 396 đến 475 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102 và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 316 đến 395 trong công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này chứa các trình tự axit amin như được thể hiện trong bảng 7. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54.

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng ít nhất là 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, hoặc 80% so với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

bất kỳ nêu ở đây, ví dụ các SEQ ID NO: 50 đến 54 có thể được sử dụng để tạo thành các kháng thể kháng TREM-1 có các đặc tính mong muốn, ví dụ, các đặc tính được mô tả thêm ở đây.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50, 51, 52, hoặc 53 và trong đó chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM1 chứa vùng hằng định của chuỗi nặng, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng này có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, L234A, L235E, G237A, D356E, L358M, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa vùng hằng định của chuỗi nặng, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng này có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, D356E, L358M, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa vùng hằng định của chuỗi nặng này có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, C226S, C229S, P238S, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa vùng hằng định của chuỗi nặng, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng này có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, P238S, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU.

Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết với các biến thể của TREM-1 của người (ví dụ, các isoform TREM-1 2 và 3, tương ứng là các SEQ ID NO: 2 và 3), như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Theo phương án khác, kháng thể kháng TREM-1 có

khả năng liên kết với TREM-1 của khí cynomolgus (SEQ ID NO: 7), như được xác định ở đây bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây liên kết với TREM-1 của người với ái lực cao, ví dụ, như được xác định bằng BIACORE™ (ví dụ, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế), với K_D bằng 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-9} M (1 nM) hoặc nhỏ hơn, 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-12} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-12} M đến 10^{-7} M, 10^{-11} M đến 10^{-7} M, 10^{-10} M đến 10^{-7} M, hoặc 10^{-9} M đến 10^{-7} M. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây liên kết với TREM-1 của khí cyno, ví dụ, như được xác định bằng BIACORE™ (ví dụ, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế), với K_D bằng 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-12} M hoặc nhỏ hơn, 10^{-12} M đến 10^{-7} M, 10^{-11} M đến 10^{-7} M, 10^{-10} M đến 10^{-7} M, hoặc 10^{-9} M đến 10^{-7} M.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế liên kết với TREM-1 ở một hoặc nhiều trong số các epitop giống như kháng thể mAb 0318. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết đặc hiệu với (i) ít nhất là một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A21, T22, K23, L24, T25, E26, và kết hợp bất kỳ của chúng và (ii) ít nhất là một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A49, S50, S51, Q52, K53, A54, W55, Q56, 157, 158, R59, D60, G61, E62, M63, P64, K65, T66, L67, A68, C69, T70, E71, R72, P73, S74, K75, N76, S77, H78, P79, V80, Q81, V82, G83, R84, 185, và kết hợp bất kỳ của chúng và (iii) ít nhất là một gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm C113, V114, 1115, Y116, Q117, P118, P119, và kết hợp bất kỳ của chúng của TREM-1 của người (ví dụ, Isoform 1, SEQ ID NO: 1). Xem công bố đơn quốc tế số WO 2016/009086.

Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết đặc hiệu với các axit amin D38 đến F48 của SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, HX-MS hoặc nhiễu xạ tia X. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 có epitop gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, hoặc tất cả trong số các gốc axit amin D38, V39, K40, C41, D42, Y43, T44, và L45 của SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người) và một, hai, hoặc tất cả các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm E46, K47, và F48 của SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người),

như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, HX-MS hoặc nhiễu xạ tia X. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TREM-1 có epitop gồm một, hai, ba, hoặc tất cả trong số các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm D42, E46, D92, và H93 của SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng các biến thể của TREM-1 và phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế có epitop gồm ít nhất là các gốc axit amin E46 và/hoặc D92 của SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người), như được xác định bằng cách sử dụng các biến thể của TREM-1 và phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Theo phương án khác, kháng thể kháng TREM-1 chứa một, hai, hoặc tất cả trong số các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L31, 186, và V101 của SEQ ID NO: 1 (TREM-1 của người). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết đặc hiệu với polypeptit chứa các gốc axit amin E19 đến L26 của TREM-1 của khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 7), như được xác định bằng cách sử dụng, ví dụ, HX-MS hoặc nhiễu xạ tia X.

Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết đặc hiệu với TREM-1 của người, trong đó epitop của kháng thể này chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc tất cả trong số các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm V39, K40, C41, D42, Y43, L45, E46, K47, F48, và A49 của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết đặc hiệu với TREM-1 của người, trong đó epitop của kháng thể này chứa D42 của SEQ ID NO: 1. Theo các phương án khác, kháng thể kháng TREM-1 có khả năng liên kết đặc hiệu với TREM-1 của người, trong đó epitop của kháng thể này chứa E46 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, epitop của kháng thể có thể chứa V39, C41, D42, Y43, L45 của SEQ ID NO: 1. Theo các phương án thêm nữa, epitop của kháng thể có thể chứa E46, K47 và A49 của SEQ ID NO: 1. Theo phương án cụ thể, epitop của kháng thể kháng TREM-1 có thể còn chứa F48 của SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 có biên dạng độ nhót tương tự như biên dạng độ nhót của kháng thể mAb 0318. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế có độ nhót nhỏ hơn 5 cP, nhỏ hơn 4 cP, nhỏ hơn 3 cP, nhỏ hơn 2,5 cP, nhỏ hơn 2,4 cP, nhỏ hơn 2,3 cP, nhỏ hơn 2,2 cP, nhỏ hơn 2,1 cP,

nhỏ hơn 2 cP, nhỏ hơn 1,9 cP, nhỏ hơn 1,8 cP, nhỏ hơn 1,7 cP, nhỏ hơn 1,6 cP, nhỏ hơn 1,5 cP, nhỏ hơn 1,4 cP, nhỏ hơn 1,3 cP, nhỏ hơn 1,2 cP, nhỏ hơn 1,1 cP, nhỏ hơn 1,0 cP, nhỏ hơn 0,9 cP, nhỏ hơn 0,8 cP, nhỏ hơn 0,7 cP, nhỏ hơn 0,6 cP, nhỏ hơn 0,5 cP, nhỏ hơn 0,4 cP, nhỏ hơn 0,3 cP, nhỏ hơn 0,2 cP, hoặc nhỏ hơn 0,1 cP ở nồng độ 80 mg/mL. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 có độ nhớt nhỏ hơn 10 cP (ví dụ, 9 cP) ở nồng độ 130 mg/mL.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa các đột biến, trong đó một hoặc nhiều gốc có điện tích âm trong các vùng CDR1 và CDR3 nhẹ của kháng thể được thay thế bằng các gốc không có điện tích. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 chứa sự thay thế ở một hoặc nhiều trong số các gốc axit amin D1, D30, D33, D74, D98, E27, và E97 của SEQ ID NO: 15 bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, và tyrosin. Các đột biến này được đề cập ở đây như là các đột biến "vá điện tích".

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa các đột biến ở vùng tương tác Fab-Fab của SEQ ID NO: 14 để giảm sự dime hóa Fab-Fab. Với kháng thể mAb 0318 đã chỉ ra rằng vì các kháng thể chứa hai Fab, sự multimer hóa có thể tác động đến độ nhớt. Các đột biến này được đề cập như là các đột biến "tương tác Fab- Fab". Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TREM-1 chứa đột biến ở gốc bất kỳ trong số các gốc Y32, R52, S55, S56, N57, A59, M102, I104 và R106 của SEQ ID NO: 14 hoặc F32, D33, Y34, Y53, R54, và D98 của SEQ ID NO: 15 với gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, serin, asparagin, glutamin, threonin, xystein, lysin, arginin, tryptophan, histidin và tyrosin.

Theo một phương án, kháng thể kháng TREM-1 như được bộc lộ ở đây chứa sự đột biến ở vị trí 32 của SEQ ID NO: 15, trong đó phenylalanin được đột biến thành axit amin được chọn từ các gốc axit amin glyxin, serin, threonin, xystein, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, và methionin. Sự đột biến này là dựa trên quan sát rằng sự thế Ala ở vị trí Y90 của SEQ ID NO: 1 đã cải thiện ái lực của SEQ ID NO: 3 đối với TREM-1. Y90 được phát hiện là tương tác với gốc phenylalanin của SEQ ID NO: 15. Sự đột biến của SEQ ID NO: 15 để cải thiện tương tác Fab-TREM-1 được đề cập như là sự đột biến "tương tác Fab- TREM-1". Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng

TREM-1 mà các vùng biến đổi của chúng được liên kết (ví dụ, liên kết cộng hóa trị hoặc dung hợp) với Fc, ví dụ, Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, mà có thể là alotyp hoặc isoalotyp bất kỳ, ví dụ, đối với IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); đối với IgG2: G2m, G2m23(n); đối với IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); và đối với K: Km, Km1, Km2, Km3 (xem, ví dụ, Jeffries *et al.* (2009) mAbs 1:1). Theo một số phương án, các vùng biến đổi của các kháng thể kháng TREM-1 được bộc lộ ở đây được liên kết với Fc không tác động hoặc hầu như không tác động, ví dụ, IgG1. Theo một số phương án, các vùng biến đổi của các kháng thể kháng TREM-1 được liên kết với Fc mà có khả năng liên kết giảm hoặc không có khả năng liên kết với một hoặc nhiều FcγR.

Theo một phương án, miền VH của kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể được dung hợp với miền hằng định của IgG của người (tức là, Fc), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, mà có trong tự nhiên hoặc được cải biến, ví dụ, như được mô tả thêm ở đây. Ví dụ, miền VH có thể chứa trình tự axit amin của miền VH bất kỳ được mô tả ở đây được dung hợp với vùng hằng định của IgG của người, ví dụ, IgG1, như trình tự axit amin của miền hằng định của IgG1 kiểu đại của người dưới đây:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9) hoặc trình tự của biến thể
alotyp của trình tự SEQ ID NO: 9 và có trình tự axit amin dưới đây:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**R**VEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 77; các gốc axit amin alotyp
cụ thể được bôi đậm và gạch chân).

Theo một phương án, miền VH của kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể chứa trình tự axit amin của miền VH bất kỳ được mô tả ở đây được dung hợp với một vùng hằng định không tác động, ví dụ, các trình tự axit amin của miền hằng định của IgG1 không tác động của người dưới đây:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78; "IgG1.1f," có các sự thay
thế L234A, L235E, G237A, A330S và P331S, theo cách đánh số EU, mà được gạch
chân)

hoặc

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 79; "IgG1.3f", có các sự thay
thế L234A, L235E và G237A, theo cách đánh số EU, mà được gạch chân).

Ví dụ, biến thể alotyp của IgG1 chứa K97R, D239E, và/hoặc L241M (được gạch chân và bôi đậm trên đây) và đánh số theo cách đánh số trong các SEQ ID NO: 77-79. Trong vùng nặng có chiều dài đầy đủ và theo cách đánh số của EU, các sự thay thế axit amin này được đánh số là K214R, D356E, và L358M. Theo một số phương án, vùng hằng định của kháng thể kháng TREM-1 còn chứa một hoặc nhiều

sự đột biến hoặc sự thay thế ở các axit amin L117, A118, G120, A213, và P214 (được gạch chân trên đây) như được đánh số trong SEQ ID NO: 77-79, hoặc L234, A235, G237, A330 và P331, theo cách đánh số EU. Theo các phương án khác, vùng hằng định của kháng thể kháng TREM-1 chứa một hoặc nhiều sự đột biến hoặc sự thay thế ở các axit amin L117A, A118E, G120A, A213S, và P214S của SEQ ID NO: 77-79, hoặc L234A, L235E, G237A, A330S và P331S, theo cách đánh số EU. Vùng hằng định của kháng thể kháng TREM-1 cũng có thể chứa một hoặc nhiều sự đột biến hoặc sự thay thế L117A, A118E và G120A của SEQ ID NO: 9, hoặc L234A, L235E và G237A, theo cách đánh số EU.

Theo một số phương án, miền VH của các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây chứa trình tự axit amin của miền VH bất kỳ được mô tả ở đây được dung hợp với miền hằng định của IgG1 chứa các trình tự axit amin dưới đây:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11; "IgG1-Aba", có các sự thay
thế K214R, C226S, C229S, và P238S, theo cách đánh số EU, mà được gạch chân);
hoặc

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV~~D~~HKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTSPPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12; "IgG4-Aba", có các sự thay
thế S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S,
và P238S, theo cách đánh số EU, mà được gạch chân).

Miền VL được mô tả ở đây có thể được dung hợp với miền hằng định của chuỗi nhẹ Kappa hoặc Lambda của người. Ví dụ, miền VL của kháng thể kháng TREM-1 có thể chứa trình tự axit amin của miền VL bất kỳ được mô tả ở đây được dung hợp với trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kappa của IgG1 của người dưới đây:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO: 13)

Theo các phương án nhất định, vùng hằng định của chuỗi nặng chứa lysin hoặc axit amin khác tại đầu tận cùng C, ví dụ, nó chứa các axit amin cuối cùng dưới đây: LSPGK (SEQ ID NO: 48) trong chuỗi nặng. Theo các phương án nhất định, vùng hằng định của chuỗi nặng thiếu một hoặc nhiều axit amin ở đầu tận cùng C, và có, ví dụ, trình tự đầu tận cùng C LSPG (SEQ ID NO: 49) hoặc LSP.

Theo một phương án, vùng biến đổi của kháng thể kháng TREM-1 được liên kết với Fc không tác động hoặc hầu như không tác động. Theo các phương án nhất định, vùng biến đổi của kháng thể kháng TREM-1 được liên kết với Fc được chọn từ nhóm bao gồm IgG1.1f, IgG1.3f, IgG1-Aba, và IgG4-Aba, như được mô tả ở đây.

Nói chung, các vùng biến đổi được mô tả ở đây có thể được liên kết với Fc chứa một hoặc nhiều cải biến, điển hình là để thay đổi một hoặc nhiều tính chất chức năng của kháng thể, như khả năng liên kết thụ thể Fc, khả năng giải phóng xytokin viêm, thời gian bán thải trong huyết thanh, khả năng cố định bổ thể, và/hoặc tính độc hại tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Hơn nữa, kháng thể được mô tả ở đây có thể được cải biến hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn vào kháng thể) hoặc được cải biến để thay đổi khả năng glycosyl hóa của nó, để thay đổi một hoặc nhiều tính chất chức năng của kháng thể. Mỗi phương án trong số các phương án này được mô tả cụ thể hơn dưới đây. Cách đánh số các gốc trong vùng Fc là cách đánh số chỉ số EU của Kabat.

Vùng Fc bao hàm các miền thu được từ vùng hằng định của globulin miễn dịch (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, và các lớp khác như IgA, IgD, IgE và IgM), bao gồm mảnh, thành phần tương tự, biến thể, thể đột biến, hoặc dẫn xuất của vùng hằng định. Vùng hằng định của globulin miễn dịch được xác định là có trong tự nhiên hoặc polypeptit được sản xuất bằng cách tổng hợp tương đồng với vùng tận cùng C của

globulin miễn dịch, và có thể chứa miền CH1, miền bản lề, miền CH2, miền CH3, hoặc miền CH4, một cách riêng rẽ hoặc kết hợp.

Các phân tử Ig tương tác với nhiều nhóm thụ thể tế bào. Ví dụ, các phân tử IgG tương tác với ba nhóm thụ thể Fc γ (Fc γ R) đặc hiệu đối với lớp IgG của kháng thể, cụ thể là Fc γ RI, Fc γ RII, và Fc γ RIII. Các trình tự quan trọng đối với sự liên kết của IgG với các thụ thể Fc γ R đã được báo cáo là nằm trong các miền CH2 và CH3. Thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể bị ảnh hưởng bởi khả năng mà kháng thể liên kết với thụ thể Fc (FcR).

Theo một phương án, vùng Fc của các kháng thể kháng TREM-1 là vùng Fc biến thể, ví dụ, trình tự Fc mà đã được cải biến (ví dụ, bằng sự thay thế, sự xóa, và/hoặc sự chèn axit amin) so với trình tự Fc gốc (ví dụ, polypeptit Fc không được cải biến mà sau đó được cải biến để tạo ra biến thể), để tạo ra các dấu hiệu cấu trúc mong muốn và/hoặc hoạt tính sinh học mong muốn.

Ví dụ, có thể tạo các cải biến ở vùng Fc để tạo ra biến thể Fc mà (a) có tính độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) tăng hoặc giảm, (b) có tính độc hại tế bào qua trung gian bổ thể (complement mediated cytotoxicity - CDC) tăng hoặc giảm, (c) có ái lực tăng hoặc giảm đối với C1q và/hoặc (d) có ái lực tăng hoặc giảm đối với thụ thể Fc so với Fc gốc. Các biến thể vùng Fc như vậy sẽ thường chứa ít nhất là một sự cải biến axit amin trong vùng Fc. Sự kết hợp các cải biến axit amin được cho là đặc biệt mong muốn. Ví dụ, vùng Fc biến thể có thể chứa hai, ba, bốn, năm, v.v. sự thay thế trong đó, ví dụ, ở các vị trí trong vùng Fc đặc hiệu được nhận diện ở đây.

Vùng Fc biến thể cũng có thể chứa sự thay đổi trình tự trong đó các axit amin có liên quan đến sự tạo thành liên kết disulfua được loại bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác. Sự loại bỏ như vậy có thể tránh phản ứng với các protein chứa xystein khác có trong tế bào chủ được sử dụng để sản xuất các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây. Thậm chí khi các gốc xystein được loại bỏ, các miền Fc chuỗi đơn vẫn có thể tạo thành miền Fc dime mà được giữ với nhau bằng liên kết không cộng hóa trị. Theo các phương án khác, vùng Fc có thể được cải biến để khiến nó tương thích với tế bào chủ được chọn. Ví dụ, người ta có thể loại bỏ trình tự PA gần đầu tận cùng N của vùng Fc tự nhiên điển hình, mà có thể được nhận biết bằng enzym thủy

phân ở E. coli như prolin iminopeptidaza. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong miền Fc có thể được loại bỏ. Các gốc mà được glycosyl hóa một cách điển hình (ví dụ, asparagin) có thể tạo ra đáp ứng hủy tế bào. Các gốc như vậy có thể được xóa bỏ hoặc được thay thế bằng các gốc không được glycosyl hóa (ví dụ, alanin). Theo các phương án khác, các vị trí liên quan đến sự tương tác với bề mặt, như vị trí liên kết C1q, có thể được loại bỏ khỏi vùng Fc. Ví dụ, người ta có thể xóa bỏ hoặc thay thế trình tự EKK của IgG1 của người. Theo các phương án nhất định, các vị trí mà tác động đến sự liên kết với các thụ thể Fc có thể được loại bỏ, tốt hơn là các vị trí không phải là các vị trí liên kết thụ thể dự phòng. Theo các phương án khác, vùng Fc có thể được cải biến để loại bỏ vị trí ADCC. Các vị trí ADCC đã được biết trong lĩnh vực này; xem, ví dụ, Sarmay *et al.*, *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 (1992) liên quan đến các vị trí ADCC trong IgG1. Các ví dụ cụ thể của các miền Fc biến thể được bộc lộ, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO 97/34631 và WO 96/32478.

Theo một phương án, vùng bản lề của Fc được cải biến sao cho số gốc xystein trong vùng bản lề này được thay đổi, chẳng hạn, được tăng hoặc giảm. Phương pháp này được mô tả thêm bởi Bodmer *et al.* trong patent Mỹ số 5,677,425. Số gốc xystein trong vùng bản lề của Fc được thay đổi, chẳng hạn, để tạo điều kiện cho việc lắp ráp các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc để làm tăng hoặc giảm độ ổn định của kháng thể. Theo một phương án, vùng bản lề Fc của kháng thể được đột biến để làm giảm thời gian bán thải sinh học của kháng thể. Cụ thể hơn, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng phân giới miền CH₂-CH₃ của mảnh bản lề Fc sao cho kháng thể có khả năng liên kết với protein A thuộc *Staphylococcy* (SpA) suy yếu so với khả năng liên kết với SpA thuộc miền bản lề Fc tự nhiên. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn bởi Ward *et al* trong patent Mỹ số 6,165,745.

Theo các phương án khác nữa, vùng Fc được thay đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng một gốc axit amin khác để thay đổi chức năng (các chức năng) tác động của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, 322, 330, và/hoặc 331 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể có ái lực thay đổi đối với phối tử tác động nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu.

Phối tử tác động mà ái lực đối với nó được thay đổi có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn bởi Winter *et al.* trong các patent Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260.

Theo ví dụ khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin 329, 331 và 322 có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể có khả năng liên kết C1q thay đổi và/hoặc có tính độc gây hại tế bào phụ thuộc kháng thể giảm hoặc không còn tính độc gây hại tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Phương pháp này được mô tả chi tiết bởi Idusogie *et al.* trong patent Mỹ số 6,194,551.

Theo ví dụ khác, một hoặc nhiều gốc axit amin trong các vị trí axit amin 231 và 239 được thay đổi để nhờ đó thay đổi khả năng của kháng thể trong việc cố định bổ thể. Phương pháp này được mô tả thêm bởi Bodmer *et al.* trong công bố đơn quốc tế số WO 94/29351.

Theo ví dụ khác, vùng Fc có thể được cải biến để giảm tính độc hại tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc để giảm ái lực đối với thụ thể Fcγ bằng cách cải biến một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí dưới đây: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 hoặc 439. Các sự thay thế ví dụ bao gồm 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D, và 332E. Các biến thể ví dụ bao gồm 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T, và 267E/268F/324T. Các cải biến khác để tăng cường các tương tác FcγR và bổ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thay thế 298 A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I, và 396L. Các cải biến này và các cải biến khác được xem xét trong Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

Các cải biến Fc khác mà có thể được thực hiện đối với các Fc là các cải biến để làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết với FcγR và/hoặc các protein bổ thể, nhờ đó làm giảm hoặc làm mất các chức năng tác động qua trung gian Fc như ADCC, ADCP, và CDC. Các cải biến ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sự thay

thể, sự chèn, và sự xóa bỏ ở các vị trí 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, 328, 330, và/hoặc 331 (ví dụ, 330 và 331), trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU. Các thay thế ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 234A, 235E, 236R, 237A, 267R, 269R, 325L, 328R, 330S, và 331S (ví dụ, 330S, và 331S), trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU. Biến thể Fc có thể chứa 236R/328R. Các cải biến khác để giảm các tương tác Fc γ R và bổ thể bao gồm các sự thay thế 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P, và 234V, cũng như sự loại bỏ sự glycosyl hóa ở vị trí 297 bằng cách đột biến hoặc cách dùng enzym hoặc bằng cách sản xuất ở các sinh vật như vi khuẩn mà không glycosyl hóa các protein. Các cải biến này và các cải biến khác được xem xét trong Strohl, 2009, *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691.

Tùy ý, vùng Fc có thể chứa gốc axit amin không có trong tự nhiên tại vị trí bổ sung và/hoặc vị trí khác đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến (xem, ví dụ, các patent Mỹ số 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; 6,194,551; 7,317,091; 8,101,720; các công bố đơn quốc tế số WO 00/42072; WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925, và WO 06/0201 14).

Các ái lực và các tính chất liên kết của vùng Fc đối với phối tử của nó có thể xác định được bằng nhiều phương pháp thử nghiệm *in vitro* (thử nghiệm trên cơ sở hóa sinh hoặc miễn dịch) đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp cân bằng (ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunoabsorbent assay - ELISA), hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA)), hoặc phương pháp động học (ví dụ, phân tích BIACORE), và các phương pháp khác như các thử nghiệm liên kết gián tiếp, các thử nghiệm ức chế cạnh tranh, truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (fluorescence resonance energy transfer - FRET), điện di trên gel và sắc ký (ví dụ, lọc gel). Các phương pháp này và các phương pháp khác có thể sử dụng nhãn đánh dấu trên một hoặc nhiều thành phần được kiểm tra và/hoặc sử dụng nhiều phương pháp phát hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhãn đánh dấu sinh màu, huỳnh quang, phát quang, hoặc đồng vị. Phần mô tả chi tiết về ái lực và động lực liên kết có thể

thấy trong tài liệu của Paul, W. E., ed., *Fundamental immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), tài liệu này tập trung vào các tương tác kháng thể-kháng nguyên.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế chứa Fc mà có khả năng liên kết giảm hoặc không có khả năng liên kết với các FcγR. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 có ái lực liên kết giảm đối với FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b), hoặc kết hợp bất kỳ của chúng so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 có ái lực liên kết đối với FcγRI (CD64) giảm khoảng ít nhất là hai lần, ít nhất là ba lần, ít nhất là bốn lần, ít nhất là năm lần, ít nhất là sáu lần, ít nhất là bảy lần, ít nhất là tám lần, ít nhất là chín lần, hoặc ít nhất là 10 lần so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 chứa biến thể của Fc của IgG1 chứa: (a) một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235E, G237A, và kết hợp bất kỳ của chúng, theo cách đánh số EU; (b) một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234A, L235E, G237A, A330S, P331S, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU; (c) một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm K214R, C226S, C229S, P238S, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU; hoặc (d) một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm S131C, K133R, G137E, G138S, Q196K, I199T, N203D, K214R, C226S, C229S, P238S, và kết hợp bất kỳ của chúng theo cách đánh số EU.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1, như được bộc lộ ở đây, có (a) isotyp IgG1 và chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin ở vùng Fc tại gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: N297A, N297Q, D270A, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E, , L328E, P238D, S267E, L328F, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, và kết hợp bất kỳ của

chúng, trong đó việc đánh số các gốc là theo cách đánh số EU hoặc cách đánh số Kabat, hoặc chứa sự xóa bỏ axit amin ở vùng Fc ở vị trí tương ứng với glyxin 236; (b) isotyp IgG2 và chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin ở vùng Fc tại gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E, và kết hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc là theo cách đánh số EU hoặc cách đánh số Kabat; hoặc (c) isotyp IgG4 và chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin ở vùng Fc tại gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: E233P, F234V, L234A/F234A, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q, và kết hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc là theo cách đánh số EU hoặc cách đánh số Kabat. Theo một số phương án, (a) vùng Fc còn chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung tại gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm A330L, L234F; L235E, P331S, và kết hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc là theo cách đánh số EU hoặc cách đánh số Kabat; (b) vùng Fc còn chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm M252Y, S254T, T256E, và kết hợp bất kỳ của chúng, trong đó việc đánh số các gốc là theo cách đánh số EU hoặc cách đánh số Kabat; hoặc (c) vùng Fc còn chứa sự thay thế axit amin S228P theo cách đánh số EU hoặc Kabat. Xem công bố đơn quốc tế số WO 2017/152102.

Theo các phương án nhất định, Fc được chọn sao cho nó có khả năng cố định bổ thể giảm. Một Fc được lấy làm ví dụ, *ví dụ*, IgG1 Fc, với khả năng cố định bổ thể giảm có hai sự thay thế axit amin sau đây: A330S và P331S.

Theo các phương án nhất định, Fc được chọn sao cho nó về cơ bản là không có chức năng tác động, tức là nó có khả năng liên kết giảm đối với các FcγR và khả năng cố định bổ thể giảm. Một Fc được lấy làm ví dụ, *ví dụ*, Fc IgG1, mà không có tác động, chứa năm đột biến sau: L234A, L235E, G237A, A330S và P331S.

II. Các tính chất vật lý của kháng thể

Các kháng thể kháng TREM-1, ví dụ, các kháng thể được mô tả ở đây, có một số hoặc tất cả các đặc tính vật lý của các kháng thể kháng TREM-1 đặc hiệu được mô tả ở đây, như các đặc tính được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Các vị trí glycosyl hóa, đặc biệt là trong các vùng biến đổi, có thể dẫn đến tính sinh miễn dịch của kháng thể gia tăng hoặc dẫn đến sự thay đổi pK của kháng thể do khả năng liên kết kháng nguyên thay đổi (Marshall *et al.*, (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala và Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.*, (1988) *J Exp Med* 168: 1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.*, (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.*, (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Sự glycosyl hóa đã được biết là diễn ra ở các môtip chứa trình tự N-X-S/T. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế không có khả năng glycosyl hóa vùng biến đổi hoặc có khả năng glycosyl hóa vùng biến đổi giảm. Điều này có thể đạt được hoặc là bằng cách chọn lọc các kháng thể mà không có môtip glycosyl hóa ở vùng biến đổi hoặc là bằng cách đột biến các gốc trong vùng glycosyl hóa. Do đó, theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 như được bộc lộ ở đây là có tính sinh miễn dịch ít hơn so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 không chứa các vị trí đồng phân asparagin. Sự khử amit hóa asparagin có thể diễn ra trên các trình tự N-G hoặc D-G và dẫn đến sự tạo ra gốc axit isoaspartic mà đưa một nút xoắn vào chuỗi polypeptit và làm giảm tính ổn định của nó (tác động của axit isoaspartic).

Mỗi kháng thể sẽ có điểm đẳng điện (isoelectric point - pi) duy nhất, mà thường nằm trong khoảng pH từ 6 đến 9,5. Điểm đẳng điện (pi) đối với kháng thể IgG1 thường nằm trong khoảng pH từ 7 đến 9,5 và pi đối với kháng thể IgG4 thường nằm trong khoảng pH từ 6 đến 8. Có suy đoán rằng các kháng thể có pi nằm ngoài khoảng thông thường có thể có sự duỗi nếp gấp và tính bất ổn nhất định trong điều kiện *in vivo*. Do đó, các kháng thể kháng TREM-1, như được bộc lộ ở đây, có thể có giá trị pi mà nằm trong khoảng thông thường (ví dụ, từ 8 đến 9). Điều này có thể đạt được bằng cách chọn lọc các kháng thể có pi trong khoảng thông thường hoặc bằng cách đột biến các gốc bề mặt có điện tích.

Mỗi kháng thể sẽ có nhiệt độ nóng chảy đặc trưng, với nhiệt độ nóng chảy cao hơn thể hiện tính ổn định nói chung lớn hơn *in vivo* (Krishnamurthy R và Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Nhìn chung, T_m (nhiệt độ duỗi nếp

gấp đầu tiên) có thể là lớn hơn 60°C, lớn hơn 65°C, hoặc lớn hơn 70°C. Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế có nhiệt độ nóng chảy cao hơn so với kháng thể chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54. Do đó, theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế là ổn định nhiệt so với kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 76 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54, như được đo bằng, ví dụ, máy đo nhiệt lượng quét vi sai mao quản (Capillary Differential scanning calorimeter - CAP-DSC). Điểm nóng chảy của kháng thể có thể được đo bằng cách sử dụng phép đo nhiệt lượng quét vi sai (Chen *et al.*, (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirlando *et al.*, (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) hoặc lưỡng sắc tròn (Murray *et al.*, (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9). Theo một số phương án, khoảng 10% đến 20%, khoảng 20% đến 30% (ví dụ, 24%), hoặc khoảng 30% đến 40% kháng thể là có thể nghịch đảo khi nó bị gia nhiệt đến 77°C.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế không phân hủy nhanh chóng. Sự phân hủy kháng thể có thể được đo bằng cách sử dụng phương pháp điện di mao quản (capillary electrophoresis - CE) và MALDI-MS (Alexander A J và Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1, như được bộc lộ ở đây, có hiệu ứng kết tụ tối thiểu, hiệu ứng này có thể dẫn đến sự kích hoạt đáp ứng miễn dịch không mong muốn và/hoặc tính chất dược động học thay đổi hoặc không có lợi. Nhìn chung, các kháng thể là chấp nhận được với mức kết tụ là 25% hoặc nhỏ hơn, 20% hoặc nhỏ hơn, 15% hoặc nhỏ hơn, 10% hoặc nhỏ hơn, hoặc 5% hoặc nhỏ hơn. Sự kết tụ có thể được đo bằng một số kỹ thuật, bao gồm sắc ký cột loại trừ theo kích cỡ (size-exclusion column - SEC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC), và phương pháp tán xạ ánh sáng động (dynamic light scattering - DLS). Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế là monome như được thấy bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao loại trừ theo kích cỡ (SE-HPLC). Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 thể hiện nguy cơ tối thiểu đối với sự phân mảnh như được quan sát bằng phương pháp

phổ khối nối tiếp sắc ký lỏng hai chiều (two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry - 2D-LC/MS) hoặc phương pháp phân tích khối lượng bảo toàn bằng cách sử dụng phương pháp phổ khối nối tiếp sắc ký lỏng (LC/MS).

III. Axit nucleic, vector, và tế bào

Khía cạnh khác được mô tả ở đây liên quan đến các phân tử axit nucleic mà mã hóa các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây. Các axit nucleic có thể có mặt trong toàn bộ tế bào, trong phần dung giải tế bào, hoặc dưới dạng được tinh chế một phần hoặc dạng hầu như tinh khiết. Axit nucleic được “phân lập” hoặc “được làm cho về cơ bản là tinh khiết” khi tinh chế từ các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ, các axit nucleic tế bào khác (ví dụ, ADN nhiễm sắc thể khác, ví dụ, ADN nhiễm sắc thể mà liên kết với ADN phân lập trong tự nhiên) hoặc các protein tế bào khác, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm xử lý kiềm/SDS, hiện băng CsCl, sắc ký cột, dùng các enzym giới hạn, điện di trên gel thạch tinh và các kỹ thuật khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Axit nucleic được mô tả ở đây có thể là, ví dụ, ADN hoặc ARN và có thể hoặc không thể chứa các trình tự intron. Theo một số phương án, axit nucleic là phân tử cADN.

Các axit nucleic được mô tả ở đây có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Đối với các kháng thể được biểu hiện bằng các tế bào lai (ví dụ, các tế bào lai được điều chế từ chuột nhắt chuyển gen mang gen globulin miễn dịch của người như được mô tả thêm dưới đây), các cADN mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được làm từ tế bào lai có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn hoặc bằng các kỹ thuật tách dòng cADN. Đối với các kháng thể thu được từ thư viện gen globulin miễn dịch (ví dụ, sử dụng các kỹ thuật hiển thị thể thực khuẩn), axit nucleic mã hóa kháng thể có thể được lấy từ thư viện.

Theo một số phương án, các axit nucleic được mô tả ở đây là các axit nucleic mã hóa các trình tự VH và VL của các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế. Các trình tự ADN ví dụ mã hóa các trình tự VH và VL lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 58-61 và 62-65.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng TREM-1 như được bộc lộ ở đây có thể bao gồm việc biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong dòng tế bào chứa các trình tự nucleotit mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với peptit tín hiệu, *ví dụ*, các SEQ ID NO: 58-61 và 62-65. Các tế bào chủ chứa các trình tự nucleotit này được bao hàm ở đây.

Khi các mảnh ADN mã hóa các đoạn VH và VL thu được, các mảnh ADN này có thể còn được thao tác xử lý bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn, *ví dụ* để chuyển hóa các gen vùng biến đổi thành các gen chuỗi kháng thể có chiều dài đầy đủ, thành các gen mảnh Fab hoặc thành gen scFv. Trong các quá trình xử lý này, mảnh ADN mã hóa VL hoặc VH được liên kết về một cách có thể hoạt động được với mảnh ADN khác mã hóa protein khác, như vùng hằng định kháng thể hoặc tác nhân liên kết linh hoạt. Thuật ngữ "được liên kết một cách có thể hoạt động được", như được sử dụng ở đây, được dự tính có nghĩa là hai mảnh ADN được nối với nhau sao cho các trình tự axit amin được mã hóa bởi hai mảnh ADN vẫn giữ ở trong khung.

ADN phân lập mã hóa vùng VH có thể được chuyển thành gen chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết một cách có thể hoạt động được ADN mã hóa VH với phân tử ADN khác mã hóa các vùng hằng định của chuỗi nặng (vùng bản lề, CH1, CH2 và/hoặc CH3). Trình tự của các gen vùng hằng định của chuỗi nặng của người đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem, *ví dụ*, Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng phương pháp khuếch đại PCR chuẩn. Vùng hằng định của chuỗi nặng có thể là vùng hằng định của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD, *ví dụ*, vùng hằng định của IgG2 và/hoặc IgG 4. Đối với gen chuỗi nặng mảnh Fab, ADN mã hóa VH có thể được liên kết một cách có thể hoạt động được với phân tử ADN khác chỉ mã hóa vùng hằng định CH1 chuỗi nặng.

ADN phân lập mã hóa vùng VL có thể được chuyển thành gen chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ (cũng như gen chuỗi nhẹ Fab) bằng cách liên kết một cách có thể hoạt động được ADN mã hóa VL với một phân tử ADN khác mã hóa vùng hằng định của chuỗi nhẹ, CL. Trình tự của các gen vùng hằng định của chuỗi nhẹ của người đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem, *ví dụ*, Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of

Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng phương pháp khuếch đại PCR chuẩn. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là vùng hằng định kappa hoặc lambda.

Khía cạnh khác được mô tả ở đây đề cập đến các tế bào (ví dụ, các tế bào chủ) biểu hiện (ví dụ, bằng cách tái tổ hợp) các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây và các polynucleotit có liên quan và các vector biểu hiện. Sáng chế cũng đề xuất các vector chứa các polynucleotit chứa các trình tự nucleotit mã hóa các kháng thể kháng TREM-1 hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, các vector có thể được sử dụng để biểu hiện bằng cách tái tổ hợp các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây trong các tế bào chủ, ví dụ, trong các tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, các vector có thể được sử dụng cho liệu pháp gen.

Các vector thích hợp theo sáng chế bao gồm các vector biểu hiện, các vector virus, và các vector plasmit. Theo một số phương án, vector là vector virus.

Như được sử dụng ở đây, vector biểu hiện để chỉ cấu trúc axit nucleic bất kỳ mà chứa các yếu tố cần thiết để phiên mã và dịch mã trình tự mã hóa được chèn vào, hoặc trong trường hợp vector virus ARN, các yếu tố cần thiết để sao chép và dịch mã, khi được đưa vào tế bào chủ thích hợp. Các vector biểu hiện có thể bao gồm các plasmit, phagemit, các virus, và các dẫn xuất của chúng.

Các vector biểu hiện theo sáng chế có thể chứa các polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây. Theo một số phương án, trình tự mã hóa đối với kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó được liên kết một cách có thể hoạt động được với trình tự kiểm soát việc biểu hiện. Như được sử dụng ở đây, hai trình tự axit nucleic được liên kết một cách có thể hoạt động được khi chúng được liên kết cộng hóa trị theo cách cho phép mỗi trình tự axit nucleic thành phần giữ lại chức năng của nó. Trình tự mã hóa và trình tự kiểm soát việc biểu hiện gen được nêu là được liên kết một cách có thể hoạt động khi chúng được liên kết cộng hóa trị theo cách khiến cho sự biểu hiện hoặc sự phiên mã và/hoặc sự dịch mã trình tự mã hóa được đặt dưới sự ảnh hưởng hoặc kiểm soát của trình tự kiểm soát việc biểu hiện gen. Hai trình tự ADN được nêu là được liên kết một cách có thể hoạt động được nếu sự cảm ứng của vùng khởi đầu trong trình tự biểu hiện gen 5' dẫn đến

sự phiên mã của trình tự mã hóa và nếu bản chất của liên kết giữa hai trình tự ADN không (1) dẫn đến sự đưa vào sự đột biến dịch khung, (2) can thiệp vào khả năng của vùng khởi đầu trong việc hướng đến sự phiên mã của trình tự mã hóa, hoặc (3) can thiệp vào khả năng của sản phẩm phiên mã ARN tương ứng trong việc được dịch mã thành protein. Do đó, trình tự biểu hiện gen có thể liên kết một cách có thể hoạt động được với trình tự axit nucleic mã hóa nếu trình tự biểu hiện gen có khả năng tác động sự phiên mã của trình tự axit nucleic mã hóa đó sao cho sản phẩm phiên mã thu được được dịch mã thành kháng thể mong muốn hoặc phân liên kết kháng nguyên của nó.

Các vector virus bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic từ các virus dưới đây: các retrovirus, như virus bệnh bạch cầu chuột Moloney (Moloney murine leukemia virus), virus bệnh sarcoma chuột Harvey (Harvey murine sarcoma virus), virus khối u vú chuột, và virus sarcoma Rous; lentivirus; adenovirus; virus kết hợp adeno; các virus typ SV40; các polyomavirus; các virus Epstein-Barr; các virus u nhú; virus herpes; virus đậu mùa; virus bại liệt; và virus ARN như retrovirus. Người ta có thể dễ dàng sử dụng các vector khác đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các vector virus nhất định là dựa trên các virus nhân chuẩn không gây bệnh tế bào trong đó các gen không thiết yếu đã được thay thế bằng gen quan tâm. Các virus không gây bệnh tế bào bao gồm các retrovirus, chu kỳ sống của chúng có liên quan đến sự phiên mã ngược ARN bộ gen virus thành ADN với sự hòa nhập provirus tiếp theo thành ADN tế bào chủ. Các retrovirus đã được chấp thuận dùng cho các thử nghiệm liệu pháp gen người. Hữu dụng nhất là các retrovirus mà suy giảm khả năng sao chép (tức là, có khả năng tổng hợp định hướng các protein mong muốn, nhưng không có khả năng sản xuất hạt gây nhiễm). Các vector biểu hiện retrovirus thay đổi về mặt di truyền như vậy có tính hữu dụng chung đối với sự tải nạp các gen in vivo với hiệu quả cao. Các phương thức chuẩn để sản xuất các retrovirus suy giảm khả năng sao chép (bao gồm các bước hợp nhất vật liệu di truyền ngoại sinh vào plasmit, chuyển nhiễm plasmit vào dòng tế bào gói, sản xuất các retrovirus tái tổ hợp bằng dòng tế bào gói này, thu gom các hạt virus từ môi trường nuôi cấy mô, và gây nhiễm các hạt virus lên các tế bào đích) được đề cập trong tài liệu của Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) và Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

Theo một số phương án, virus là virus kết hợp adeno, virus ADN sợi kép. Virus kết hợp adeno có thể được xử lý để suy giảm khả năng sao chép và có khả năng gây nhiễm lên phổ rộng các loài và các typ tế bào. Nó còn có ưu điểm như có tính ổn định với nhiệt và trong dung môi lipid; có tần suất tải nạp cao trong tế bào thuộc các dòng đa dạng, bao gồm các tế bào tạo máu; và không có khả năng ức chế siêu nhiễm nhờ đó cho phép nhiều chuỗi tải nạp. Theo báo cáo, virus kết hợp adeno có thể hợp nhất vào ADN tế bào của người theo cách thức đặc hiệu vị trí, nhờ đó tối thiểu hóa khả năng đột biến chèn và tính biến thiên của đặc tính biểu hiện gen được chèn của việc nhiễm retrovirus. Ngoài ra, sự nhiễm virus kết hợp adeno kiểu đại đã được thực hiện trong môi trường nuôi cấy mô trong trên 100 chuỗi cấy chuyển mà không có áp lực chọn lọc, điều này ngụ ý rằng sự hợp nhất bộ gen virus kết hợp adeno là sự kiện tương đối ổn định. Virus kết hợp adeno có thể còn có tác dụng trong mô hình ngoài nhiễm sắc thể.

IV. Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất các thể liên hợp miễn dịch chứa bất kỳ trong số các kháng thể kháng TREM-1 được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên được liên kết với một tác nhân. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa phân tử đặc hiệu kép được bộc lộ ở đây được liên kết với một tác nhân (ví dụ, tác nhân điều trị hoặc tác nhân chẩn đoán).

Nhằm mục đích chẩn đoán, các tác nhân thích hợp là các nhãn có thể phát hiện được mà bao gồm các đồng vị phóng xạ, để chụp toàn bộ cơ thể, và các đồng vị phóng xạ, các enzym, các nhãn huỳnh quang, và các thể kháng thể thích hợp khác để xét nghiệm mẫu. Các nhãn có thể phát hiện được mà có thể được liên kết với kháng thể kháng TREM-1 bất kỳ được mô tả ở đây có thể là kiểu bất kỳ trong số các kiểu khác nhau hiện được sử dụng trong lĩnh vực chẩn đoán *in vitro*, bao gồm các nhãn dạng hạt gồm các sol kim loại như vàng dạng keo, các đồng vị như I^{125} hoặc Tc^{99} được biểu hiện, ví dụ, với chất chelat hóa có tính peptit thuộc typ N_2S_2 , N_3S hoặc N_4 , các nhóm mang màu bao gồm các dấu chuẩn huỳnh quang, các dấu chuẩn phát quang, các dấu chuẩn lân quang và các yếu tố tương tự, cũng như các nhãn enzym mà chuyển hóa cơ chất nhất định thành dấu chuẩn có thể phát hiện được, và các thể polynucleotit mà

được phát hiện theo sau khi khuếch đại như bằng phản ứng chuỗi polymeraza. Các nhãn enzym thích hợp bao gồm peroxidaza cây cải ngựa, phosphataza kiềm và các enzym tương tự. Ví dụ, nhãn có thể là enzym phosphataza kiềm, được phát hiện bằng cách đo sự có mặt hoặc sự hình thành sự phát quang hóa học sau khi chuyển hóa cơ chất 1,2 dioxetan như adamantyl metoxy phosphoryloxy phenyl dioxetan (AMPPD), dinatri 3-(4-(metoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-clo)trixyclo{3,3,1,1 3,7}decan}-4-yl) phenyl phosphat (CSPD), cũng như CDP và CDP-STAR[®] hoặc các cơ chất phát quang khác đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ các chelat của các lanthanit thích hợp như Terbium(III) và Europium(III). Các phương pháp phát hiện được xác định theo nhãn đã chọn. Sự xuất hiện của nhãn hoặc các sản phẩm phản ứng của nó có thể quan sát bằng cách sử dụng mắt thường trong trường hợp trong đó nhãn là dạng hạt và tích tụ ở mức độ thích hợp, hoặc bằng cách sử dụng các thiết bị như quang phổ kế, quang kế, huỳnh quang kế, và các thiết bị tương tự, tất cả đều theo quy định thực hành chuẩn.

Theo một số phương án, các phương pháp liên hợp dẫn đến các liên kết mà về cơ bản là (hoặc gần như) không sinh miễn dịch, ví dụ, liên kết peptit (tức là, liên kết amit), liên kết sulfua, (bị trở ngại không gian), liên kết disulfua, liên kết hydrazon, và các liên kết khác. Các liên kết này gần như không sinh miễn dịch và thể hiện độ ổn định hợp lý trong huyết tương (xem, ví dụ, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; các công bố đơn quốc tế số WO 2009/059278; WO 95/17886).

Tùy thuộc vào bản chất sinh hóa của gốc và kháng thể, các chiến lược liên hợp khác có thể được sử dụng. Trong trường hợp gốc có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp nằm trong khoảng từ 50 đến 500 axit amin, có các quy trình chuẩn trong sách mô tả hóa học tổng hợp các thể liên hợp protein, mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thực hiện theo (xem, ví dụ, Hackenberger, C. P. R., và Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). Theo một số phương án, phản ứng của gốc maleinimido với gốc xystein trong kháng thể hoặc gốc được sử dụng. Phương pháp này là phương pháp hóa học kết hợp được làm thích hợp một cách đặc biệt trong trường hợp, ví dụ, mảnh Fab hoặc Fab' của kháng thể được sử dụng. Cách khác, theo một số phương án, việc kết hợp vào đầu tận cùng C của kháng thể hoặc gốc được thực hiện. Việc cải biến đầu tận cùng C của protein, ví dụ,

của mảnh Fab, có thể được thực hiện như được mô tả (Sunbul, M. và Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

Nói chung, phản ứng đặc hiệu về vị trí và sự kết hợp cộng hóa trị được dựa trên sự biến nạp axit amin tự nhiên thành axit amin có khả năng phản ứng mà trực giao với khả năng phản ứng của các nhóm chức khác có mặt. Ví dụ, xystein đặc hiệu trong trường hợp trình tự hiếm có thể được chuyển hóa bằng enzym thành aldehyt (xem, Frese, M. A., và Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427). Cũng có thể thu được sự cải biến axit amin mong muốn bằng cách sử dụng khả năng phản ứng enzym đặc hiệu của các enzym nhất định với axit amin tự nhiên trong trường hợp trình tự nhất định (xem, ví dụ, Taki, M. *et al.*, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al. Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; và Protease-catalyzed formation of C—N bonds is used by Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403). Phản ứng và sự kết hợp cộng hóa trị đặc hiệu vị trí cũng có thể đạt được bằng phản ứng chọn lọc giữa các axit amin tận cùng với các chất phản ứng cải biến thích hợp.

Khả năng phản ứng của xystein đầu tận cùng N với các benzonitril (xem Ren, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) có thể được sử dụng để đạt được sự kết hợp cộng hóa trị đặc hiệu vị trí.

Sự ghép nối hóa học tự nhiên cũng có thể dựa vào các gốc xystein đầu tận cùng C (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).

Patent Mỹ số US6437095 B1 mô tả phương pháp liên hợp mà dựa vào phản ứng nhanh của xystein trong dải axit amin điện tích âm với một xystein nằm trong dải axit amin điện tích âm.

Gốc này cũng có thể là peptit tổng hợp hoặc dạng tương tự peptit. Trong trường hợp polypeptit được tổng hợp hóa học, các axit amin có khả năng phản ứng trực giao có thể được kết hợp trong quy trình tổng hợp như vậy (xem ví dụ, de Graaf, A. J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Vì rất nhiều nhóm chức trực giao gặp phải vấn đề và có thể được đưa vào một peptit tổng hợp, nên sự liên hợp của peptit đó với một tác nhân liên kết là phương pháp hóa học tiêu chuẩn.

Để thu được polypeptit được gắn nhãn đơn, thể liên hợp với mức tỷ lệ lượng hóa học 1:1 có thể được tách bằng phương pháp sắc ký ra khỏi các sản phẩm phụ của quá trình liên hợp. Quy trình này có thể được tạo điều kiện bằng cách sử dụng thành phần cặp liên kết gắn nhãn màu và tác nhân liên kết có điện tích. Bằng cách sử dụng loại thành phần cặp liên kết có điện tích âm cao và được gắn nhãn này, các polypeptit được liên hợp đơn dễ dàng tách được ra khỏi các polypeptit không được gắn nhãn và các polypeptit mà mang nhiều hơn một tác nhân liên kết, vì sự khác nhau về điện tích và khối lượng phân tử có thể được sử dụng để tách. Thuốc nhuộm huỳnh quang có thể là hữu dụng để tinh chế phức chất ra khỏi các thành phần không liên kết, như chất gắn kết hóa trị một được gắn nhãn.

Theo một số phương án, gốc được gắn vào kháng thể kháng TREM-1 được chọn từ nhóm bao gồm gốc liên kết, gốc gắn nhãn, và gốc có hoạt tính sinh học.

Các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây cũng có thể được liên hợp với tác nhân trị liệu để tạo thành thể liên hợp miễn dịch như thể liên hợp kháng thể-thuốc (antibody-drug conjugate - ADC). Các tác nhân trị liệu thích hợp bao gồm, các chất chống chuyển hóa, các chất alkyl hóa, các chất gắn kết rãnh phụ trên ADN, các chất can thiệp vào ADN, các chất liên kết ngang ADN, các chất ức chế histon deacetylaza, các chất ức chế xuất nhân, các chất ức chế proteasom, các chất ức chế topoisomeraza I hoặc II, các chất ức chế protein sốc nhiệt, các chất ức chế tyrosin kinaza, các chất kháng sinh, và các chất chống nguyên phân. Trong ADC, kháng thể và tác nhân trị liệu tốt hơn là được liên hợp thông qua tác nhân liên kết mà có thể phân cắt như tác nhân liên kết peptidyl, disulfua, hoặc hydrazon. Theo một số phương án, tác nhân liên kết là tác nhân liên kết peptidyl như Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 80), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, hoặc Glu. Các ADC có thể được điều chế như được mô tả trong các patent Mỹ số 7,087,600; 6,989,452; và 7,129,261; các công bố đơn quốc tế số WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; và WO 08/103693; các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20060024317; 20060004081; và 20060247295.

Các kháng thể kháng TREM-1, ví dụ, các kháng thể được mô tả ở đây, cũng có thể được sử dụng để phát hiện TREM-1, như TREM-1 của người, ví dụ, TREM-1

của người trong mô hoặc các mẫu mô. Các kháng thể có thể được sử dụng, ví dụ, trong thử nghiệm ELISA hoặc trong việc đếm tế bào theo dòng. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 được tiếp xúc với các tế bào, ví dụ, các tế bào trong mô, trong thời gian thích hợp để sự liên kết một cách đặc hiệu diễn ra, và sau đó, chất phản ứng, ví dụ, kháng thể mà phát hiện kháng thể kháng TREM-1, được bổ sung vào. Các thử nghiệm được lấy làm ví dụ được cung cấp trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Kháng thể kháng TREM-1 có thể là kháng thể hoàn toàn của người, hoặc nó có thể là kháng thể khảm, như kháng thể có các vùng biến đổi của người và các vùng hằng định của chuột hoặc một phần của chúng. Các phương pháp được lấy làm ví dụ để phát hiện TREM-1, ví dụ, TREM-1 của người, trong mẫu (mẫu tế bào hoặc mô) bao gồm (i) cho mẫu tiếp xúc với kháng thể kháng TREM-1, trong thời gian đủ để cho phép sự liên kết đặc hiệu của kháng thể kháng TREM-1 với TREM-1 trong mẫu, và (2) cho mẫu tiếp xúc với chất phát hiện, ví dụ, kháng thể, mà liên kết một cách đặc hiệu với kháng thể kháng TREM-1, như với vùng Fc của kháng thể kháng TREM-1, để nhờ đó phát hiện TREM-1 được liên kết bởi kháng thể kháng TREM-1. Các bước rửa có thể được thực hiện sau khi ủ với kháng thể và/hoặc chất phát hiện. Các kháng thể kháng TREM-1 để sử dụng trong các phương pháp này không cần phải được liên kết với nhãn hoặc chất phát hiện, vì chất phát hiện riêng biệt có thể được sử dụng.

Các ứng dụng khác đối với các kháng thể kháng TREM-1, ví dụ, làm liệu pháp điều trị đơn hoặc liệu pháp điều trị kết hợp, được đề xuất ở đây, ví dụ, trong phần liên quan đến việc điều trị kết hợp.

V. Phân tử đặc hiệu kép

Các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể được sử dụng để tạo thành các phân tử đặc hiệu kép. Kháng thể kháng TREM-1, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể được tạo dẫn xuất hoặc liên kết với phân tử có chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác (ví dụ, kháng thể khác hoặc phối tử đối với thụ thể) để tạo ra phân tử đặc hiệu kép mà liên kết với ít nhất là hai vị trí liên kết khác nhau hoặc hai phân tử đích khác nhau. Ví dụ, kháng thể kháng TREM-1 có thể được liên kết với kháng thể hoặc scFv mà liên kết một cách đặc hiệu với protein bất kỳ mà có thể được sử dụng như là các đích tiềm năng cho việc điều trị kết hợp, như các

protein được mô tả ở đây (ví dụ, các kháng thể đối với IP-10 hoặc TNF- α). Kháng thể được mô tả ở đây trên thực tế có thể được tạo dẫn xuất hoặc được liên kết với nhiều hơn một phân tử chức năng khác để tạo ra các phân tử đa đặc hiệu mà liên kết với nhiều hơn hai vị trí liên kết và/hoặc phân tử đích khác nhau; các phân tử đa đặc hiệu như vậy cũng được dự tính được bao hàm trong thuật ngữ "phân tử đặc hiệu kép" như được sử dụng ở đây. Để tạo ra phân tử đặc hiệu kép được mô tả ở đây, kháng thể được mô tả ở đây có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách kết hợp hóa học, dung hợp di truyền, kết hợp không cộng hóa trị hoặc cách khác) với một hoặc nhiều phân tử liên kết khác, như kháng thể khác, mảnh kháng thể, peptit hoặc dạng tương tự liên kết, sao cho thu được phân tử đặc hiệu kép.

Do đó, sáng chế đề xuất các phân tử đặc hiệu kép chứa ít nhất là một tính đặc hiệu liên kết thứ nhất đối với TREM-1 và tính đặc hiệu liên kết thứ hai đối với epitop đích thứ hai. Theo một số phương án được mô tả ở đây, trong đó phân tử đặc hiệu kép là đa đặc hiệu, phân tử này có thể còn chứa tính đặc hiệu liên kết thứ ba.

Theo một số phương án, các phân tử đặc hiệu kép được mô tả ở đây chứa, để có tính đặc hiệu liên kết, ít nhất là một kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, bao gồm, *ví dụ*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, hoặc Fv chuỗi đơn (scFv). Kháng thể này cũng có thể là một dime chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, hoặc mảnh tối thiểu bất kỳ của chúng như Fv hoặc cấu trúc chuỗi đơn như được mô tả trong Ladner *et al.* patent Mỹ số 4,946,778.

Mặc dù các kháng thể đơn dòng của người là được ưu tiên, nhưng các kháng thể khác vẫn có thể được sử dụng trong các phân tử đặc hiệu kép được mô tả ở đây, bao gồm các kháng thể đơn dòng của chuột, các kháng thể khảm và các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người.

Các phân tử đặc hiệu kép được mô tả ở đây có thể được điều chế bằng cách liên hợp các thành phần có tính đặc hiệu liên kết bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, mỗi tính đặc hiệu gắn kết của phân tử đặc hiệu kép có thể được tạo ra riêng rẽ và sau đó được kết hợp lại với nhau. Khi các thành phần có các tính đặc hiệu liên kết là protein hoặc peptit, các tác nhân kết hợp hoặc liên kết chéo khác nhau có thể được sử dụng để liên hợp theo cách cộng hóa trị. Ví dụ về các tác nhân liên kết chéo bao gồm protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-axetyl-

thioaxetat (SATA), 5,5'-dithiobis(axit 2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylendimaleimit (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (xem, ví dụ, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả trong Paulus, (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83), và Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Một số tác nhân liên hợp là SATA và sulfo-SMCC, cả hai đều của Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Khi các thành phần có tính đặc hiệu liên kết là các kháng thể, chúng có thể được liên hợp thông qua liên kết sulfhydryl của các vùng bản lề đầu tận cùng C của hai chuỗi nặng. Theo một số phương án, vùng bản lề được cải biến để chứa một số lẻ gốc sulfhydryl, tốt hơn là một gốc, trước khi liên hợp.

Theo cách khác, cả hai thành phần có tính đặc hiệu liên kết có thể được mã hóa trong cùng vector và được biểu hiện và lắp vào cùng một tế bào chủ. Phương pháp này là đặc biệt hữu hiệu khi phân tử đặc hiệu kép là mAb x mAb, mAb x Fab, mAb x (scFv)₂, Fab x F(ab')₂ hoặc phối tử x protein dung hợp Fab. Kháng thể đặc hiệu kép có thể chứa kháng thể chứa scFv ở đầu tận cùng C của mỗi chuỗi nặng. Phân tử đặc hiệu kép được mô tả ở đây có thể là phân tử chuỗi đơn chứa một kháng thể chuỗi đơn và yếu tố quyết định liên kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa hai yếu tố quyết định liên kết. Các phân tử đặc hiệu kép có thể chứa ít nhất là hai phân tử chuỗi đơn. Các phương pháp để điều chế các phân tử đặc hiệu kép được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 5,260,203; patent Mỹ số 5,455,030; patent Mỹ số 4,881,175; patent Mỹ số 5,132,405; patent Mỹ số 5,091,513; patent Mỹ số 5,476,786; patent Mỹ số 5,013,653; patent Mỹ số 5,258,498; và patent Mỹ số 5,482,858.

Việc liên kết của các phân tử đặc hiệu kép với các đích đặc hiệu của chúng có thể được xác nhận bằng cách sử dụng các phương pháp nhận biết trong lĩnh vực này, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, ức chế sinh trưởng), hoặc thử nghiệm thẩm tách Western. Mỗi thử nghiệm trong số các thử nghiệm này thường phát hiện ra sự có mặt của phức hợp protein-kháng thể cụ thể được quan tâm

bằng cách sử dụng chất phản ứng được gắn nhãn (chẳng hạn, kháng thể) đặc hiệu đối với phức hợp quan tâm.

VI. Kit

Sáng chế đề xuất các kit chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của nó, các phân tử đặc hiệu kép, hoặc các thể liên hợp miễn dịch của nó. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất gói được phẩm hoặc kit gồm một hoặc nhiều đồ chứa được nạp một hoặc nhiều thành phần của các được phẩm được mô tả ở đây, như một hoặc nhiều các kháng thể được đề xuất ở đây hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, tùy ý cùng với hướng dẫn sử dụng. Theo một số phương án, kit này chứa được phẩm được mô tả ở đây và tác nhân trị liệu hoặc phòng ngừa, như các tác nhân được mô tả ở đây.

VII. Chế phẩm và chế phẩm phối chế

Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm (ví dụ, các được phẩm) và các chế phẩm phối chế chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng TREM-1 (bao gồm các polynucleotit, các vectơ, và các tế bào mà mã hóa và/hoặc biểu hiện các kháng thể kháng TREM-1) được bộc lộ ở đây. Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa một hoặc nhiều các kháng thể kháng TREM-1 như được bộc lộ ở đây, được phối chế cùng với chất mang được dụng.

Như được sử dụng ở đây, “chất mang được dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất kháng khuẩn và kháng nấm, các chất đẳng trương và làm chậm sự hấp thu, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Theo một số phương án, chất mang là thích hợp để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, dùng trong cột sống hoặc biểu bì (chẳng hạn, bằng cách tiêm hoặc truyền). Tùy thuộc vào đường dùng, hoạt chất, tức là, kháng thể, thể liên hợp miễn dịch, hoặc phân tử đặc hiệu kép, có thể được bao trong vật liệu để bảo vệ hợp chất khỏi tác dụng của các axit và các điều kiện tự nhiên khác mà có thể làm mất hoạt tính của hợp chất.

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất được phẩm phối chế, mà cải thiện độ ổn định của các kháng thể kháng TREM-1 và do đó, cho phép bảo quản chúng

trong thời gian dài. Theo một số phương án, được phẩm phối chế được bộc lộ ở đây chứa: (a) kháng thể kháng TREM-1; (b) chất đệm; (c) chất làm ổn định; (d) muối; (e) chất tạo khối; và/hoặc (f) chất hoạt động bề mặt. Theo một số phương án, được phẩm phối chế là ổn định trong ít nhất là 1 tháng, ít nhất là 2 tháng, ít nhất là 3 tháng, ít nhất là 6 tháng, ít nhất là 1 năm, ít nhất là 2 năm, ít nhất là 3 năm, ít nhất là 5 năm hoặc lâu hơn. Theo một số phương án, chế phẩm phối chế là ổn định khi bảo quản ở 4°C, 25°C, hoặc 40°C.

Chất đệm

Các chất đệm hữu dụng theo sáng chế có thể là axit hoặc bazơ yếu được sử dụng để duy trì tính axit (độ pH) của dung dịch gần với giá trị được chọn sau khi bổ sung axit hoặc bazơ khác. Các chất đệm thích hợp có thể làm tối đa hóa độ ổn định của các được phẩm phối chế bằng cách duy trì kiểm soát độ pH của chế phẩm phối chế. Các chất đệm thích hợp cũng có thể đảm bảo tính tương thích sinh lý hoặc tối đa hóa độ hòa tan. Tính chất lưu biến, độ nhớt, và các tính chất khác cũng có thể phụ thuộc vào độ pH của chế phẩm phối chế. Các chất đệm thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, histidin, xitrat, succinat, axetat và phosphat. Theo một số phương án, chất đệm bao gồm histidin (ví dụ, L-histidin) với chất đẳng trương và với sự điều chỉnh pH tiềm năng bằng axit hoặc bazơ đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định, chất đệm là L- histidin. Theo các phương án nhất định, độ pH của chế phẩm phối chế được duy trì nằm trong khoảng từ 2 đến 10, hoặc nằm trong khoảng từ 4 đến 8.

Chất làm ổn định

Chất làm ổn định được bổ sung vào sản phẩm được phẩm để làm ổn định sản phẩm đó. Các chất như vậy có thể làm ổn định các protein theo một số cách khác nhau. Các chất làm ổn định thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin như glyxin, alanin, lysin, arginin, hoặc threonin, các hydrat cacbon như glucoza, sucroza, trehaloza, raffmoza, hoặc maltoza, các polyol như glyxerol, manitol, sorbitol, các xyclodextrin hoặc các destran thuộc loại và khối lượng phân tử bất kỳ, hoặc PEG. Theo một khía cạnh của sáng chế, chất làm ổn định được chọn để tối đa hóa độ ổn định của FIX polypeptit trong các sản phẩm điều chế đông khô. Theo các phương án nhất định, chất làm ổn định là sucroza và/hoặc arginin.

Chất tạo khối

Các chất tạo khối có thể được bổ sung vào sản phẩm dược phẩm để bổ sung thể tích và khối lượng cho sản phẩm, nhờ đó tạo điều kiện cho việc đo và xử lý sản phẩm một cách chính xác. Các chất tạo khối thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lactoza, sucroza, glucoza, manitol, sorbitol, canxi cacbonat, hoặc magie stearat.

Chất hoạt động bề mặt

Các chất hoạt động bề mặt là các chất lưỡng tính với các nhóm ưa dung môi và kỵ dung môi. Chất hoạt động bề mặt có thể có tính anion, cation, lưỡng tính, hoặc không ion. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt không ion bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkyl etoxylat, nonylphenol etoxylat, amin etoxylat, polyetylen oxit, polypropylen oxit, các rượu béo như rượu xetyl hoặc rượu oleyl, cocamit MEA, cocamit DEA, polysorbat, hoặc dodexyl dimetylamin oxit. Theo một số phương án, chất hoạt động bề mặt là polysorbat 20 hoặc polysorbat 80.

Theo một số phương án, dược phẩm phối chế theo sáng chế chứa:

- (a) kháng thể kháng TREM-1 với lượng khoảng 0,25 mg/mL đến 250 mg/mL (ví dụ, 10 đến 200 mg/mL);
- (b) histidin với nồng độ khoảng 20 mM;
- (c) sucroza với nồng độ khoảng 150 mM;
- (d) arginin với nồng độ khoảng 25 mM; và
- (e) NaCl với nồng độ khoảng 50 mM.

Chế phẩm phối chế có thể còn chứa một hoặc nhiều hệ đệm, chất bảo quản, chất tạo trương lực, chất chelat hóa, chất làm ổn định và/hoặc chất hoạt động bề mặt, cũng như các kết hợp khác nhau của chúng. Việc sử dụng chất bảo quản, chất đẳng trương, chất chelat hóa, chất làm ổn định và chất hoạt động bề mặt trong các dược phẩm là đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Có thể tham khảo tài liệu Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Theo một số phương án, dược phẩm phối chế là chế phẩm phối chế chứa nước. Chế phẩm như vậy điển hình là dung dịch hoặc nhũ dịch, nhưng cũng có thể bao gồm các dạng keo, dạng phân tán, dạng nhũ tương, và các vật liệu nhiều pha. Thuật ngữ

"dược phẩm phối chế chứa nước" được định nghĩa là dược phẩm phối chế chứa nước với lượng ít nhất là 50% khối lượng/khối lượng. Tương tự, thuật ngữ "dung dịch nước" được định nghĩa là dung dịch chứa nước với lượng ít nhất là 50% khối lượng/khối lượng, và thuật ngữ "huyền phù chứa nước" được định nghĩa là huyền phù chứa nước với lượng ít nhất là 50% khối lượng/khối lượng.

Theo một số phương án, dược phẩm phối chế là chế phẩm đông khô, mà bác sĩ hoặc bệnh nhân có thể bổ sung dung môi và/hoặc chất pha loãng vào đó trước khi sử dụng.

Các dược phẩm được mô tả ở đây cũng có thể được dùng trong liệu pháp kết hợp, tức là, được kết hợp với các tác nhân khác. Ví dụ, liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây kết hợp với ít nhất là một tác nhân trị liệu khác. Ví dụ về các tác nhân trị liệu mà có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp có thể bao gồm các hợp chất, các thuốc, và/hoặc các tác nhân khác được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn (ví dụ, rối loạn viêm). Các hợp chất, các thuốc, và/hoặc các tác nhân như vậy có thể bao gồm, ví dụ, các thuốc chống viêm hoặc các kháng thể mà phong bế hoặc làm giảm sự sản sinh các xytokin viêm. Theo một số phương án, các tác nhân trị liệu có thể bao gồm kháng thể kháng IP-10, kháng thể kháng TNF- α (ví dụ, adalimumab (HUMIRA[®]), golimumab (SIMPONI[®]), infliximab (REMICADE[®]), certolizumab pegol (CIMZIA[®])), interferon beta-1a (ví dụ, AVONEX[®], REBIF[®]), interferon beta-1b (ví dụ, BETASERON[®], EXTAVIA[®]), glatiramer axetat (ví dụ, COPAXONE[®], GLATOPA[®]), mitoxantron (ví dụ, NOVANTRONE[®]), các thuốc kháng viêm không steroid (NSAIDs), các chất giảm đau, các corticosteroid, và các kết hợp của chúng.

Các dược chất được mô tả ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều muối dược dụng. "Muối dược dụng" để chỉ muối mà vẫn giữ hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không gây ra ảnh hưởng độc hại không mong muốn (xem ví dụ, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Các ví dụ về các muối như vậy bao gồm các muối cộng axit và các muối cộng bazơ. Các muối cộng axit bao gồm các muối thu được từ các axit vô cơ không độc, như axit clohydric, axit nitric, axit phosphoric, axit sulfuric, axit bromhydric, axit iodhydric, axit phosphor và các axit tương tự, cũng như từ các axit hữu cơ không độc như các axit mono- và dicarboxylic

béo, các axit alkanoic được thế phenyl, các axit hydroxy alkanoic, các axit thơm, các axit sulfonic béo và thơm và các axit tương tự. Các muối cộng bazơ bao gồm các muối thu được từ các kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và các kim loại tương tự, cũng như từ các amin hữu cơ không độc, như N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, cloprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, procain và các bazơ tương tự.

Dược phẩm được mô tả ở đây cũng có thể chứa chất chống oxy hóa được dùng. Ví dụ về các chất chống oxy hóa được dùng bao gồm: (1) các chất chống oxy hóa hòa tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfit, natri sulfit và các chất tương tự; (2) các chất chống oxy hóa hòa tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxylanisol butyl hóa (BHA), hydroxytoluen butyl hóa (BHT), lexithin, propyl galat, alpha-tocopherol, và các chất tương tự; và (3) các chất tạo chelat với kim loại, như axit xitric, axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA), sorbitol, axit tartric, axit phosphoric, và các chất tương tự.

Ví dụ về các chất mang dạng nước và không phải dạng nước thích hợp mà có thể được sử dụng trong các dược phẩm được mô tả ở đây bao gồm nước, etanol, polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và các chất tương tự), và các hỗn hợp thích hợp của chúng, các dầu thực vật, như dầu oliu, và este hữu cơ có thể tiêm được, như etyl oleat. Độ chảy lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng vật liệu bao như lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt cần thiết trong trường hợp thể phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Các chế phẩm này cũng có thể chứa chất phụ trợ như chất bảo quản, chất làm ẩm, chất nhũ hóa và chất làm phân tán. Việc ngăn ngừa sự có mặt của các vi sinh vật có thể được đảm bảo bằng cả quy trình khử trùng nêu trên, và bằng cách bổ sung các chất chống vi khuẩn và chống nấm, ví dụ, paraben, clorobutanol, axit phenol sorbic và các chất tương tự. Cũng có thể mong muốn bổ sung vào các chế phẩm các chất đẳng trương như đường, natri clorua và các chất tương tự. Ngoài ra, khả năng hấp thụ kéo dài của các dạng dược phẩm tiêm có thể có được bằng cách đưa vào các chất làm chậm sự hấp thụ như nhôm monostearat và gelatin.

Các chất mang được dùng bao gồm các dung dịch nước hoặc dịch phân tán vô trùng và bột vô trùng dùng cho chế phẩm chuẩn bị trước của dung dịch hoặc dịch

phân tán vô trùng để tiêm. Việc sử dụng môi trường và các chất như vậy đối với các chất có hoạt tính dược lý là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Trừ trường hợp môi trường hoặc chất thông dụng bất kỳ không tương thích với các hoạt chất, việc sử dụng môi trường hoặc chất thông dụng trong các dược phẩm là được dự định. Dược phẩm có thể chứa chất bảo quản hoặc có thể không có chất bảo quản. Các hoạt chất bổ sung có thể được kết hợp vào các chế phẩm này.

Chế phẩm điều trị thường phải vô khuẩn và ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản. Chế phẩm có thể được bào chế ở dạng dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc các cấu trúc trật tự khác thích hợp đối với nồng độ thuốc cao. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, rượu đa chức (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và các chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất bao như lecithin, bằng cách duy trì kích cỡ hạt cần thiết trong trường hợp thể phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, chế phẩm có thể bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua. Khả năng hấp thu kéo dài của chế phẩm tiêm có thể có được bằng cách đưa vào chế phẩm này chất làm chậm sự hấp thu, ví dụ, muối monostearat và gelatin.

Các dung dịch để tiêm vô trùng có thể được bào chế bằng cách kết hợp hoạt chất với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một hoặc kết hợp các thành phần được liệt kê trên đây, nếu cần, tiếp theo là vi lọc tiệt trùng. Thông thường, thể phân tán được bào chế bằng cách kết hợp hoạt chất với chất dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác trong số các thành phần được liệt kê ở đây. Trong trường hợp bột vô trùng để bào chế dung dịch vô trùng để tiêm, một số phương pháp bào chế là sấy chân không và sấy thăng hoa (đông khô) mà thu được bột của thành phần hoạt tính cùng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch đã được lọc vô trùng trước đó của nó.

Lượng thành phần hoạt tính mà có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dạng liều lượng đơn sẽ thay đổi tùy thuộc vào đối tượng được điều trị, và đường dùng cụ thể. Lượng thành phần hoạt tính mà có thể được kết hợp với chất mang để tạo ra dạng liều lượng đơn thường sẽ là lượng mà khiến cho lượng chế phẩm mà nó tạo ra

có tác dụng điều trị. Thông thường, trong một trăm phần trăm, lượng thành phần hoạt tính này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 phần trăm đến khoảng chín mươi chín phần trăm, từ khoảng 0,1 phần trăm đến khoảng 70 phần trăm, hoặc từ khoảng 1 phần trăm đến khoảng 30 phần trăm kết hợp với chất mang được dụng.

Các chế độ liều dùng được điều chỉnh để mang lại đáp ứng mong muốn tối đa (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, liều bolus đơn có thể được sử dụng, một số liều chia nhỏ có thể được sử dụng theo thời gian hoặc liều có thể được giảm hoặc tăng từng phần khi được chỉ định trong tình huống điều trị khẩn cấp. Đặc biệt có lợi khi bào chế các chế phẩm gốc thành dạng đơn vị liều để dễ sử dụng và đồng nhất về liều lượng. Dạng đơn vị liều như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các đơn vị riêng biệt theo cách tự nhiên thích hợp ở dạng liều lượng đơn vị cho đối tượng cần được điều trị; mỗi một đơn vị chứa một lượng xác định trước hoạt chất được tính toán để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dụng cần thiết. Mô tả về các dạng đơn vị liều lượng nêu ở đây được tuyên bố bởi và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc tính duy nhất của hoạt chất và tác dụng điều trị cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có đã biết của việc kết hợp hoạt chất để điều trị cho các cá nhân miễn cảm.

Để dùng kháng thể kháng TREM-1, *ví dụ*, được mô tả ở đây, khoảng liều lượng là từ 0,0001 đến 100 mg/kg, và thông thường hơn là từ 0,01 đến 5 hoặc 10 mg/kg thể trọng đối tượng. Ví dụ, các liều lượng có thể là 0,3 mg/kg thể trọng, 1 mg/kg thể trọng, 3 mg/kg thể trọng, 5 mg/kg thể trọng hoặc 10 mg/kg thể trọng hoặc trong khoảng từ 1 đến 10 mg/kg. Chế độ điều trị được lấy làm ví dụ bao gồm việc dùng thuốc một tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, bốn tuần một lần, mỗi tháng một lần, 3 tháng một lần hoặc ba đến 6 tháng một lần. Chế độ điều trị được lấy làm ví dụ đối với kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây bao gồm 1 mg/kg thể trọng hoặc 3 mg/kg thể trọng thông qua việc dùng trong tĩnh mạch, với kháng thể được dùng bằng cách sử dụng một trong các liệu trình dùng liều như sau: (i) bốn tuần một lần cho sáu liều, sau đó ba tháng một lần; (ii) ba tuần một lần; (iii) 3 mg/kg thể trọng một lần sau đó là 1 mg/kg thể trọng ba tuần một lần.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM-1 được dùng với liều cố định (chế độ dùng liều cố định). Theo các phương án khác, kháng thể kháng TREM-1 được

dùng với liều cố định với kháng thể khác. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TREM-1 được dùng với liều dựa trên thể trọng.

Theo một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng với độ đặc hiệu liên kết khác nhau được dùng đồng thời, trong trường hợp đó, liều lượng của mỗi kháng thể được dùng nằm trong khoảng được chỉ định. Kháng thể thường được dùng vào nhiều dịp. Các khoảng thời gian giữa các liều lượng đơn có thể là, ví dụ, hàng tuần, hàng tháng, mỗi ba tháng hoặc hàng năm. Các khoảng thời gian cũng có thể là không đều như được xác định bằng cách đo trong máu của bệnh nhân các mức kháng thể đối với kháng nguyên đích. Theo một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết tương từ khoảng 1 đến 1000 $\mu\text{g/ml}$ và theo một số phương pháp khoảng từ 25 đến 300 $\mu\text{g/ml}$.

Kháng thể có thể được dùng dưới dạng chế phẩm phối chế giải phóng kéo dài, trong trường hợp cần sử dụng ít thường xuyên hơn. Liều lượng dùng và tần suất thay đổi tùy thuộc vào thời gian bán thải của kháng thể ở bệnh nhân. Nói chung, các kháng thể của người thể hiện thời gian bán thải dài nhất, sau đó là các kháng thể được làm giống như của người, các kháng thể khảm, và các kháng thể không phải của người. Liều dùng và tần suất sử dụng có thể thay đổi tùy thuộc vào việc điều trị là nhằm để phòng bệnh hay chữa bệnh. Trong các ứng dụng nhằm phòng bệnh, liều dùng tương đối thấp được dùng ở khoảng cách thời gian tương đối không thường xuyên trong khoảng thời gian dài. Một số bệnh nhân tiếp tục được điều trị trong suốt cuộc đời còn lại của họ. Trong các ứng dụng nhằm mục đích chữa bệnh, liều dùng tương đối cao ở các khoảng cách thời gian tương đối ngắn đôi khi được cần đến cho đến khi sự tiến triển của bệnh được giảm hoặc chấm dứt, và cho đến khi bệnh nhân có sự thuyên giảm một phần hoặc hoàn toàn các triệu chứng của bệnh. Sau đó, bệnh nhân có thể được dùng phác đồ phòng ngừa.

Các mức liều lượng thực tế của các thành phần hoạt tính trong các dược phẩm được nêu ở đây có thể thay đổi sao cho đạt được lượng hoạt chất mà hữu hiệu để đạt được đáp ứng trị liệu mong muốn đối với bệnh nhân, chế phẩm, và phương thức dùng cụ thể mà không gây độc cho bệnh nhân. Mức liều lượng được lựa chọn sẽ tùy thuộc vào các yếu tố dược động học khác nhau bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể được nêu ở đây được sử dụng, hoặc este, muối hoặc amit của nó, đường dùng, thời gian

dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể được sử dụng, khoảng thời gian điều trị, các thuốc khác, các hợp chất và/hoặc nguyên liệu được sử dụng kết hợp với chế phẩm cụ thể được sử dụng, tuổi, giới tính, thể trọng, tình trạng bệnh, sức khỏe tổng thể và tiền sử bệnh của bệnh nhân được điều trị, và các yếu tố tương tự đã được biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Chế phẩm được mô tả ở đây có thể được dùng thông qua một hoặc nhiều đường dùng sử dụng một hoặc nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng, đường dùng và/hoặc phương thức dùng sẽ thay đổi tùy thuộc vào kết quả mong muốn. Các đường dùng đối với các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể bao gồm đường dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, trong chân bì, trong màng bụng, dưới da, trong cột sống hoặc các đường dùng ngoài đường tiêu hóa khác, chẳng hạn bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ "dùng ngoài đường tiêu hóa" như được sử dụng ở đây có nghĩa các phương thức dùng khác ngoài dùng qua đường ruột và dùng tại chỗ, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong vỏ, trong nang, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, trong khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, ngoài màng cứng và trong xương ức.

Cách khác, kháng thể được mô tả ở đây có thể có khả năng được dùng qua đường không phải ngoài đường tiêu hóa, như đường dùng tại chỗ, qua biểu bì hoặc niêm mạc, ví dụ, trong mũi, qua đường miệng, qua âm đạo, qua trực tràng, dưới lưỡi, hoặc tại chỗ.

Các hoạt chất có thể được bào chế với chất mang mà bảo vệ hợp chất khỏi việc giải phóng nhanh, như chế phẩm phối chế giải phóng có kiểm soát, bao gồm mảnh cấy, miếng dán qua da, và hệ phân phối vi nang. Các polyme dễ phân hủy sinh học, tương thích sinh học có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp bào chế các chế phẩm như vậy đã được cấp bằng hoặc thường đã được chuyên gia trong lĩnh vực biết rõ. Xem, *ví dụ*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Các chế phẩm điều trị có thể được dùng với các thiết bị y tế đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, theo phương án cụ thể, chế phẩm điều trị được mô tả ở đây có thể được dùng với dụng cụ tiêm dưới da không cần kim, như các dụng cụ được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; hoặc 4,596,556. Các ví dụ về các mảnh cây và các môđun đã được biết rõ để sử dụng với các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây bao gồm: Patent Mỹ số 4,487,603, mà bộc lộ bơm vi truyền có thể cấy được để phân phối thuốc ở tốc độ được kiểm soát; patent Mỹ số 4,486,194, mà bộc lộ dụng cụ trị liệu để cấp thuốc qua da; patent Mỹ số 4,447,233, mà bộc lộ bơm truyền thuốc để phân phối thuốc ở tốc độ truyền chính xác; patent Mỹ số 4,447,224, mà bộc lộ thiết bị truyền dòng biến đổi có thể cấy được để phân phối thuốc liên tục; patent Mỹ số 4,439,196, mà bộc lộ hệ phân phối thuốc thẩm thấu có các ngăn nhiều khoang; và patent Mỹ số 4,475,196, mà bộc lộ hệ phân phối thuốc thẩm thấu. Các patent này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Nhiều mảnh cây, hệ phân phối, và môđun khác đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM-1 được mô tả ở đây có thể được phối chế để đảm bảo phân phối một cách thích hợp *in vivo*. Ví dụ, hàng rào máu não (blood-brain barrier - BBB) loại trừ nhiều hợp chất có tính ưa nước cao. Để đảm bảo rằng các hợp chất trị liệu được mô tả ở đây vượt qua được BBB (nếu muốn, ví dụ, để điều trị bệnh ung thư não), chúng có thể được bào chế, ví dụ, trong các liposom. Các phương pháp sản xuất liposom có thể được xem trong, ví dụ, các patent Mỹ số 4,522,811; 5,374,548; và 5,399,331. Các liposom có thể chứa một hoặc nhiều gốc mà được vận chuyển một cách chọn lọc vào các tế bào hoặc các cơ quan cụ thể, nhờ đó tăng cường khả năng phân phối thuốc đến đích (xem, ví dụ, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Các gốc hướng đích được lấy làm ví dụ bao gồm folat hoặc biotin (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,416,016 của Low *et al.*); mannosit (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); các kháng thể (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); thụ thể protein A hoạt động bề mặt (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); cũng xem K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

VIII. Sử dụng và phương pháp

Các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế và các chế phẩm chứa các kháng thể này (ví dụ, dược phẩm, chế phẩm phối chế, các polynucleotit, các vectơ, và các tế bào) có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm (ví dụ, bằng cách ức chế hoạt tính TREM-1).

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm ở đối tượng cần điều trị, bao gồm việc cho đối tượng dùng liều hữu hiệu trong điều trị của kháng thể kháng TREM-1. Ví dụ về các bệnh viêm mà có thể được điều trị bằng các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), bệnh Crohn (Crohn's disease - CD), bệnh viêm loét đại tràng (ulcerative colitis - UC), hội chứng ruột dễ bị kích thích, bệnh viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis - RA), bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh luput ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus - SLE), bệnh thận luput, bệnh tiểu đường typ I, bệnh Grave, bệnh đa xơ cứng (multiple sclerosis - MS), bệnh viêm cơ tim tự miễn, bệnh Kawasaki, bệnh động mạch vành, bệnh phổi bị tắc nghẽn mạn tính, bệnh phổi kẽ, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh cứng bì, bệnh xơ cứng toàn thân, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm da cơ địa, bệnh bạch biến, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ, hội chứng Sjogrens, bệnh viêm thận tự miễn, hội chứng Goodpasture, bệnh viêm đa dây thần kinh hủy myelin mạn tính, bệnh dị ứng, bệnh hen và các bệnh tự miễn khác mà là kết quả của sự viêm cấp hoặc mạn tính.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 là thích hợp để sử dụng trong điều trị các đối tượng bị bệnh viêm ruột. Bệnh viêm ruột (IBD) là bệnh mà có thể ảnh hưởng đến phần bất kỳ của đường tiêu hóa từ miệng đến hậu môn, gây ra rất nhiều triệu chứng. IBD chủ yếu gây ra đau bụng, tiêu chảy (mà có thể dính máu), nôn mửa hoặc giảm cân, nhưng cũng có thể gây ra các biến chứng ngoài đường tiêu hóa như phát ban ở da, viêm khớp, viêm mắt, mệt mỏi và thiếu tập trung. Các bệnh nhân bị IBD có thể được phân chia thành hai nhóm chính, một nhóm gồm các bệnh nhân bị viêm loét đại tràng (UC) và một nhóm gồm các bệnh nhân bị bệnh Crohn (CD). CD thường bao gồm ruột hồi và ruột kết, nó có thể ảnh hưởng đến vùng bất kỳ của ruột nhưng thường không liên tục (các vùng tập trung của bệnh dần trải khắp ruột).

UC luôn liên quan đến trực tràng (ruột kết) và liên tục hơn. Ở CD, sự viêm là qua thành, dẫn đến các ổ áp xe, các đường rò và các chỗ nghẽn, trong khi đó ở UC, sự viêm điển hình là chỉ hạn chế ở niêm mạc. Hiện không có được phẩm hoặc phương pháp phẫu thuật để chữa bệnh Crohn, trong khi đó một số bệnh nhân bị UC có thể được chữa bằng cách cắt bỏ ruột kết. Các lựa chọn điều trị chỉ giới hạn ở việc kiểm soát các triệu chứng, duy trì sự thuyên giảm và ngăn ngừa sự tái phát. Hiệu lực đối với bệnh viêm ruột trên lâm sàng đối với CD có thể được đo bằng việc giảm điểm số chỉ số hoạt tính bệnh Crohn (Crohn's Disease Activity Index - CDAI), điểm số này là thang cho điểm dựa trên các xét nghiệm tại phòng thí nghiệm và bảng câu hỏi về chất lượng cuộc sống. Trên các mô hình động vật, hiệu lực hầu hết được đo bằng sự tăng cân và cả ở chỉ số hoạt tính bệnh (disease activity index - DAI), mà là kết hợp của độ đặc của phân, trọng lượng và máu trong phân.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 theo sáng chế là thích hợp để sử dụng trong điều trị các đối tượng bị bệnh viêm khớp dạng thấp. Bệnh viêm khớp dạng thấp (RA) là bệnh toàn thân mà ảnh hưởng gần như toàn bộ nếu không phải là toàn bộ cơ thể và là một trong số các dạng thông thường nhất của bệnh viêm khớp. Bệnh này được đặc trưng bằng sự viêm khớp, mà gây nên chứng đau, cứng, nóng, đỏ và sưng. Sự viêm này là hậu quả của các tế bào viêm xâm lấn vào các khớp, và các tế bào viêm này giải phóng các enzym mà có thể tiêu xương và sụn. Kết quả là, sự viêm này có thể dẫn đến sự tổn thương xương và sụn trầm trọng và dẫn đến sự hư hỏng khớp và đau nặng, trong số các tác động sinh lý khác. Khớp liên quan có thể mất hình dạng và sự liên kết, dẫn đến đau và mất cử động. Có một số mô hình trên động vật đối với bệnh viêm khớp dạng thấp đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, mô hình bệnh viêm khớp cảm ứng bởi collagen (collagen-induced arthritis - CIA), chuột nhắt phát triển bệnh viêm khớp dạng viêm mà giống với bệnh viêm khớp dạng thấp ở người. Vì CIA có chung các đặc điểm miễn dịch và bệnh lý với RA nên điều này làm cho nó trở thành một mô hình phù hợp để sàng lọc các hợp chất chống viêm tiềm năng ở người. Hiệu lực trong mô hình này được đo bằng mức độ giảm sưng khớp. Hiệu lực đối với RA trên lâm sàng được đo bằng khả năng giảm các triệu chứng ở bệnh nhân mà được đo bằng sự kết hợp của sưng khớp, tốc độ lắng hồng cầu, mức protein phản ứng C và mức yếu tố huyết thanh, như các kháng thể protein kháng citrullin.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 như được bộc lộ ở đây là thích hợp để sử dụng trong điều trị các đối tượng bị bệnh vẩy nến. Bệnh vẩy nến là rối loạn viêm da qua trung gian tế bào T mà có thể gây ra sự bất tiện đáng kể. Nó là bệnh mà hiện không có cách chữa và nó ảnh hưởng đến con người ở mọi độ tuổi. Mặc dù các đối tượng bị bệnh vẩy nến nhẹ thường có thể kiểm soát bệnh của họ bằng các chất dùng tại chỗ, nhưng trên một triệu bệnh nhân trên toàn thế giới cần việc điều trị bằng tử ngoại hoặc liệu pháp ức chế miễn dịch toàn thân. Không may là sự bất tiện và nguy cơ của việc chiếu xạ tử ngoại và độc tính nhiều liệu pháp làm hạn chế khả năng sử dụng chúng trong thời gian dài. Hơn nữa, các bệnh nhân thường bị tái phát bệnh vẩy nến, và trong một số trường hợp, bị lại rất nhanh sau khi dùng liệu pháp ức chế miễn dịch. Mô hình phát triển gần đây đối với bệnh vẩy nến dựa trên việc truyền các tế bào T CD4+ đã bất chức nhiều khía cạnh của bệnh vẩy nến của người và do đó có thể được sử dụng để xác định các hợp chất thích hợp để sử dụng trong điều trị bệnh vẩy nến (Davenport *et al.*, *Internat. Immunopharmacol* 2 : 653-672, 2002). Hiệu lực trong mô hình này được đo bằng mức giảm bệnh lý ở da sử dụng hệ thống chấm điểm. Tương tự, hiệu lực trên bệnh nhân được đo bằng mức giảm bệnh lý ở da.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TREM-1 là thích hợp để sử dụng trong điều trị các đối tượng bị bệnh viêm khớp vẩy nến. Bệnh viêm khớp vẩy nến (Psoriatic arthritis - PA) là một loại viêm khớp dạng viêm mà xảy ra ở một nhóm bệnh nhân bị bệnh vẩy nến. Ở các bệnh nhân này, bệnh lý/triệu chứng ở da đi kèm với sự sưng khớp tương tự như sự sưng khớp được nhìn thấy ở bệnh viêm khớp dạng thấp. Nó có các vùng da bị viêm loang lổ, nổi lên, đỏ với đóng vảy. Bệnh vẩy nến thường ảnh hưởng đến các đầu của khuỷu tay và đầu gối, da đầu, rốn và xung quanh vùng sinh dục hoặc hậu môn. Khoảng 10% số bệnh nhân bị bệnh vẩy nến cũng bị bệnh viêm kết hợp ở các khớp của họ.

Theo sáng chế, các phương pháp điều trị dự phòng, giảm nhẹ, điều trị triệu chứng và/hoặc chữa bệnh có thể thể hiện các khía cạnh riêng biệt của sáng chế. Kháng thể theo sáng chế có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa, như trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da. Cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng qua đường không phải ngoài đường tiêu hóa, như qua đường miệng hoặc dùng tại chỗ. Kháng thể theo

sáng chế có thể được dùng theo cách để phòng ngừa. Kháng thể theo sáng chế có thể được dùng theo cách để điều trị (khi có nhu cầu).

Các ví dụ dưới đây được cung cấp để minh họa mà không nhằm giới hạn sáng chế. Nội dung của tất cả các tài liệu viện dẫn được nêu trong toàn bộ đơn sáng chế này được kết hợp chính xác vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân tích động lực tương tác đối với biến thể kháng thể 318 đối với cả TREM-1 của người và của khỉ Cynomolgus bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Động lực liên kết của các biến thể mAb 0318 đối với TREM-1-Fc của người (hTREM-1) và TREM-1-Fc của khỉ cynomolgus (cTREM-1) được xác định. Các thử nghiệm liên kết được thực hiện trên thiết bị phân tích ProteOn (BioRad), thiết bị này đo các tương tác phân tử theo thời gian thực thông qua cộng hưởng plasmon bề mặt. Các thử nghiệm được chạy ở 25°C và các mẫu được bảo quản ở 15°C trong ngăn chứa mẫu. Tín hiệu (RU, đơn vị đáp ứng (response units)) được báo cáo qua ProteOn là có tương quan trực tiếp với khối lượng trên các bề mặt chip cảm biến riêng rẽ ở sáu tế bào dòng chảy song song. Kháng thể đơn dòng kháng Fc của người hoặc kháng thể đa dòng kháng Fc của chuột từ các kit Biacore bắt giữ Fc của người hoặc của chuột được cố định theo phương ngang trên các tế bào dòng chảy của chip cảm biến GLM theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mức độ cố định hóa cuối cùng của kháng thể bắt giữ là khoảng 2600 đến 6000 RU trong mỗi thử nghiệm. Việc bắt giữ kháng thể kháng hTREM-1 đơn dòng đã được tinh chế được biểu hiện bằng cách tái tổ hợp hoặc trên chuột được thực hiện bằng cách pha loãng các kháng thể đến nồng độ 5 đến 10 nM vào dung dịch đệm chạy thử nghiệm (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, pH = 7,4) sau đó tiêm theo hướng thẳng đứng ở tốc độ 30 μ l/phút trong 60 giây, tạo ra các điểm giao nhau tham chiếu liên kế với tất cả các tế bào dòng chảy chỉ với kháng thể kháng Fc được cố định. Phương pháp này điển hình là dẫn đến mức bắt giữ cuối cùng các kháng thể thử nghiệm khoảng 100 đến 300 RU và các giá trị R_{max} của chất phân tích là 30 đến 90 RU. Sự liên kết của các protein hTREM-1 hoặc cTREM-1 được thực hiện bằng cách tiêm chất phân tích

(kháng nguyên) trên tất cả các tế bào dòng chảy theo phương ngang để cho phép phân tích so sánh sự liên kết với các kháng thể kháng TREM-1 được bắt giữ khác nhau so với sự liên kết với điểm giao tham chiếu. Các protein hTREM-1 hoặc cTREM-1 được pha loãng theo chuỗi với tỷ lệ 1:3 đến nồng độ 1,2 đến 100 nM trong dung dịch đệm chạy thử nghiệm, tiêm ở tốc độ 100 μ l/phút trong 250 giây và để phân tách trong 600 giây. Bề mặt GLM được hồi phục sau mỗi chu trình tiêm chất phân tích thông qua hai lần tiêm 18 giây 10 mM Glyxin, pH = 1,7 và 50 mM NaOH ở tốc độ 100 μ l/phút. Bước hồi phục này loại bỏ kháng thể kháng TREM-1 và protein TREM-1 liên kết bất kỳ khỏi bề mặt kháng thể bắt giữ được cố định và cho phép sự liên kết tiếp theo của cặp mẫu tương tác tiếp theo. Quy trình hồi phục không loại bỏ kháng thể bắt giữ kháng Fc được trực tiếp cố định ra khỏi bề mặt chip.

Ái lực liên kết giữa các kháng thể và kháng nguyên được định lượng bằng cách xác định hằng số phân ly cân bằng (K_D) được xác định bằng cách đo động lực của sự tạo thành và phân ly phức hợp. Các hằng số tỷ lệ tương ứng với sự kết hợp và phân ly của phức hợp hóa trị một như k_a (tỷ lệ kết hợp) và k_d (tỷ lệ phân ly) đạt được bằng cách khớp dữ liệu vào mô hình Langmuir 1:1 sử dụng phần mềm đánh giá ProteOn để phân tích dữ liệu. K_D liên quan đến k_a và k_d thông qua phương trình $K_D = k_d / k_a$.

Các đường cong liên kết được xử lý bằng cách tham chiếu kép (trừ đi các tín hiệu bề mặt tham chiếu cũng như tiêm đệm trống vào các kháng thể kháng TREM-1 được bắt giữ) trước khi phân tích dữ liệu. Điều này cho phép hiệu chỉnh sự nhiễu của thiết bị, sự dịch chuyển khối lượng lớn và sự trôi trong quá trình tiêm mẫu.

Như được thể hiện trên các Fig.1A và 1B, tất cả các biến thể mAb 0318 (tức là, 318-IgG1.1f, 318-IgG1.3f, 318-IgG4-Aba, và 318-IgG1-Aba) đều được phát hiện là có ái lực đối với TREM-1-Fc của người tương tự như mAb 0318-IgG4. Biến thể 0318-IgG1.3f cũng liên kết với TREM-1 của khỉ cynomolgus, mặc dù với ái lực giảm nhẹ so với TREM-1 của người. Xem Fig.1A.

Ví dụ 2: Phân tích sự nội nhập của mAb 0318-IgG1.3f khi liên kết với thụ thể TREM-1

Kháng thể biến thể mAb 0318-IgG1.3f được thử nghiệm về sự nội nhập của nó trong các bạch cầu đơn nhân sơ cấp của người bằng cách sử dụng cả phương pháp hiển vi đồng tụ quét laze (dữ liệu không được thể hiện) và phương pháp phân tích

đếm tế bào theo dòng chụp ảnh Amnis ImageStream®. Như được thể hiện trên Fig.2A, ở 0 giờ, TREM-1 được biểu hiện chủ yếu trên bề mặt của các bạch cầu đơn nhân. Tuy nhiên, khoảng 24 giờ sau khi liên kết kháng thể, mức phần trăm đáng kể (~36%) thụ thể TREM-1 (như được chứng minh bằng cách nhuộm 0318-IgG1.3f) đã được nội nhập, điều này gợi ý rằng khi liên kết kháng thể mAb 0318-IgG1.3f, toàn bộ phức hợp kháng thể-thụ thể được nội nhập vào trong tế bào.

Tiếp theo, để xác định số phận của thụ thể TREM-1 khi nó đã được nội nhập, kháng thể TREM26 (số lô 314902, Biolegend; xem US20150274825 ở đoạn [0005]) được sử dụng để so sánh. Kháng thể TREM26 không cạnh tranh với các biến thể kháng thể 0318 được mô tả trong sáng chế. Như được thể hiện trên Fig.2B, so với thời điểm 0 giờ, có sự giảm đáng kể mức biểu hiện TREM26+ (~51%) tại thời điểm 20 giờ. Cũng có sự giảm đáng kể (4 lần) MFI (chỉ số huỳnh quang trung bình - mean fluorescence index) của TREM26+ ở thời điểm 20 giờ (sau điều trị bằng mAb 0318-IgG1.3f), điều này gợi ý rằng thụ thể TREM-1 bị phân hủy khi nội nhập. Tuy nhiên, sự giảm biểu hiện thụ thể TREM-1 này khi tiếp xúc kháng thể là có thể nghịch đảo, khi kháng thể được loại bỏ (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 3: Phân tích các biến thể mAb 0318 phong bế một cách hiệu quả sự hoạt hóa TREM-1 sử dụng thử nghiệm tế bào thông báo BWZ/hTREM-1

Khả năng của các biến thể mAb 0318 kháng TREM-1 trong việc ức chế sự truyền tín hiệu TREM-1 của người được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm dòng tế bào BWZ.36/hTREM-1DAP12:NFAT-LacZ (ở đây còn được gọi là "tế bào thông báo BWZ/hTREM-1") như được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 9,550,830 B2 và công bố đơn quốc tế số WO 2016/009086 A1. Ngắn gọn là, cấy khoảng 40.000 tế bào hTREM-1/BWZ.36 vào mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ màu đen, đáy trong với sự có mặt của 75 ng/ml PGLYRP1 (SEQ ID NO: 8) với 2,5 µg/ml PGN-ECndi (Cat. no. tlr1-kipgn, Invivogen San Diego, Calif., USA) để tạo ra tín hiệu dương tính dưới mức tối đa, hoặc cách khác với sự có mặt của mức dưới tối đa (1 µg/ml) của kháng thể đơn dòng kháng TREM-1 được hấp phụ trên nhựa (Cat. no. MAB1278, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA) để tạo ra tín hiệu dương tính.

Các biến thể mAb 0318 (tức là, 0318-IgG1.3f; 0318-IgG1.1f; 0318-IgG1-Aba; và 0318-IgG4-Aba) được chuẩn độ vào thử nghiệm, bắt đầu ở mức 10 µg/ml, với 5

lần pha loãng 2 lần theo chuỗi. Thử nghiệm được ủ qua đêm ở 37°C, sau đó được phát triển với Beta Glo (Cat. no. E4740, Promega Madison, Wis., USA), theo phương thức Beta Glo, và mức phát quang được ghi. Dữ liệu được dựng biểu đồ thể hiện các đơn vị phát quang tương đối Beta Glo theo nồng độ kháng thể thử nghiệm. Đối chứng âm tính không trung hòa mIgG1 (Cat. no. MAB002, R&D Systems Minneapolis, Minn., USA) và đối chứng dương tính trung hòa kháng thể đa dòng của dê kháng hPGLYRP1 (Cat. no. AF2590, R & D Systems, Minneapolis, Minn., USA) được chạy trên mỗi đĩa thử nghiệm. Kháng thể MAB1278 (cat. no. MAB1278, R&D Systems; Xem US20150274825 ở đoạn [0005]), chất chủ vận đã biết về sự truyền tín hiệu TREM-1, cũng được sử dụng làm đối chứng dương tính (xem bảng được chèn vào).

Như được thể hiện trên Fig.3, tất cả các biến thể mAb 0318 đều có hiệu lực trong việc ức chế sự truyền tín hiệu TREM-1 của người như được quan sát trước đó với kháng thể mAb 0318 IgG4 trong công bố đơn quốc tế số WO 2016/009086 A1.

Ví dụ 4: Phân tích hiệu lực *in vitro* của các biến thể kháng thể mAb 0318 trong việc ức chế các tế bào sơ cấp khác nhau của người sản xuất các xytokin viêm qua trung gian TREM-1

Để đánh giá thêm tính chất đối kháng của các biến thể mAb 0318 kháng TREM-1, hiệu lực của chúng trong việc phong bế sự giải phóng các xytokin viêm khác nhau (ví dụ, TNF- α , IL-6, hoặc IL-8) từ các tế bào sơ cấp được hoạt hóa của người được đánh giá. Các bạch cầu đơn nhân sơ cấp, các bạch cầu trung tính, và các tế bào đơn nhân máu ngoại biên (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs) được phân lập từ máu toàn phần của người và được kích thích bằng PGRP1 được liên kết với đĩa và peptidoglycan hòa tan (PGN-ECndss; một dạng của peptidoglycan mà không có hoạt tính TLR2).

Như được thể hiện trên Fig.4, tất cả các biến thể mAb 0318 (tức là, IgG1.3f, IgG1.1f, IgG1-Aba, và IgG4-Aba) đều có hiệu lực (các giá trị IC₅₀ là nằm trong khoảng xấp xỉ 10-20 pM) trong việc ức chế giải phóng TNF- α qua trung gian TREM-1 từ PBMC và các bạch cầu đơn nhân. Hiệu lực của các biến thể mAb 0318 này là tương tự như hiệu lực được thấy đối với kháng thể mAb 0318-IgG4. Kháng thể mAb 0318-IgG1.3f cũng có hiệu lực trong việc ức chế sự sản sinh IL-6 (giá trị IC₅₀ bằng khoảng 32 pM). Đối với các bạch cầu trung tính, biến thể mAb 0318-IgG1.3f thể hiện

là tốt hơn so với kháng thể mAb 0318-IgG4 trong việc phong bế các bạch cầu trung tính sản sinh IL-8 qua trung gian TREM-1. (Xem Fig.4).

Để chứng minh thêm các tính chất đối kháng của các biến thể kháng thể mAb 0318 kháng TREM-1, thử nghiệm nuôi cấy đồng thời bạch cầu đơn nhân-bạch cầu trung tính cũng được sử dụng. PGRP1 kết hợp với bạch cầu trung tính khi được nuôi cấy đồng thời với các bạch cầu đơn nhân có thể gắn vào các thụ thể TREM-1, dẫn đến sự sản sinh TNF- α từ bạch cầu đơn nhân. Như được thể hiện trên Fig.4, tất cả các biến thể kháng thể mAb 0318 đều phong bế một cách hữu hiệu sự hoạt hóa nội sinh (giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 19 đến 44 pM). Các kết quả tương tự được thấy với máu toàn phần đã lắng đọng RBC. (Xem Fig.4).

Ví dụ 5: Phân tích *in vitro* hiệu lực của mAb 0318-IgG1.3f trong việc phong bế sự sản sinh IL-8 từ máu toàn phần được kích thích

Một trong số các thử thách chính hướng đến sự phát triển thử nghiệm được lực học (pharmacodynamics - PD) máu toàn phần để đo các tính chất đối kháng của các biến thể kháng thể kháng TREM-1 là tình trạng nền cao do sự kích thích PGN. Để giúp hướng đến vấn đề này, máu toàn phần được kích thích bằng PGRP1 trước khi được tạo phức hợp + PGN với sự có mặt của chất ức chế NOD2 (để phong bế các xytokin nền được sản sinh bởi sự kích thích NOD2 bởi PGN). Các mức IL-8 được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm được lực học liên kết phối tử chuẩn (HTRF®) (Fig.5A) hoặc thử nghiệm nhuộm xytokin nội bào (intracellular cytokine staining - ICS) (Fig.5B).

Như được thể hiện trên các Fig.5A và 5B, kháng thể 0318-IgG1.3f phong bế một cách hữu hiệu sự sản sinh IL-8 qua trung gian TREM-1 với phần trăm ức chế nằm trong khoảng từ khoảng 60 đến 90% (xem Fig.5A). Các giá trị IC₅₀ quan sát được (giá trị trung bình là 12 pM với HTRF và 19,6 pM với ICS) là tương tự như với các giá trị quan sát được với các thử nghiệm chức năng khác (ví dụ, xem Ví dụ 4).

Ví dụ 6: Phân tích *in vitro* hiệu lực của mAb 0318-IgG1.3f trong việc phong bế sự biểu hiện mRNA của các chất trung gian viêm khác nhau trong máu toàn phần được kích thích

Để chứng minh thêm các tính chất đối kháng của mAb 0318-IgG1.3f, các mức biểu hiện các chất trung gian viêm chọn lọc (tức là, protein giống như chitinaza-3 1 (chitinase-3-like protein 1- "CHI3L1"), IL1 β , và IL6) được đo bằng PCR thời gian thực (qPCR). Ngắn gọn là, máu toàn phần của người được thu gom trong các ống EDTA từ ba người tình nguyện bình thường khỏe mạnh (người cho #126, 290, và 322) được kích thích bằng hPGRP1 trước khi được tạo phức hợp (50 μ g/ml) và PGN-ECndss (10 μ g/ml) (Invivogen tlrl-ksspgn) qua đêm với sự có mặt của các nồng độ mAb 0318-IgG1.3f thay đổi (0-1 nM). Sau khi kích thích, huyết tương được loại bỏ và đóng băng để đo xytokin. mARN được phân lập từ các mẫu bằng cách sử dụng kit phân lập máu MagMax-96 (ThermoFisher AM1837) theo phương thức của nhà sản xuất. Sau đó mARN được phân lập được chuyển hóa thành cADN bằng cách sử dụng hỗn hợp SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher 11755250). Tiếp theo, qPCR được thực hiện bằng cách sử dụng các que thăm dưới đây: HPRT1 (Hs99999909_m1) (Thermo Fisher 4351370), CHI3L1 (Hs01072228_m1) (Thermo Fisher 4331182), IL1 β (Hs00174097_m1) (Thermo Fisher 4331182), và IL6 (Hs00985639_m1) (Thermo Fisher 4331182) và TaqMan Fast Universal Master Mix (2x) (Thermo Fisher 4366072). Các giá trị biểu hiện gen được chuẩn hóa đối với HPRT1 và các giá trị $\Delta\Delta$ CT được tạo ra. Sau đó các kết quả được dựng biểu đồ và các giá trị IC₅₀ được xác định.

Như được thể hiện trên các Fig.6A đến 6C và nêu trong các ví dụ trên đây, mAb 0318-IgG1.3f có thể ức chế sự biểu hiện qua trung gian TREM-1 các chất trung gian viêm khác nhau trong máu toàn phần của người. Sự ức chế này thể hiện là phụ thuộc vào liều dùng. Các giá trị IC₅₀ được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Tựu trung lại, các kết quả trên đây chứng minh rằng các biến thể kháng thể mAb 0318 được mô tả theo sáng chế có tính đối kháng và có thể phong bế một cách hữu hiệu sự sản sinh các xytokin viêm qua trung gian TREM-1 từ các tế bào khác nhau của người.

Bảng 1.

Loại tế bào	Chất trung gian viêm	Tác nhân kích thích	mAb 0318-IgG1.3f IC ₅₀ (pM)
Máu toàn phần	ARN CHI3L1		4,58 $\pm$ 5,60 (N=3)
	ARN IL1b		11,15 $\pm$ 16,01 (N=3)

	ARN IL6	PGRP hòa tan + PGN-Ecdss hòa tan	97,66±125,63 (N=3)
--	---------	--	--------------------

Ví dụ 7: Độ nhớt của các biến thể mAb 0318

Mẫu được trao đổi dung dịch đệm và được thẩm tách vào chế phẩm phối chế được chọn (histidin 20mM, sucroza 150mM, arginin 25mM, natri clorua 50mM, pH = 6,0), sau đó cô đặc bằng cách sử dụng máy lọc ngưỡng khối lượng phân tử ly tâm Amicon Ultra. Trạng thái kết tụ của các mẫu được đo bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ để kiểm soát khả năng thay đổi độ monome khi cô đặc, giá trị này không được quan sát. Độ nhớt phụ thuộc nồng độ được xác định bằng cách sử dụng nhớt kế dung dịch RheoSense m-VROC sử dụng phương thức quét cắt tăng dần 3 điểm cho mỗi nồng độ được đo. Nồng độ được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở 280nm bằng nanoDrop sử dụng các chuỗi pha loãng và phép ngoại suy.

Như được thể hiện trên Fig.7, cả hai biến thể 318-IgG1.1f và biến thể 318-IgG1.3f có biên dạng độ nhớt tương tự nhau. Ở nồng độ khoảng 130 mg/mL, biến thể 0318-IgG1.3f có giá trị độ nhớt khoảng 9 cP. Biên dạng độ nhớt như vậy gần với biên dạng độ nhớt mà đã quan sát được đối với mAb 0318-IgG4 (xem công bố đơn quốc tế số WO 2016/009086).

Ví dụ 8: Khả năng sinh miễn dịch của các biến thể mAb 0318

Như được thể hiện trên Fig.8 và Bảng 2 (dưới đây), các biến thể 318-IgG1.1f và 318-IgG1.3f có nguy cơ sinh miễn dịch ở người bệnh ở mức độ từ thấp đến trung bình. Chỉ khoảng 22 đến 30% người cho có các đáp ứng sinh miễn dịch (như được đo bằng sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ *in vitro*) đối với các kháng thể này. Mức sinh miễn dịch đối với các biến thể 0318-IgG1-Aba và 0318-IgG4-Aba lần lượt là 10% và 42,5%. Xem bảng 2 (dưới đây). Ngược lại, mAb 0318-IgG4 có khả năng sinh miễn dịch nhiều hơn ở (55%) ở người bệnh. KLH (keyhole limpet hemocyanin) và VL6 (IL-21R mAb), mà được sử dụng làm đối chứng dương tính, có tính sinh miễn dịch cao ở người bệnh (lần lượt là 100% và 40%).

Bảng 2.

Thử nghiệm	Nhóm	Biến thể 0318	Nồng độ (mg/mL)	Tế bào chủ	EU/mg	% Monome	Nồng độ thử nghiệm (ug/mL)	% Sinh miễn dịch
PBMC	40	IgG4	161	UCO E CHO	<0,001	97,9	150	55,0
PBMC	40	IgG1-Aba	145	UCO E CHO	<0,001	97,3	150	10,0
PBMC	40	IgG1.1f	170	UCO E CHO	<0,006	98,6	150	22,5
PBMC	40	IgG4-Aba	5	HEK	<0,02	98,9	150	42,5
PBMC	40	IgG1.3f	4,6	HEK	<0,02	99,5	150	30,0

Ví dụ 9: Phân tích khả năng liên kết của các biến thể mAb 0318 đối với FcRn bằng cách sử dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Để xác định liệu các biến thể mAb 0318 khác có khả năng liên kết với FcRn hay không, các thụ thể FcRn (của chuột nhắt, người, và khỉ cyno) được cố định hóa trên chip cảm biến sinh học CM5 BIAcore (GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Sweden) thông qua kết hợp amin đến mức 400 đơn vị đáp ứng (RU). Thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng với PBS, 0,05% Tween-20TM pH = 6,0 (GE Healthcare Bioscience) là dung dịch đệm chạy và pha loãng. Các biến thể mAb 0318 khác nhau (200 nM) được tiêm ở lưu lượng 50 µL/phút ở nhiệt độ trong phòng ở độ pH = 6,0. Thời gian kết hợp là 180 giây, pha phân ly (cũng ở pH = 6,0) diễn ra trong 360 giây. Việc hồi phục bề mặt chip trở lại đường cơ sở đạt được bằng cách tiêm nhanh 50 mM Tris, pH = 8,0, và 150 mM NaCl. Việc đánh giá dữ liệu SPR được thực hiện bằng cách so sánh độ cao tín hiệu đáp ứng sinh học ở 180 giây sau khi tiêm và ở 300 giây sau khi tiêm. Các thông số tương ứng là mức RU tối đa (RU max) (180 giây sau khi tiêm) và độ ổn định muộn (300 giây sau khi kết thúc quá trình tiêm).

Như được thể hiện trên các Fig.9A và 9B, tất cả các biến thể kháng thể mAb 0318 (IgG1-Aba mod, IgG4-Aba mod, IgG1.1f, và IgG1.3f) đều có thể liên kết với FcRn của người, chuột nhắt, và khỉ cyno theo cách thức phụ thuộc độ pH. Điều này cũng là đúng đối với kháng thể mAb 0318 (IgG4).

Ví dụ 10: Phân tích khả năng liên kết của các biến thể mAb 0318 đối với một hoặc nhiều FcγR

Như được bàn luận trên đây, việc dùng *in vivo* các kháng thể đối với các thụ thể miễn dịch bề mặt tế bào nhất định có tiềm năng gây ra sự giải phóng xytokin, điều này có thể dẫn đến sự gây ra các biến chứng lâm sàng thông thường và độc hại đã biết như hội chứng giải phóng xytokin (CRS). Do vấn đề ở chỗ sự tiếp hợp FcγR có thể dẫn đến hoạt tính chủ vận TREM-1 tiềm năng thông qua liên kết chéo nên mAb 0318-IgG4 được tái xử lý di truyền thành một trong số các dạng biến thể được mô tả trong sáng chế (tức là, IgG1.1f, IgG1.3f, IgG1-Aba, hoặc IgG4-Aba). Sau đó, khả năng của các biến thể kháng thể 0318 trong việc liên kết với các FcγR khác nhau được đánh giá.

Như được thể hiện trên các Fig.10A và 10B, các biến thể 318-IgG1.1f và 318-IgG1.3f có khả năng liên kết tối thiểu đối với tất cả các FcγR (tức là, FcγRI (CD64), FcγRIIA (biến thể CD32a-H131 và CD32a-R131), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIIA (biến thể CD16a-V158), và FcγRIIIB (biến thể CD16b-NA2)). Các biến thể 318-IgG1-Aba và 318-IgG4-Aba không liên kết với FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, và FcγRIIIB nhưng lại liên kết với FcγRI. Ngược lại, mAb 0318 (IgG4) thể hiện khả năng liên kết đáng kể đối với tất cả các FcγR.

Ví dụ 11: Phân tích sự cảm ứng xytokin viêm bởi các biến thể mAb 0318

Để xác định thêm liệu việc điều trị *in vivo* bằng các biến thể mAb 0318 có đặt ra nguy cơ bị hội chứng giải phóng xytokin hay không, máu toàn phần được thu gom từ 8 người cho và các bạch cầu đơn nhân được phân lập. Sau đó, các bạch cầu đơn nhân được biệt hóa thành các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành bằng cách cấy các bạch cầu đơn nhân (4×10^6 tế bào/lỗ) và nuôi cấy chúng trong môi trường biệt hóa chứa IL-4 và GM-CSF (100 ng/mL). Khoảng 2 đến 3 ngày sau khi cấy, xấp xỉ một nửa môi trường biệt hóa được thay thế bằng môi trường mới. Ở ngày 7, các tế bào được thu hoạch và hiệu quả biệt hóa được đánh giá bằng cách phân tích sự biểu hiện CD14 trên các tế bào sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng. Tiếp theo, các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành được cấy vào đĩa đáy phẳng ($0,8 \times 10^5$ tế bào/lỗ) và các biến thể mAb 0318 được bổ sung vào các lỗ tương ứng (cùng với hoặc không cùng với CHO-CD32a). Các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành được kích thích bằng PGRP

+ PGN được sử dụng làm đối chứng dương tính. Sau đó các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, dịch nổi được thu hoạch từ các lỗ và lượng TNF- α , IL-6, và IL-12 được sản sinh được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA.

Kết quả từ những người cho đại diện được thể hiện trên các Fig.11A đến 11I. Việc bổ sung các biến thể mAb 0318 khác nhau (0318-IgG1.1f, 0318-IgG1.3f, và 0318-IgG1.1 Aba) dẫn đến sự sản sinh IL-6 (các Fig.11A, 11B, và 11C), TNF- α (các Fig.11D, 11E, và 11F), và IL-12 (các Fig.11G, 11H, và 11I) tối thiểu bởi các tế bào đuôi gai chưa trưởng thành. Các kết quả này cùng với các kết quả từ ví dụ 9, chứng minh rằng các kháng thể kháng TREM-1 được bộc lộ ở đây ít có nguy cơ gây ra hội chứng giải phóng cytokin khi được dùng cho bệnh nhân *in vivo*.

Ví dụ 12: Các đặc tính bổ sung của các biến thể mAb 0318

Các đặc tính sinh lý của biến thể 0318-IgG1.3f được cung cấp trong bảng 3 (dưới đây).

Bảng 3. Các đặc tính sinh lý của kháng thể kháng TREM-1 0318-IgG1.3f

Tính chất	Phương pháp	Kết quả
Đặc điểm nhận diện	LC-MS	Khối lượng nguyên vẹn được xác nhận
	LC-MS/MS bản đồ peptit	Trình tự được xác nhận bằng bản đồ peptit Lys-C (mức phục hồi 95,4%; mức chiếm giữ glycosyl hóa 99,7%)
Độ tinh khiết/Độ đồng nhất	SEC	96,3% monome, 3,6% HMW
	SEC-MALS	Đỉnh chính là 95% monome & đồng nhất (145 kDa)
	LC-MS	G0F (23,3%), G1F (51,3%), G2F (17,3%), SG2F (2,1%), S2G2F (1,0%)
	Điện di mao quản hội tụ đẳng điện (Capillary isoelectric focusing - cIEF)	Đỉnh chính pI = 8,75 (55%); các biến thể có tính axit = 29,5% & các biến thể có tính kiềm = 15,5%
	SDS-PAGE	Giảm: 2 dải chính ~50 kDa & 25 kDa Không giảm: Giải chính ~150 kDa với các mảnh phụ ~98 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 25 kDa (các thành phần lạ của điều kiện chạy SDS)
Ái lực	SPR (Biacore)	huTREM1: K _D = 0,91 nM; k _{on} = 1,4 E+06 (1/Ms); k _{off} = 1,3 E-3 (1/s)

		CynoTREM1: $K_D = 3,4 \text{ nM}$; $k_{on} = 4,0 \text{ E}+05 \text{ (1/Ms)}$; $k_{off} = 1,4 \text{ E}-3 \text{ (1/s)}$
Độ ổn định nhiệt	DSC	$T_{m1} = 66,2^\circ\text{C}$; $T_{m2} = 78,4^\circ\text{C}$; $T_{m3} = 83,2^\circ\text{C}$ Khả năng nghịch đảo ở $77^\circ\text{C} = 24\%$
Tương tác Fc γ R/FcRn	SPR (Biacore)	Chứng minh khả năng liên kết giảm đối với tất cả các Fc γ R Khả năng liên kết FcRn phụ thuộc độ pH kỳ vọng có thể so sánh với các mAb IgG1 kiểu đại

Các tính chất sinh lý của biến thể mAb 0318-IgG1.3f là có lợi cho phát triển trên lâm sàng. Đặc điểm nhận diện của kháng thể được xác nhận bằng phương pháp phân tích phổ khối (Phân tích khối lượng nguyên vẹn & lập bản đồ peptit). Kháng thể là > 96% monome như được thử nghiệm bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Vị trí N-glycosyl hóa đơn được xác nhận ở N301 trên chuỗi nặng với biên dạng glycan khớp với biên dạng glycan của các kháng thể đơn dòng được biểu hiện bằng CHO (G0F, G1F, và G2F). Độ ổn định nhiệt ($T_{m1} = 66,2^\circ\text{C}$; $T_{m2} = 78,4^\circ\text{C}$; $T_{m3} = 83,2^\circ\text{C}$) và khả năng nghịch đảo nhiệt (24% ở 77°C) của mAb 0318-IgG1.3f là nằm trong khoảng đối với kháng thể đơn dòng IgG1.3 điển hình của người.

Các đặc tính độ ổn định của biến thể 0318-IgG1.3f được cung cấp trong bảng 4 (dưới đây).

Bảng 4. Độ ổn định của kháng thể 0318-IgG1.3f kháng TREM-1

Tính chất	Phương pháp	Kết quả
Đông lạnh/rã đông (2 giờ ở -80°C , 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng x 3)	UV, SEC, DLS, iCIEF	Không bộc lộ nguy cơ về độ ổn định khi đông lạnh/rã đông
Biên dạng độ hòa tan/nồng độ	UV, SEC	>150 mg/mL trong dung dịch đệm phối chế (20 mM histidin, 150 mM sucroza, 50 mM natri clorua, 25 mM arginin, pH = 6,0)
Sàng lọc pH đối với độ ổn định về cấu hình và tính keo	Optim2 (khởi phát T_m và Tagg)	Độ ổn định cấu hình tối ưu ở pH = 6 đến 8 Độ ổn định tính keo tối ưu ở pH = 5 đến 6

Sàng lọc dung dịch đậm và tá dược	Optim2 (khởi phát Tm và Tagg)	Chất làm ổn định: sucroza, sorbitol, arginin (nồng độ cao), glyxerol
Độ ổn định tăng tốc 150 mg/mL 12 tuần ở 4°C, 25°C, và 40°C trong chế phẩm phối chế (histidin 20 mM, sucroza 150 mM, natri clorua 50 mM, arginin 25 mM, pH = 6,0)	SEC, cIEF, HIC, LC-MS/MS (lập bản đồ peptit), LC/MS (khối lượng nguyên vẹn), 2D-LC/MS (các mảnh), Biacore, thử nghiệm sinh học, UV-Vis, DLS	12 tuần ở 40°C = gia tăng về HMW là 1,2%/tháng gia tăng về LMW là 2,4%/tháng 12 tuần ở 40°C = gia tăng về Rh và Pd 12 tuần ở 40°C = gia tăng về các biến thể có tính axit là 11%/tháng 12 tuần ở 40°C = khử amit VSNK 3%/tháng
Đánh giá độ nhớt	Xác định biên dạng nồng độ-độ nhớt	Dung dịch đạt đến 9 cP ở ~130 mg/mL, với độ nhớt dự đoán là 12 cP ở 150 mg/mL

Không thấy có các vấn đề về độ ổn định vật lý trong chu trình đông lạnh-rã đông (3 chu trình) ở nồng độ 150 mg/mL trong chế phẩm phối chế được mô tả (histidin 20 mM, sucroza 150 mM, natri clorua 50 mM, arginin 25 mM, pH = 6,0). Các thử nghiệm phân hủy cưỡng bức trong chế phẩm phối chế nghiên cứu ở nồng độ 150 mg/mL được thiết lập ở nhiệt độ 4, 25, và 40°C (thời gian đến 3 tháng). Các biến đổi hóa học CDR duy trì ở mức thấp trong tất cả các điều kiện nhiệt độ và không ảnh hưởng đến hoạt tính, như được xác định bằng SPR. Mức khử amit VSNK là dưới mức kỳ vọng so với các kháng thể đơn dòng khác trên khung IgG1.3f (mức tăng 3%/tháng ở điều kiện bảo quản 40°C), các thay đổi về mức khử amit này là phụ thuộc vào thời gian và nhiệt độ. Tất cả các biến đổi hóa học khác (oxy hóa, khử amit, đồng phân hóa) cũng duy trì ở mức thấp như được theo dõi trong suốt thử nghiệm về độ ổn định. Lưu ý rằng, bảo quản ở 40°C chỉ ra sự tạo thành cả hai biến thể HMW và LMW (thể hiện lần lượt là 1,2%/tháng và 2,4%/tháng). Các thay đổi quan sát được là phụ thuộc vào thời gian và nhiệt độ, theo đó HMW gia tăng 0,25%/tháng, trong khi LMW duy trì không đổi trong điều kiện bảo quản 4°C trong thời gian thử nghiệm. Sự tạo thành LMW thấp trong điều kiện bảo quản 40°C được đặc trưng bằng 2D-LC/MS với các số đo khối lượng chính xác độ phân giải cao do các loại tích tụ Fab 1 mất đi, cũng như nhánh Fab, được cho là ở trình tự bảo toàn ở vùng bản lề trên.

Ví dụ 13: Thử nghiệm PK/TK/PD đối với biến thể mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ *Cynomolgus*

Thử nghiệm dược động học (pharmacokinetic - PK), độc động học (toxicokinetic - TK), và dược lực học (pharmacodynamics - PD) liều đơn đối với kháng thể kháng TREM-1 0318-IgG1.3f được thực hiện trên các con khỉ *Cynomolgus*. Một số con vật được tiêm trong tĩnh mạch kháng thể 0318-IgG1.3f với liều 2 mg/kg (n=3). Các con vật khác được tiêm dưới da kháng thể 0318-IgG1.3f với một trong số các liều sau: (i) 0 mg/kg (tức là đối chứng) (n=4), (ii) 0,1 mg/kg (n=4), (iii) 0,5 mg/kg (n=4), (iv) 2 mg/kg (n=3), hoặc (v) 10 mg/kg (n=4). Khi dùng kháng thể, dược động học, các kháng thể kháng thuốc (anti-drug antibodies - ADA), sự chiếm giữ thụ thể TREM-1 (receptor occupancy - RO), và các đáp ứng dược lực học ex vivo được kiểm tra tại các thời điểm định trước.

Dược động học (PK)

Để đánh giá dược động học, nồng độ trong huyết thanh của kháng thể 0318-IgG1.3f được đánh giá trong các con vật bằng thử nghiệm liên kết phối tử sử dụng protein TREM-1 tái tổ hợp được biotinyl hóa làm chất bắt giữ và kháng thể đa dòng của dê kháng TREM-1 làm chất phát hiện.

Như được thể hiện trên Fig.12, dược động học của kháng thể 0318-IgG1.3f được xác định là không tuyến tính trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/kg, chủ yếu do sự thanh thải qua trung gian đích (tức là, sự nội nhập và sự phân hủy của kháng thể khi liên kết với thụ thể TREM-1; xem Ví dụ 2).

Phân tích không ngăn dựa trên các thông số PK được thể hiện trên bảng 5 (dùng trong tĩnh mạch) và bảng 6 (dùng dưới da). Ngắn gọn là, sự tăng liều 100 lần dẫn đến sự tăng phơi nhiễm huyết thanh (AUCs) 830 lần. Xem bảng 6. Sự thanh thải trên các con khỉ sau khi dùng liều trong tĩnh mạch (IV) 2 mg/kg là $0,1 \pm 0,02$ mL/giờ/kg và tương tự như các mAb trên cơ sở IgG1 khác. Xem bảng 4. Vss ở mức liều 36 ± 5 mL/kg, là tương tự như thể tích trong huyết tương, điều này thể hiện sự phân bố ngoại mạch hạn chế. Thời gian bán thải của kháng thể 0318-IgG1.3f gia tăng từ 2 ngày đối với liều 0,1 mg/kg lên 10 ngày đối với liều 2 và 10 mg/kg (dùng liều đơn dưới da). Xem bảng 6. Sinh khả dụng của kháng thể 0318-IgG1.3f sau khi dùng dưới da (2 mg/kg) là cao ở mức 84%.

Bảng 5. Các thông số PK của mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ Cynomolgus sau khi dùng liều đơn trong tĩnh mạch (IV)

Các thông số IV-PK mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ Cynomolgus	
Liều (mg/kg)	2
N	3
V _{ss} (mL/kg)	36 ± 5
CL (mL/giờ/kg)	0,1 ± 0,02
T _{1/2} (ngày)	10 ± 2
AUC _{cuối cùng} (μM*giờ)	116 ± 20
ADA dương tính/Tổng số được thử nghiệm	3/3 (1/3)*

* Số lượng các con khỉ trong số tổng số con được thử nghiệm mà thể hiện ADA bền vững.

Bảng 6. Các thông số PK của mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ Cynomolgus sau khi dùng liều đơn dưới da (SC)

Các thông số SC-PK mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ Cynomolgus				
Liều (mg/kg)	0,1	0,5	2	10
N	4	4	3	4
C _{max} (nM)	13 ± 4	50 ± 3	189 ± 22	1419 ± 93
T _{max} (giờ)	24	48	168 ± 96	84 ± 24
AUC _{cuối cùng} (μM*giờ)	1 ± 0,2	15 ± 1	94 ± 13	649 ± 64
T _{1/2} (ngày)	2 ± 0,4	4 ± 2	10 ± 5	10 ± 3
Sinh khả dụng SC			84%	
ADA dương tính/Tổng số được thử nghiệm	3/4 (2/4)*	4/4 (2/4)*	3/3 (2/3)*	3/4 (1/4)*

* Số lượng các con khỉ trong số tổng số con được thử nghiệm mà thể hiện ADA bền vững.

Kháng thể kháng thuốc (Anti-Drug Antibodies - ADA)

Mặc dù ADA huyết thanh được phát hiện ở hầu hết các con khỉ (16 trong số 18 con) sau khi dùng liều đơn (bất kể đường dùng), nhưng sự phơi nhiễm kháng thể 0318-IgG1.3f và sự chiếm giữ thụ thể TREM-1 (RO) không bị ảnh hưởng ở phần lớn các con vật dương tính với ADA. Xem bảng 4 và 5. Sự suy giảm nhanh chóng mức độ phơi nhiễm cuối cùng của kháng thể 0318-IgG1.3f mà đi kèm với sự hình thành ADA được thấy chỉ ở hai con khỉ (một con trong nhóm dùng liều 0,1 mg/kg ở ngày

thứ 7 và một con trong nhóm dùng liều 0,5 mg/kg ở ngày 21). Vì ADA ảnh hưởng đến mức độ phơi nhiễm ở hai con khỉ này trong pha cuối cùng, các điểm dữ liệu tương ứng được loại bỏ khỏi phân tích PK.

Sự chiếm giữ thụ thể TREM-1 (RO) và tổng mức thụ thể TREM-1

Tiếp theo, sự chiếm giữ của các thụ thể TREM-1 được biểu hiện trên các bạch cầu đơn nhân máu ngoại biên và các bạch cầu hạt được đánh giá. Như được thể hiện trên các Fig.15A và 15B, đối với tất cả các liều lượng được thử nghiệm, phần trăm thụ thể TREM-1 mà được chiếm giữ (tức là, được liên kết với kháng thể kháng TREM-1) ở các bạch cầu đơn nhân là tương tự với các bạch cầu hạt. Hơn nữa, khoảng thời gian chiếm giữ thụ thể thể hiện là phụ thuộc vào liều kháng thể 0318-IgG1.3f được dùng cho các con vật. Ở mức liều 0,5 mg/kg, thấy mức RO $\geq 85\%$ trong tối đa 2 tuần sau khi dùng kháng thể. Ngược lại, với mức liều 2 và 10 mg/kg, $\geq 85\%$ thụ thể TREM-1 vẫn được chiếm giữ trong ít nhất là 1 tháng sau khi dùng.

Sau khi dùng liều kháng thể 0318-IgG1.3f, tổng mức thụ thể TREM-1 được giảm đi trên cả các bạch cầu đơn nhân và các bạch cầu hạt. Xem các Fig.14A và 14B. Như đã được bàn luận trên đây, việc giảm này có thể do sự gia tăng vòng quay của thụ thể sau khi liên kết với kháng thể. Sự giảm biểu hiện thụ thể TREM-1 bề mặt là có thể nghịch đảo và thời gian mất thụ thể bề mặt là tương quan với thời gian chiếm giữ thụ thể ít nhất là ở các mức liều được thử nghiệm.

Mức TREM-1 hòa tan (soluble TREM-1 - sTREM-1) thể hiện là gia tăng 10 đến 50 lần sau khi liều đơn của biến thể mAb 0318 mAb-IgG1.3f trong tất cả các nhóm liều được thử nghiệm. (Dữ liệu không được thể hiện). Không rõ liệu sự tăng các mức sTREM-1 có liên quan đến việc dùng kháng thể kháng TREM-1 hay đến việc xử lý nói chung đối với các con vật trong quá trình thử nghiệm hay không. Trong trường hợp bất kỳ, vì nồng độ thuốc vượt quá (>1000 lần) các mức sTREM-1, đích hòa tan không được tiên liệu là ảnh hưởng đến sự liên kết của biến thể mAb 0318 mAb-IgG1.3f với TREM-1 bề mặt tế bào.

Ví dụ 14: Thử nghiệm PK/TK/PD đối với biến thể mAb 0318-IgG1.3f ở khỉ *Cynomolgus* được mô tả bằng mô hình PK 2 ngăn với TMDD ở ngăn trung tâm

Dữ liệu PK, RO, tổng mức thụ thể, và PD trên khỉ được mô tả bằng cách sử dụng mô hình PK 2 ngăn với sự phân bố thuốc qua trung gian đích (target-mediated drug disposition - TMDD) bão hòa trong ngăn trung tâm để điều tiết đối với PK không tuyến tính quan sát được (xem Ví dụ 12 và Fig.13). Mô hình ức chế hiệu quả trực tiếp được sử dụng để mô tả đáp ứng PD. Mô hình này có thể thu thập một cách hữu hiệu tiến trình thời gian của PK/RO/PD quan sát được ở khỉ. Các điểm đầu mút quan sát được (đường tròn trắng) và được dự báo bằng mô hình (đường nét đậm) được cung cấp trên các Fig.16A (liều dùng 0,1 mg/kg dưới da) và 16B (liều dùng 10 mg/kg dưới da). Bảng 7 cung cấp các thông số PK/PD ước lượng. Khi phơi nhiễm biến thể mAb 0318-IgG1.3f trong huyết thanh và dữ liệu RO TREM-1 được gộp lại từ tất cả các con khỉ, sự gia tăng RO phụ thuộc nồng độ được quan sát thấy. Xem các Fig.16A và 16B. Mô hình Emax được sử dụng để mô tả mối quan hệ nồng độ-RO, EC_{50} RO được ước lượng in vivo là $1,6 \pm 0,2$ nM.

Bảng 7. Các thông số ước lượng của mô hình PK/PD được sử dụng để mô tả dữ liệu PK/TK/PD trên khỉ và các thông số ước lượng dự kiến của người

Các thông số PK	Mô tả	Thông số ước lượng đối với mô hình trên khỉ Cyno (CV%)	Thông số ước lượng dự kiến của người
Ka (h ⁻¹)	Hằng số tốc độ hấp thụ	0,049 (15)	0,049
V1 (mL/kg)	Thể tích phân phối của ngăn trung tâm	22 (5)	22
Ke (h ⁻¹)	Hằng số tốc độ thanh thải từ ngăn trung tâm	0,003 (10)	0,0019
K12 (h ⁻¹)	Hằng số tốc độ phân phối	0,024 (14)	0,015
K21 (h ⁻¹)		0,022 (7)	0,014
F (%)	Sinh khả dụng SC	80 (5)	80
Kdeg (h ⁻¹)	Hằng số tốc độ quay vòng đích	0,09 (20)	0,09
Kint (h ⁻¹)	Hằng số tốc độ nội nhập phức hợp mAb-đích	0,39 (18)	0,39
R0 (nmol/kg)	Mức đích cơ sở trong ngăn trung tâm	0,024 (22)	0,024
KD (nM)	Ái lực của mAb đối với TREM-1	0,64 (12)	0,24
Koff (h ⁻¹)	mAb phân ly khỏi TREM-1	0,37 (7)	0,30
IC50 (nM)	Nồng độ để ức chế khoảng 50% sự kích thích TREM-1 ex-vivo qua trung gian PGN+PGRP	1,9 (92)	0,1

E0 (%)	Sự kích thích TREM-1 ex-vivo qua trung gian PGN+PGRP cơ sở (trước khi dùng liều)	100 (cố định)	100
--------	--	---------------	-----

Bảng 8.

SEQ ID	Mô tả	Trình tự
50	Chuỗi nặng 318-IgG1.3f	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMHWVRQA SGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTA YLQMNSLKTEDTAVYYCTRDMGIRRFQAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	Chuỗi nặng 318-IgG1.1f	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMHWVRQA SGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTA YLQMNSLKTEDTAVYYCTRDMGIRRFQAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	Chuỗi nặng 318-IgG1-Aba	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMHWVRQA SGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTA YLQMNSLKTEDTAVYYCTRDMGIRRFQAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKAALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	Chuỗi nặng 318-IgG4-Aba	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMHWVRQA SGKGLEWVGRIRTKSSNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTA YLQMNSLKTEDTAVYYCTRDMGIRRFQAYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCN VDHNKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLF

SEQ ID	Mô tả	Trình tự
		PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	Chuỗi nhẹ 318-IgG1.3f, IgG1.1f, IgG1-Aba, IgG4-Aba	DIVLTQSPDLSAVSLGERATINCRASQSVDTFDYSFLHWYQQ KPGQPPKLLIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQSNQDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

Đơn PCT này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn tạm thời nộp tại Mỹ số 62/651,605, nộp ngày 02/04/2018, mà được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, hoặc SEQ ID NO: 85.
2. Chuỗi nặng theo điểm 1 bao gồm SEQ ID NO: 50.
3. Chuỗi nặng theo điểm 1 bao gồm SEQ ID NO: 85.
4. Kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với thụ thể kích hoạt được biểu hiện trên các tế bào tủy 1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1 - TREM-1), chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 85, và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.
5. Kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 50 và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.
6. Kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 51 và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.
7. Kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 52 và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.
8. Kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, chứa CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng; CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nhẹ; và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1,
 trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25), và DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26);
 trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28), và QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29); trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 chứa

ba hoặc nhiều sự thay thế axit amin bao gồm L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU và trong đó chuỗi nặng thiếu lysin đầu tận cùng C.

9. Kháng thể theo điểm 8, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm SEQ ID NO: 14 và VL bao gồm VL của SEQ ID NO: 15.

10. Kháng thể theo điểm 9, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 85, và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.

11. Kháng thể được phân lập mà liên kết một cách đặc hiệu với TREM-1, chứa CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng; CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nhẹ; và vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1,

trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng lần lượt chứa TYAMH (SEQ ID NO: 24), RIRTKSSNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 25), và DMGIRRQFAY (SEQ ID NO: 26);

trong đó CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ lần lượt chứa RASQSVDTFDYSFLH (SEQ ID NO: 27), RASNLES (SEQ ID NO: 28), và QQSNQDPYT (SEQ ID NO: 29);

trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 chứa ba hoặc nhiều sự thay thế axit amin, trong đó các sự thay thế này bao gồm L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU, hoặc

trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 chứa ba hoặc nhiều sự thay thế axit amin và một hoặc nhiều sự xóa bỏ axit amin, trong đó các sự thay thế này bao gồm L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU.

12. Kháng thể theo điểm 11, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm SEQ ID NO: 14 và VL bao gồm VL của SEQ ID NO: 15.

13. Kháng thể theo điểm 12, chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, hoặc SEQ ID NO: 85; và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.

14. Kháng thể theo điểm 12, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có ba sự thay thế, trong đó các sự thay thế này là L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU.
15. Kháng thể theo điểm 12, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có ba sự thay thế, trong đó các sự thay thế này là L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU, và gốc lysin đầu tận cùng C của vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 là có mặt.
16. Kháng thể theo điểm 12, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có ba sự thay thế, trong đó các sự thay thế này là L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU, và trong đó chuỗi nặng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.
17. Kháng thể theo điểm 11, chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 85, và trong đó chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 54.
18. Kháng thể theo điểm 11, chứa chuỗi nặng, trong đó chuỗi nặng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.
19. Kháng thể theo điểm 11, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có ba sự thay thế, trong đó các sự thay thế này là L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU.
20. Kháng thể theo điểm 11, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có ba sự thay thế, trong đó các sự thay thế này là L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU, và gốc lysin đầu tận cùng C của vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 là có mặt.
21. Kháng thể theo điểm 11, trong đó vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 có ba sự thay thế, trong đó các sự thay thế này là L234A, L235E, và G237A, theo cách đánh số EU, và trong đó chuỗi nặng thiếu gốc lysin đầu tận cùng C.
22. Phân tử đặc hiệu kép chứa kháng thể theo điểm 11, được liên kết với phân tử có tính đặc hiệu liên kết thứ hai.

23. Thẻ liên hợp miễn dịch chứa kháng thể theo điểm 11, được liên kết với một tác nhân.
24. Chế phẩm chứa kháng thể theo điểm 11, và chất mang.
25. Kit chứa kháng thể theo điểm 11, và hướng dẫn sử dụng.

1/29

FIG. 1A

Biến thể	Chất phân tích	Kon (1/Ms)	koff (1/Ms)	KD (nM)
IgG1.3f	hu-TREM1	1,4E+06	1,3E-03	0,91
IgG1.3f	cy-TREM1	4,0E+05	1,4E-03	3,4

FIG. 1B

Biến thể	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
IgG4 A	1,42E+06	1,43E-03	1,01E-09	333	0,234
IgG4 B	1,46E+06	1,43E-03	9,8E-10	334	0,228
IgG1.1f	1,64E+06	1,42E-03	8,66E-10	400	0,301
IgG1.3f	1,65E+06	1,40E-03	8,50E-10	373	0,282
IgG4-Aba CT (mod)	1,70E+06	1,51E-03	8,89E-10	374	0,25
IgG1-Aba CT (mod)	1,62E+06	1,45E-03	8,99E-10	342	0,255
IgG1.1f (Đột biến M thành Q)	1,66E+06	1,88E-03	1,13E-09	347	0,277
IgG4 (Đột biến M thành Q)	1,46E+06	1,85E-03	1,26E-09	376	0,262
IgG4 (Đột biến M thành L)	1,29E+06	3,56E-03	2,75E-09	340	0,348

FIG. 2A

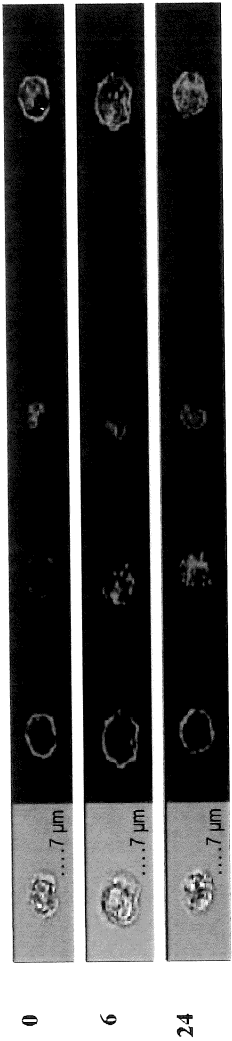
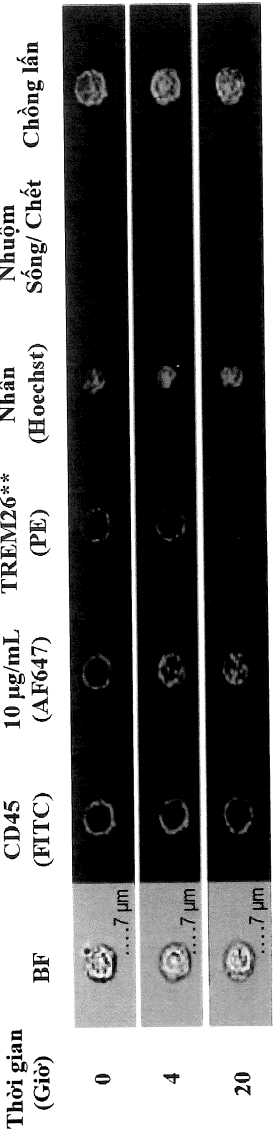


FIG. 2B



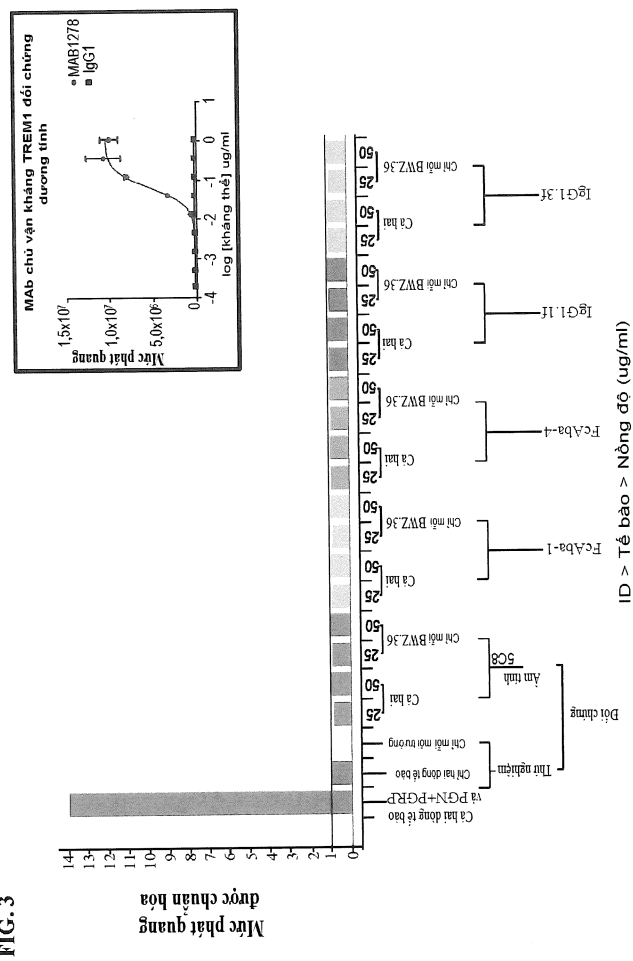


FIG. 3

4/29

FIG. 4

Kiểu tế bào	Thử nghiệm	Tác nhân kích thích	mAb 0318- IgG4 IC50 (pM)	mAb 0318- IgG1.3f IC50 (pM)	mAb 0318- IgG1.1f IC50 (pM)	mAb 0318- IgG1- Aba IC50 (pM)	mAb 0318- IgG4- Aba IC50 (pM)
PBMC	TNF- α	PGRP + PGN-Ecdss	42 (N=3)	25 (N=12)	14 (N=9)	20 (N=3)	19 (N=3)
	IL-6		N/D	32.26 (N=2)	N/D	N/D	N/D
Bạch cầu đơn nhân	TNF- α	PGRP + PGN-Ecdss	4 (N=3)	11 (N=9)	9 (N=12)	12,5 (N=3)	15,5 (N=3)
Bạch cầu đơn nhân kích thích phối tử nội sinh	TNF- α	PMA-Stim Neutrophil Endogenous PGRP	44 (N=3)	22 (N=6)	19 (N=6)	26 (N=6)	17 (N=6)
Máu toàn phần lắng đọng RBC	TNF- α	PGRP + PGN-Ecdss	55 (N=6)	96 (N=6)	63 (N=9)	58 (N=3)	94 (N=3)
	IL-6		68,4 (N=6)	N/D	N/D	N/D	N/D
Bạch cầu trung tính	IL-8	PGRP + PGN-Ecdss	37,5 (N=3)	9 (N=3)	N/D	N/D	N/D

5/29

FIG. 5A

Người cho	Biểu hiện xytokin IL-8 (pg/mL)			Sự ức chế của mAb 0318-IgG1.3f	
	Duy nhất PGN	PGRP/PGN	Số lần thay đổi	Mức ức chế tối đa (%)	IC ₅₀ (pM)
298	518	4886	9	81	11
294	391	2319	6	81	14
322	425	1420	3	82	11
344	393	1188	3	61	12
351	388	1318	3	92	9
356	276	1377	5	62	12
				IC ₅₀ trung bình	12
				Độ lệch chuẩn của IC ₅₀	2

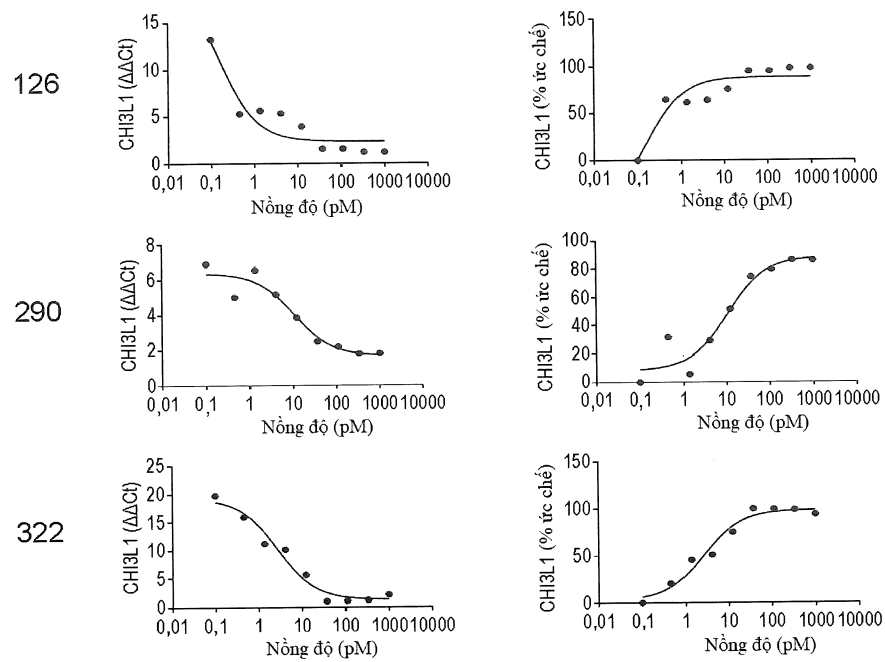
FIG. 5B

Người cho	% tế bào IL-8+ve (PGN duy nhất)	% tế bào IL-8+ (PGRP + PGN)	IC ₅₀ pM	IC ₅₀ pM (Trung bình ± SD)
A	0,019	19,2	20,5	19,6±0,012
B	0,057	12,4	27,5	
C	0,043	21,1	36,0	
D	0,097	03,90	ND*	
E	0,025	29,25	5,2	
F	0,046	19,25	8,7	
G	0,021	04,04	ND*	

6/29

FIG. 6A

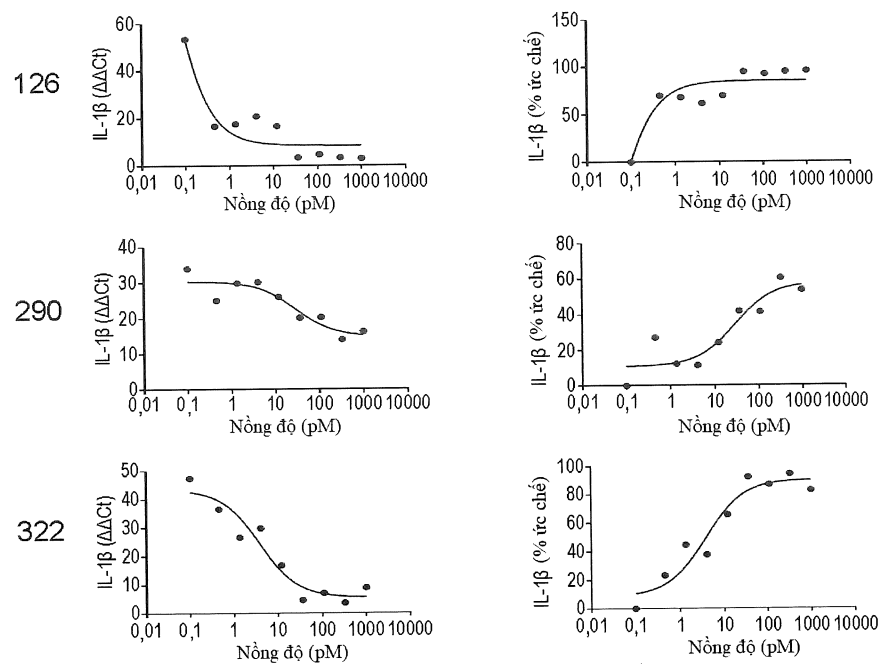
Người cho #



7/29

FIG. 6B

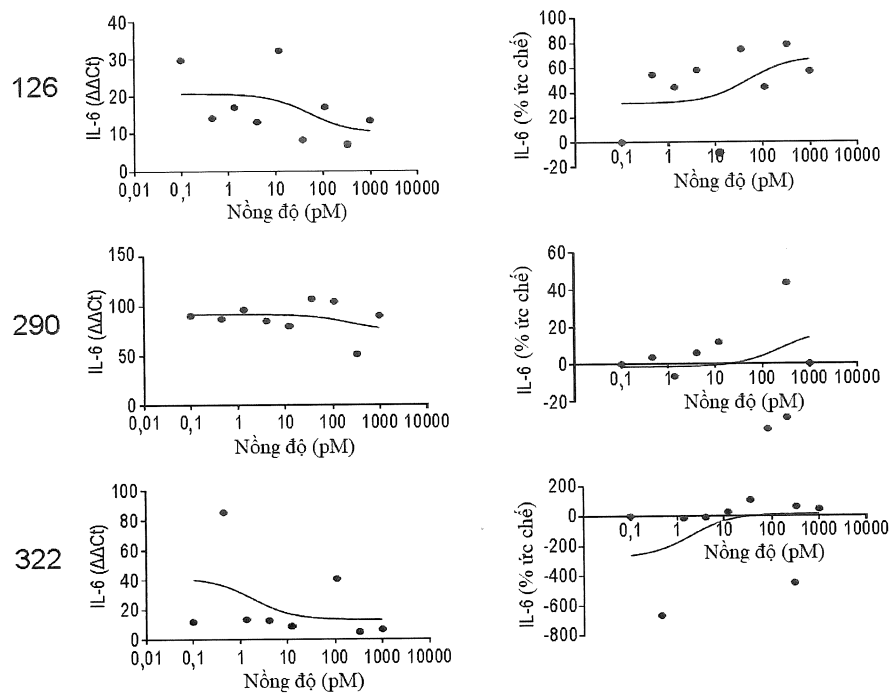
Người cho #



8/29

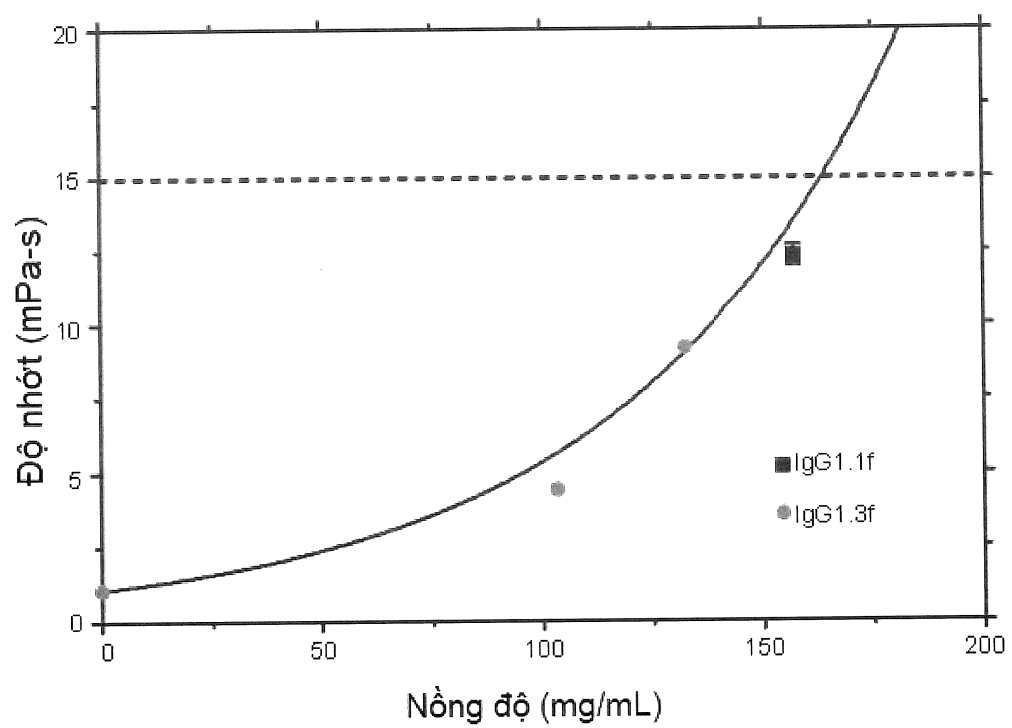
FIG. 6C

Người cho #



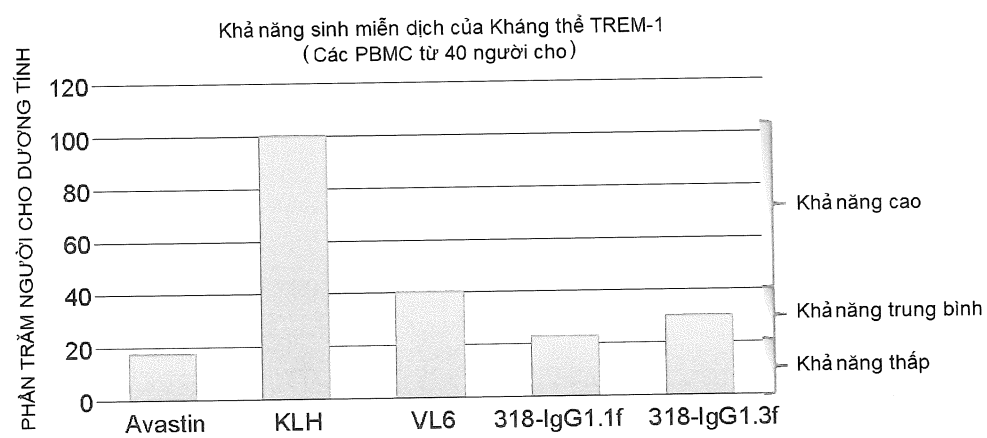
9/29

FIG. 7



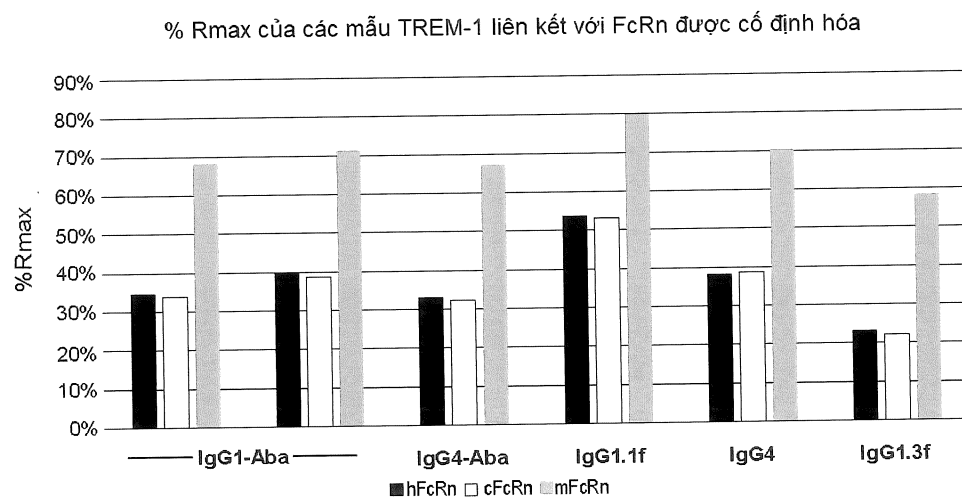
10/29

FIG. 8



11/29

FIG. 9A



12/29

FIG. 9B

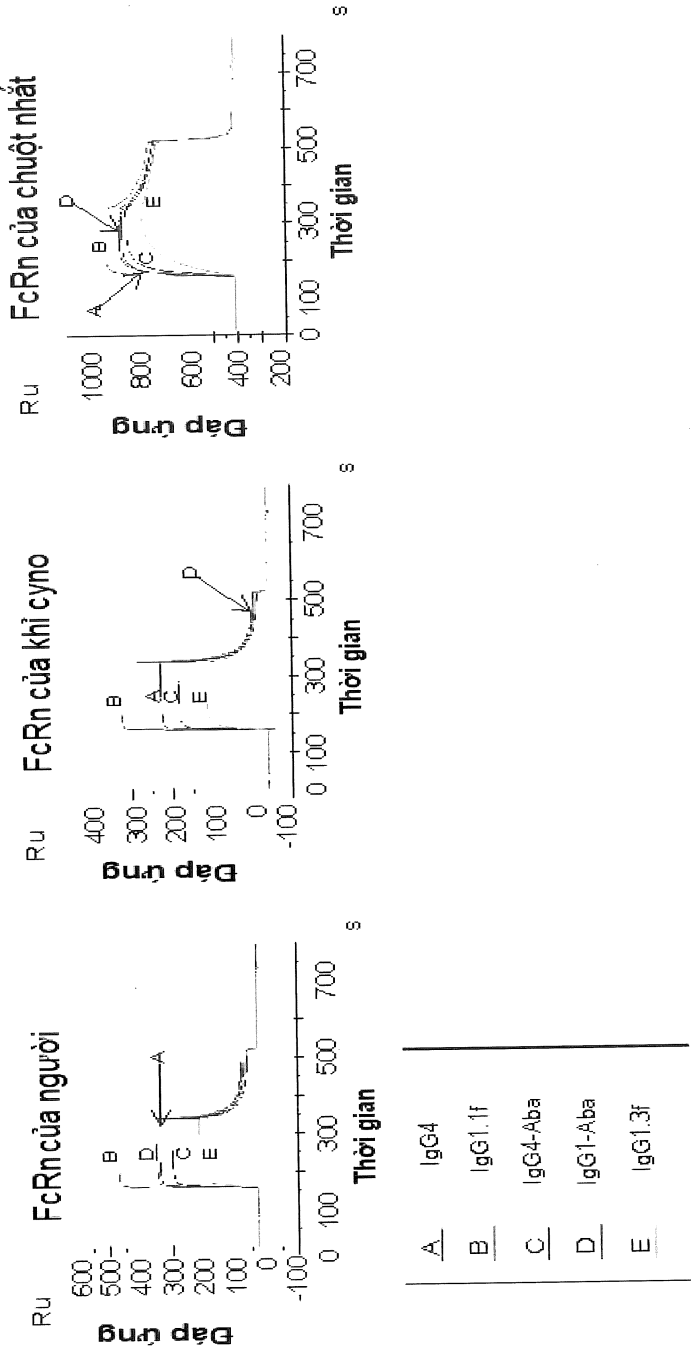


FIG. 10A

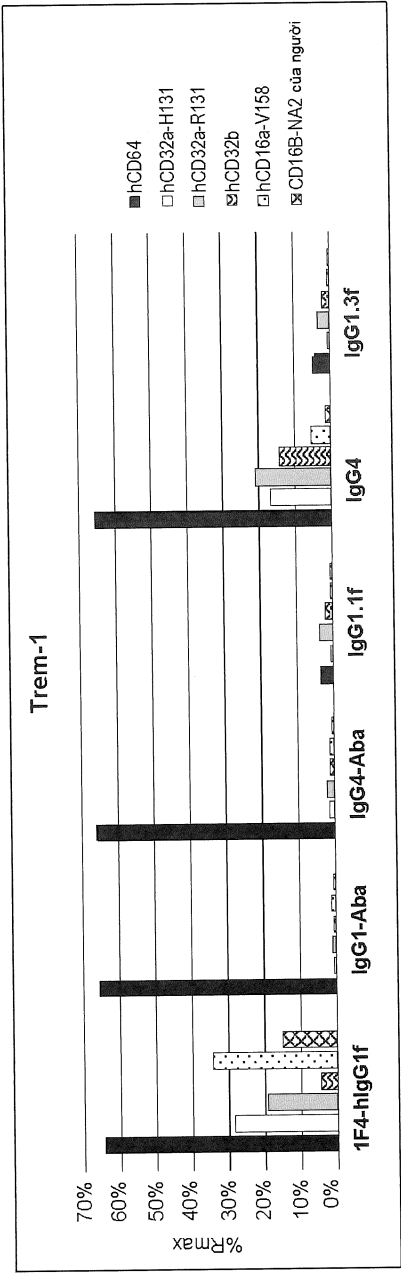
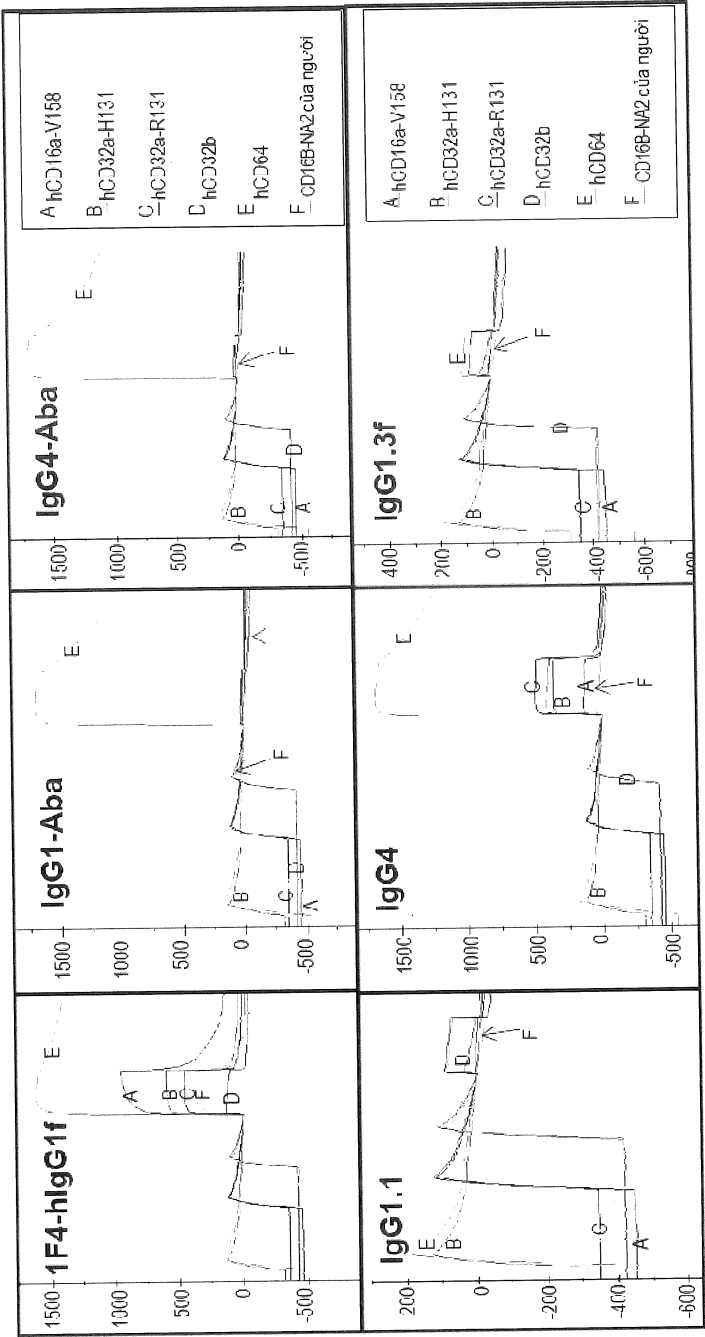
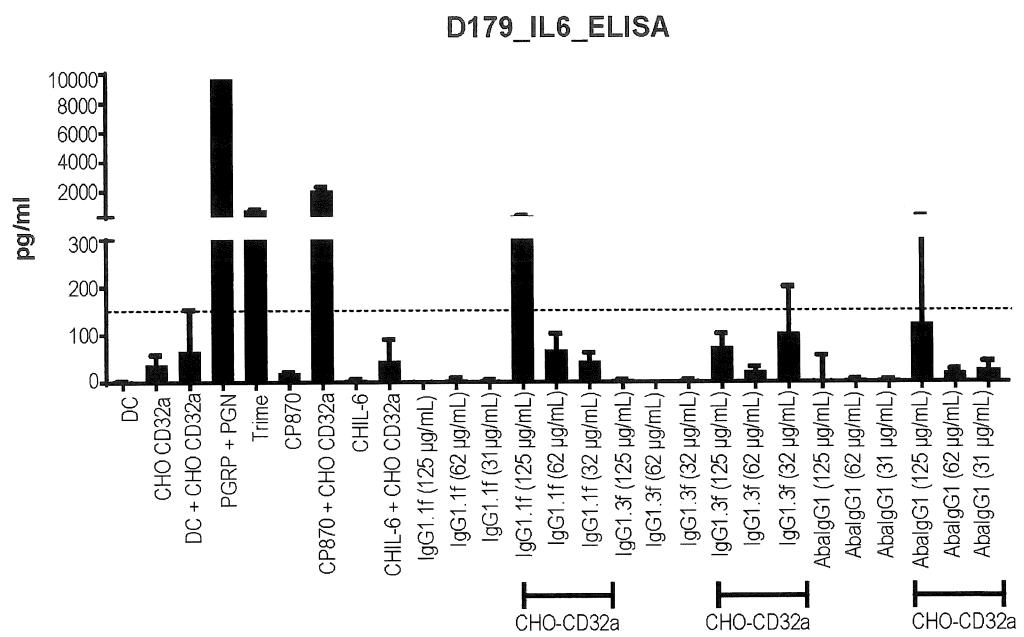


FIG. 10B



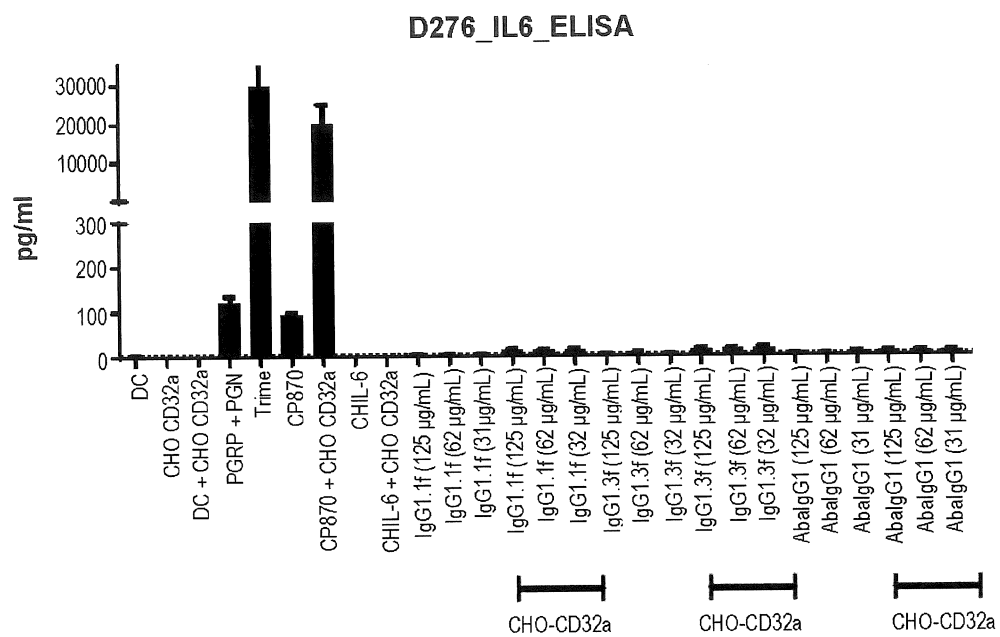
15/29

FIG. 11A



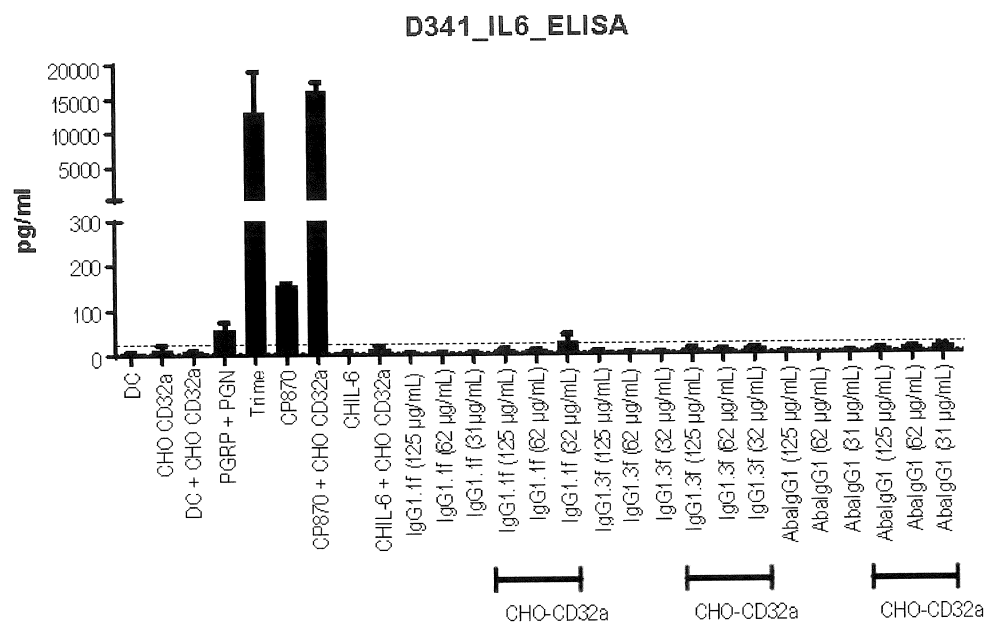
16/29

FIG. 11B



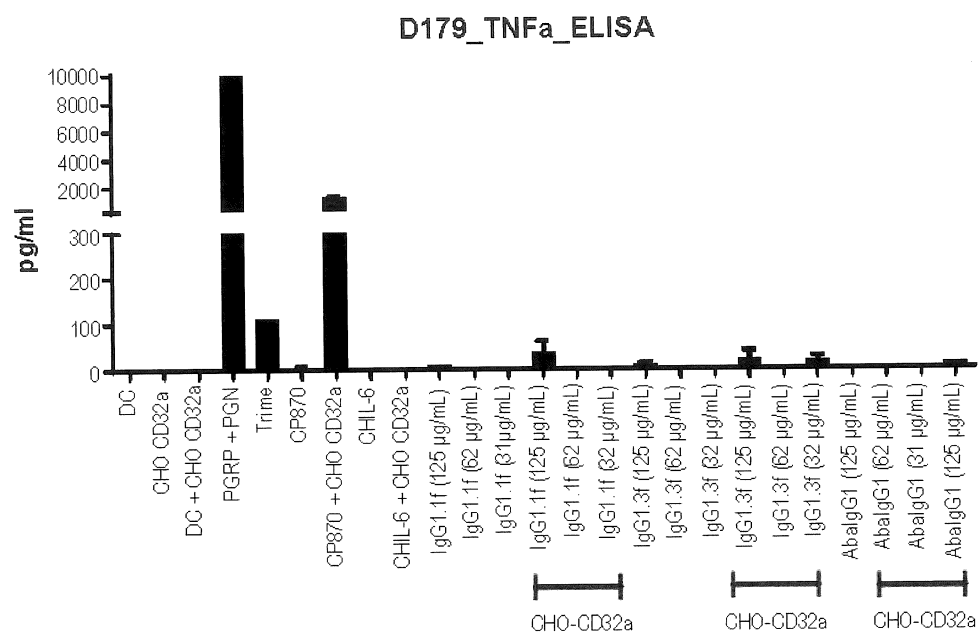
17/29

FIG. 11C



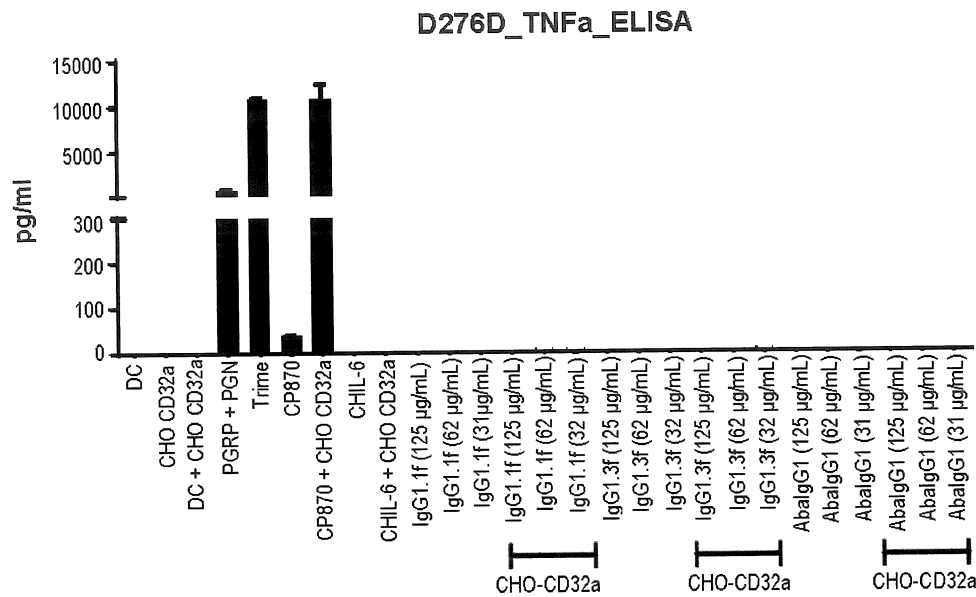
18/29

FIG. 11D



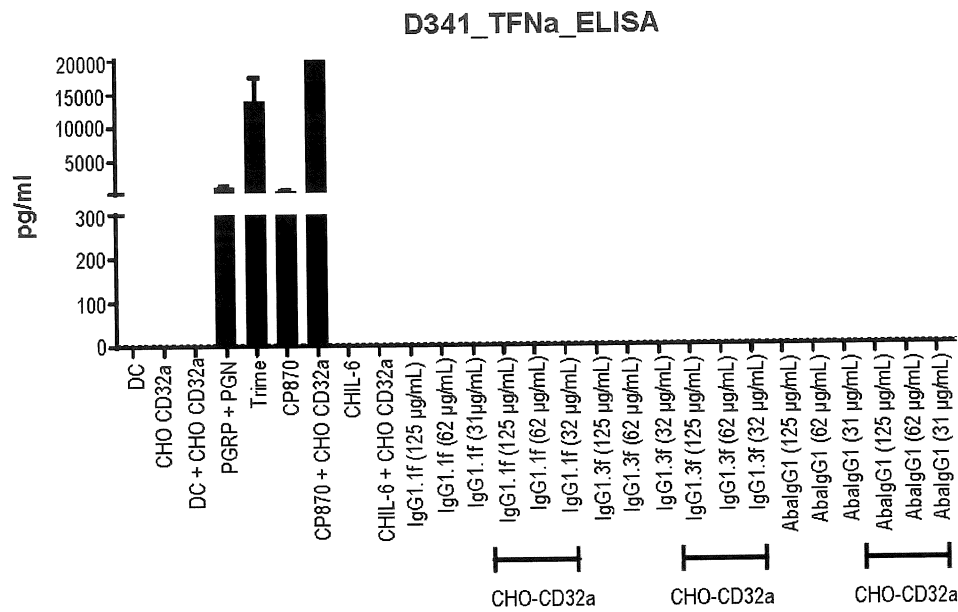
19/29

FIG. 11E



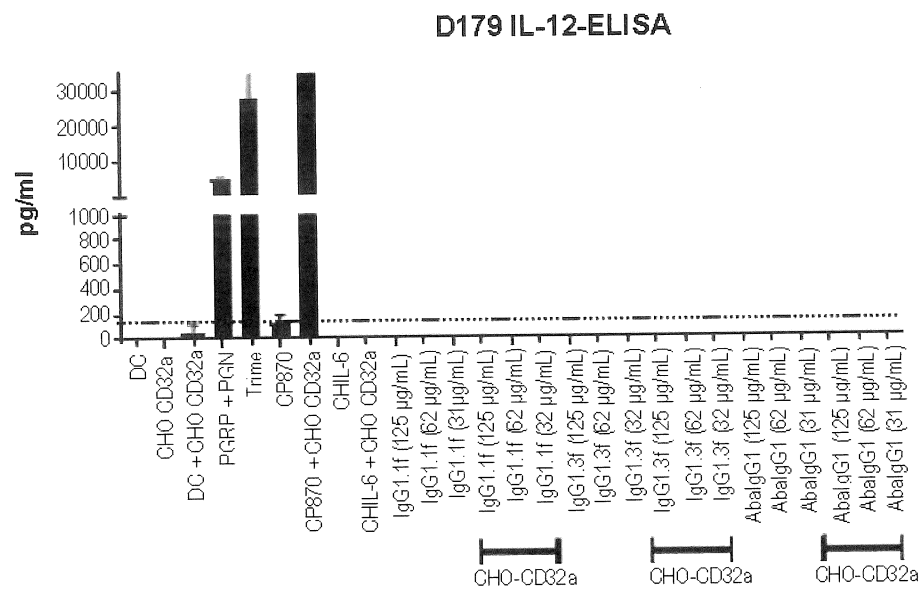
20/29

FIG. 11F



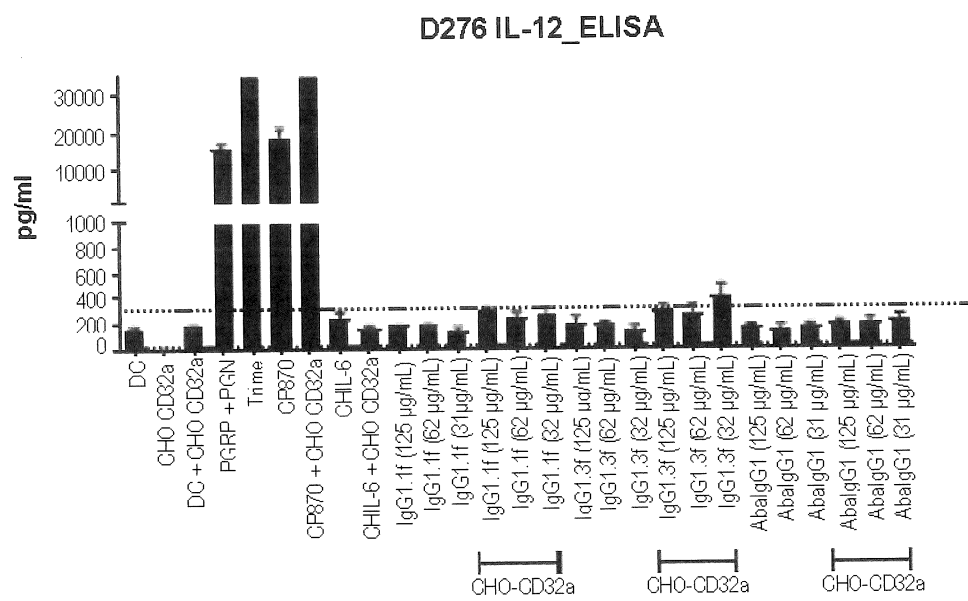
21/29

FIG. 11G



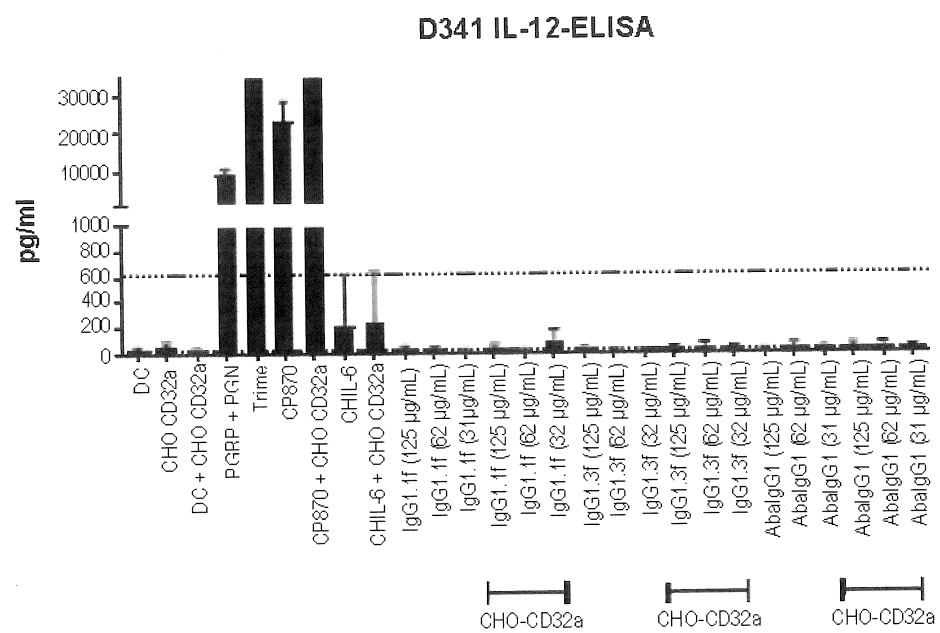
22/29

FIG. 11H



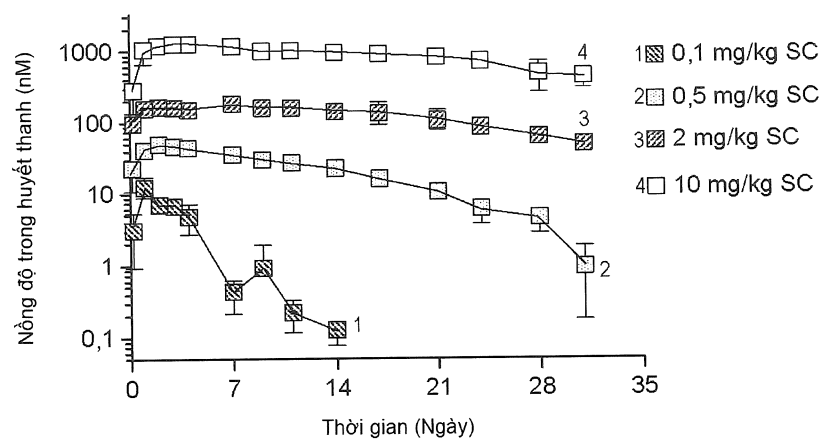
23/29

FIG. 11I



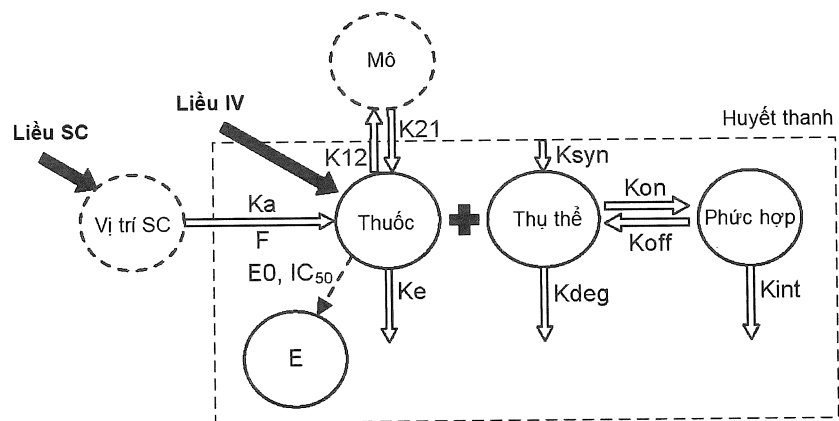
24/29

FIG. 12

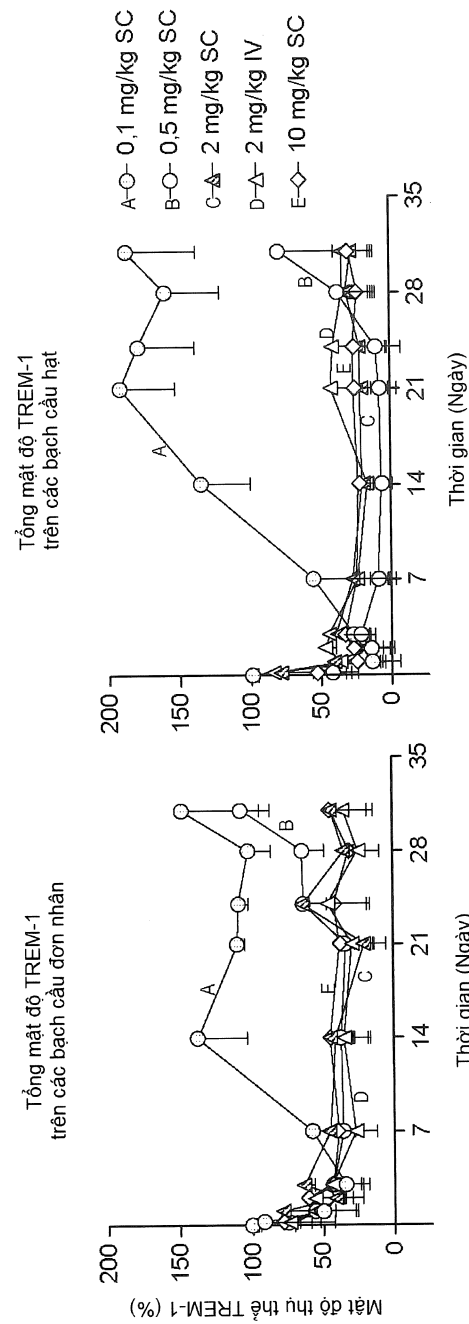


25/29

FIG. 13



26/29



27/29

- A-O- 0,1 mg/kg SC
 B-O- 0,5 mg/kg SC
 C-Δ- 2 mg/kg SC
 D-Δ- 2 mg/kg IV
 E-◇- 10 mg/kg SC

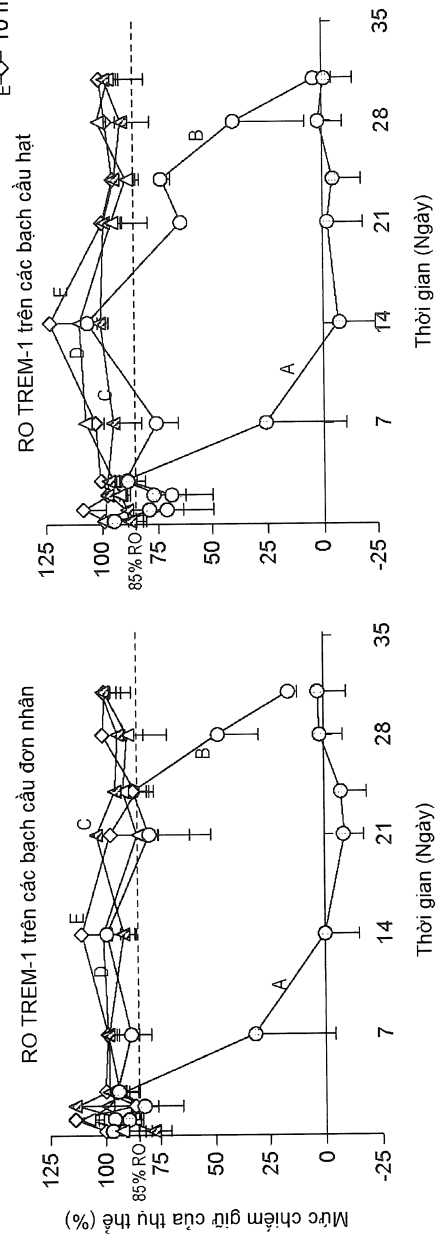
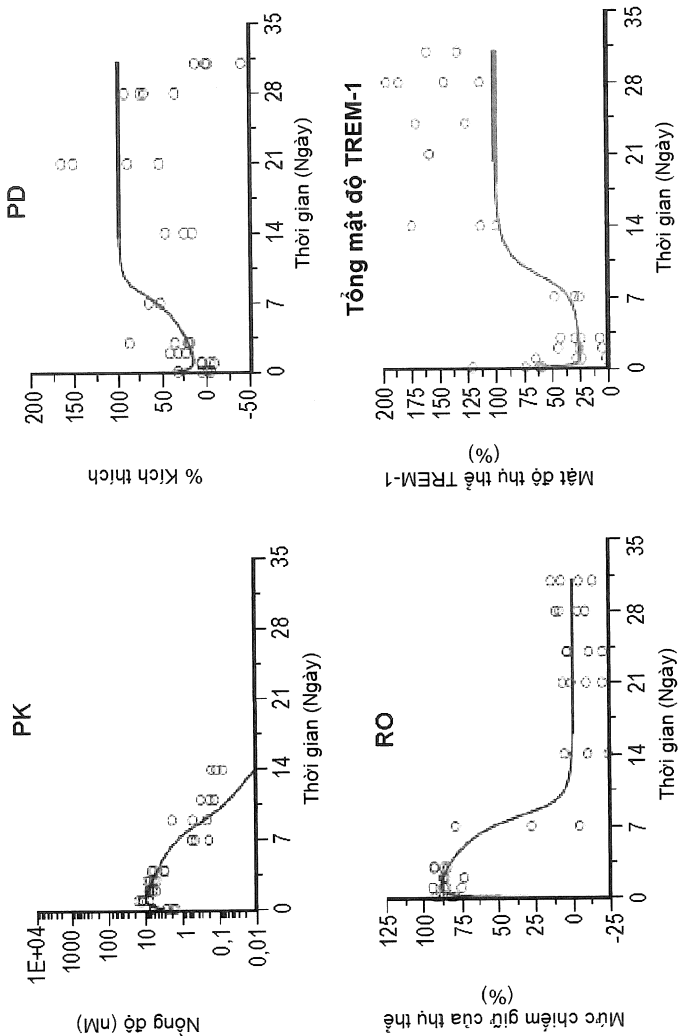


FIG. 15B

FIG. 15A

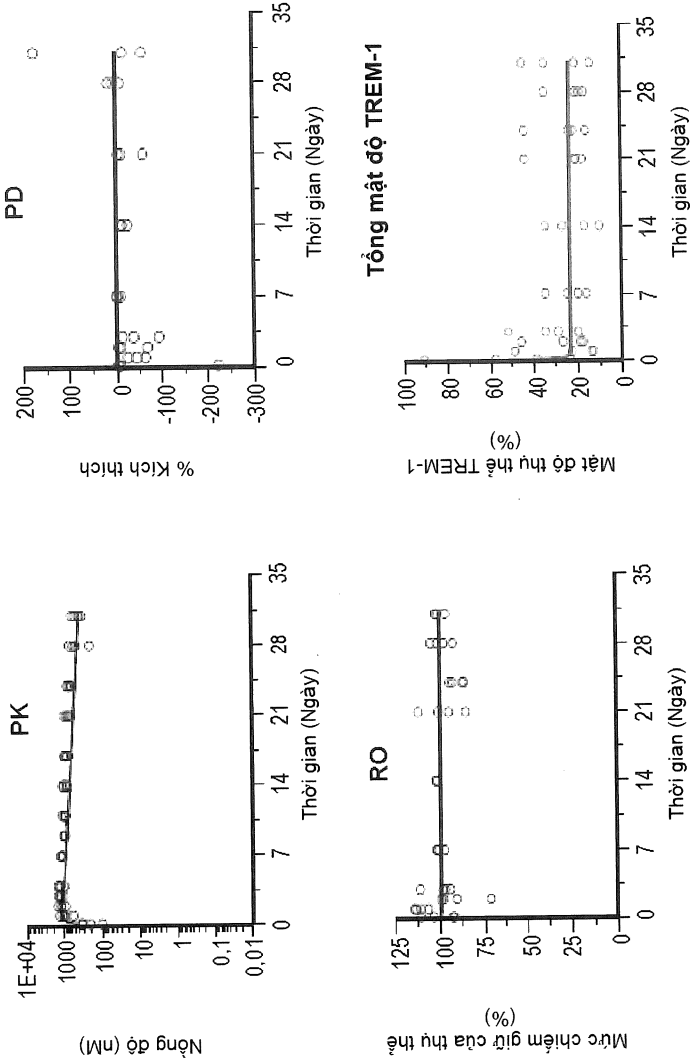
28/29

FIG. 16A



29/29

FIG. 16B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT MỘT CÁCH ĐẶC HIỆU VỚI THỤ THỂ KÍCH HOẠT ĐƯỢC BIỂU HIỆN TRÊN CÁC TẾ BÀO TÙY 1 (TREM-1), VÀ PHÂN TỬ ĐẶC HIỆU KÉP, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH, CHẾ PHẨM, VÀ KIT CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 3338.0920002/ELE/C-K/DKC

<140> US 16/371,964

<141> 2019-04-01

<150> US 62/651,605

<151> 2018-04-02

<160> 85

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 234

<212> PRT

<213> người hiện đại

<400> 1

Met	Arg	Lys	Thr	Arg	Leu	Trp	Gly	Leu	Leu	Trp	Met	Leu	Phe	Val	Ser
1				5				10						15	

Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Lys	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Leu	Lys
			20					25					30		

Glu	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Val	Lys	Cys	Asp	Tyr	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe
		35					40					45			

Ala	Ser	Ser	Gln	Lys	Ala	Trp	Gln	Ile	Ile	Arg	Asp	Gly	Glu	Met	Pro
	50					55				60					

Lys	Thr	Leu	Ala	Cys	Thr	Glu	Arg	Pro	Ser	Lys	Asn	Ser	His	Pro	Val
65					70					75				80	

Gln	Val	Gly	Arg	Ile	Ile	Leu	Glu	Asp	Tyr	His	Asp	His	Gly	Leu	Leu
				85					90					95	

Arg	Val	Arg	Met	Val	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr	Gln
			100					105					110		

Cys	Val	Ile	Tyr	Gln	Pro	Pro	Lys	Glu	Pro	His	Met	Leu	Phe	Asp	Arg
		115					120					125			

Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
 130 135 140

Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
 145 150 155 160

Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
 165 170 175

Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu
 180 185 190

Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile
 195 200 205

Leu Leu Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu
 210 215 220

Phe Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Val Pro
 225 230

<210> 2
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> người hiện đại

<400> 2

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
 1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
 20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
 35 40 45

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
 50 55 60

Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
 65 70 75 80

Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
85 90 95

Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
100 105 110

Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
115 120 125

Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn
130 135 140

Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys
145 150 155 160

Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro
165 170 175

Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu
180 185 190

Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Tyr Ser Phe Gln Val Pro Gly Pro
195 200 205

Leu Val Trp Thr Leu Ser Pro Leu Phe Pro Ser Leu Cys Ala Glu Arg
210 215 220

Met
225

<210> 3
<211> 150
<212> PRT
<213> người hiện đại

<400> 3

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe
35 40 45

Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro
50 55 60

Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val
65 70 75 80

Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu
85 90 95

Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln
100 105 110

Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg
115 120 125

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

Ser Trp Leu Val Asp Ser
145 150

<210> 4
<211> 3333
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 4
gtgcaacttt ccgaagcctc taggtcattg tgggtgccttg tagctgtccc gggagccctc 60
agcagcagtt ggagctggtg cacaggaagg atgaggaaga ccaggctctg ggggctgctg 120
tggatgctct ttgtctcaga actccgagct gcaactaaat taactgagga aaagtatgaa 180
ctgaaagagg ggcagaccct ggatgtgaaa tgtgactaca cgctagagaa gtttgccagc 240
agccagaaaag cttggcagat aataagggac ggagagatgc ccaagaccct ggcattgcaca 300
gagaggcctt caaagaattc ccatccagtc caagtgggga ggatcatact agaagactac 360
catgatcatg gtttactgcg cgtccgaatg gtcaaccttc aagtggaaga ttctggactg 420
tatcagtgtg tgatctacca gcctcccaag gagcctcaca tgctgttcga tcgcatccgc 480
ttggtggtga ccaagggttt ttcagggacc cctggctcca atgagaattc taccagaat 540
gtgtataaga ttcctoctac caccactaag gccttggtgcc cactctatac cagccccaga 600
actgtgaccc aagctccacc caagtcaact gccgatgtct ccactcctga ctctgaaatc 660

aaccttacaa atgtgacaga tatcatcagg gttccggtgt tcaacattgt cattctcctg	720
gctggtggat tcctgagtaa gagcctggtc ttctctgtcc tgtttgctgt cacgctgagg	780
tcatttgtac cctaggccca cgaaccacg agaatgtcct ctgacttcca gccacatcca	840
tctggcagtt gtgccaaagg aggagggagg aggtaaaagg cagggagtta ataacatgaa	900
ttaaatctgt aatcacccgc tatttctaaa gtcagcgtct caccttcctg cccactgccc	960
tcgttcctct aataatcttg ggtgggcatt tgtgcctcag aaaagaagtt acagcccaa	1020
acatgcttgg tccttcattc caccagccac ttggggttgg catgaaatac agacagctca	1080
atgcttttca ccgtaattct cttgtggggg ctgtgacatg cagaaggcac acctgatact	1140
tctcctgctc agttttgccc tggaccatac aattttggcc tgacctggac agagctccca	1200
ctacagaagc atcctgctcg ccccatgctg ggacttcctc tttctagcat cagacacttg	1260
ggtttcatgc ttatgtgtgg ttctttccaa cactcccaga aaaggggtgt gaagattgtg	1320
gaacctggag aaataagaca tcgtggtgag aaagtgcac cttctcagag aaaagagtta	1380
aactgagtat cttcttcttg ggaaatactg gcaggccgag atgggatcca taggagagca	1440
acaacagacc atgtcagaca tcctgtgtgc atttatcgct ggatcctgaa aatagccccg	1500
tgaaggcaga aatgtatgtg actagaacga ggccacatga ataagccact gccactggc	1560
aggagtgaaa actgaagcgc tccttacctg aaggacccca aaaccatata gaatagaata	1620
accaggagtt ccgcctgtgt ctaaatgcct cttttcctgt atcacacaag ggtcagggat	1680
ggtggagtaa aagctctccc cctgggaggc ttctggaggc tgtcccatg tgcttgccca	1740
gttccccact ctgccctcct cctcttctct cagtctgtc ctggaacacc tgccctcagtt	1800
tccatgctct ctccagtgcc ctccccggtg aagcaggtag gtgttcaggc caccacagag	1860
acaatctctg tgggagattg tcttgcaatc tcccacagat ttcaatcagg attttgttat	1920
ttcctacttt gagctttaaa gggaaatggg cctcatgggt ggggaaagga tgggtgggtcc	1980
ttccagccca atttagtgt gcccagggca gatattatcc tcagttccca agagcaatca	2040
tacttttcca cacataccgt gtgtctcatg ttaggtaaat gtatttttac aatgagcacc	2100
acttctgtgg aaaaagttcc ctgcacgggg aggtccagct tccagactgc tccatcgcat	2160
aaggacttcc ccattcccct aaatgctgct ctgtcagaac ctgcccaggc aatggtaatg	2220
accctagaga gatgatttct gaaccgcaat tttagccca ttagaagggtg tgtggtgggc	2280
atttatttca tcctgatgct ctggtgagaa tctttgcaga cgcactagat ccagaagctg	2340

ttaatcttgg tgcatttatt ttctaccta aaagaaccaa gcagctcaga ggcagtgact 2400
 gtacaggatg cagtgtttat aataatgctg agcttgctgg tctggaaccc cacacttttag 2460
 caatcccagc attgttcctg tttatgaagt tgacaaagtg accagggcaa gggggtatta 2520
 tcattaaata cactctagga gaggcagaac acatgagggc aatgtttttc agaggtcttt 2580
 aggccaccgc atcagattct cctggagcat aaagcaaagt ctttatgagt ccagggcccc 2640
 tgcagaccta ctgtatacta gtatacagct ccctcttagt ggatctcaag cttgtttcca 2700
 aaaagtcatt acactcctta ccaaagccca tgacacattc atacagattc atccagacat 2760
 aaccactgc atggtccagt gcatgcttgt gtgcttaact tattatagat caagtgttat 2820
 ttaagtccaa catattaaac gtgactgaaa tattatatgc actaaatcgg aagacaaatg 2880
 gccgtgctgg atactctccc atttgcaatt acaggccacg ccatgctcca tcctccccat 2940
 cctgcctggg aacctgacca atgtggctaa accagcaggc tccctggctg ccagcttctg 3000
 gctggttgag ccaatgggaa gcatgagagg agagccgagg gtggggagac agtcagatca 3060
 gggtttctgt cctcagggt cctccctgg caggtggtgg caggagtggc tgcattcccc 3120
 totgaaggct ctttcaagcc tctcagcaaa cagctcccat ctccaagtcc agccacctgt 3180
 tccatcctct cctctgtagg ccagcagtg ggaatgaccc accactattg ccagcctcag 3240
 catactgaag cacccttac tggattccct aaattctatg cacatgttta ttaaatgctc 3300
 ctcaattacc cagttaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3333

<210> 5
 <211> 2102
 <212> ADN
 <213> người hiện đại

<400> 5
 attgtggtgc cttgtagctg tcccgggagc cctcagcagc agttggagct ggtgcacagg 60
 aaggatgagg aagaccaggc tctgggggct gctgtggatg ctctttgtct cagaactcgc 120
 agctgcaact aaattaactg aggaaaagta tgaactgaaa gaggggcaga ccctggatgt 180
 gaaatgtgac tacacgctag agaagtttgc cagcagccag aaagcttggc agataataag 240
 ggacggagag atgcccaga cctggcatg cacagagagg cttcaaaga attcccatcc 300
 agtccaagtg gggaggatca tactagaaga ctacatgat catggtttac tgcgcgtccg 360
 aatggtaac cttcaagtgg aagattctgg actgtatcag tgtgtgatct accagcctcc 420
 caaggagcct cacatgctgt tcgatcgcat ccgcttggtg gtgaccaagg gtttttcagg 480

gacccctggc tccaatgaga attctacca gaatgtgat aagattcctc ctaccaccac	540
taaggccttg tgcccactct ataccagccc cagaactgtg acccaagctc caccoaagtc	600
aactgccgat gtctccactc ctgactctga aatcaacctt acaaagtga cagatatcat	660
caggtatagt ttccaggtec ctggggccct ggtttgaca ctgagccctt tgtttcccag	720
tctgtgtgct gagaggatgt gaaagtgagg gaaaggggag ggtggggcag gagaagactt	780
gagtcacatt agtctgggta gaaatgtcca ggggaagaag gaagtgggtga tggagaatag	840
gggaggctct cagccaggct gtccttctcc ccagttcacc ttctttgttt ccttgcaacc	900
tgagtattaa agagagggaa atggcatctt cccaagttc cagtggagct catccaaccc	960
caggggcctg atgggcagtg ggaaagcact ctgagtgagg ggccctggat ctagtgttgg	1020
cctgactaac tgaatgtgac tttgggtgag tcaggaaccc tctctggctt tagcttcttt	1080
gacaattcag taggcatggt agaaacccaa agctggaaga cattgtccac ctaataactc	1140
tcagcaggag ctggagctgg ggctaaatgc agtattgggt tttgccttat tgttttttaa	1200
ataacattgt tgcattgtcc caattataga taaatagaat cagaattttt gcagatgagg	1260
tccctctcag tatttttaat aagatgttta ggagatttct aatgtgtagg caaacttaag	1320
aaccactaac ttagcaattt cacacctctt tacagtattt aaatgttgat ttatattaga	1380
atgtgtttat cattaaatac tgaattatca ggatggaaat acttttccac atcaccacta	1440
gtctaacatg tcttttttct catattctct tctagtcttt attcatgttt atacatat	1500
taatatggca gtaagtctaa ttatacatgt ttttattctt ttccttgctg aaattattct	1560
ttgatgctgc tacctaaatt tcataaatat aatttcaatg agtgcattt tttctatcaa	1620
ttgggaaagc cataacttac ataaccattg gcctgttctt agacattgat atagtgttga	1680
taactctgag ataaacatat tcttgcatat atatttttct tcttttaa	1740
aaatttccat gagataattt aaacactgat atcattttgt atacaaatag catctaccaa	1800
tggtcttcca aaagattgga aacaatttgc agtgtgatcc attaagcata aataaagcag	1860
tgatcatggc ggcttacaga cacggattta gtctttttaa tcattaaata gtgtgagtta	1920
aatcacattc ctgctaaaac aaatgtgaac tgggtgcctgc tctaatttct ctatgagtgt	1980
agactccacc tccatatggg tagtggcagt gcctttttcc ccattatgtt gtttggggaa	2040
caaagtgctc attaaacttc tgtggaataa atcaaacgaa tgatcaaaaa aaaaaaaaaa	2100
aa	2102

<210> 6
 <211> 3140
 <212> ADN
 <213> người hiện đại

<400> 6
 gtgcaacttt ccgaagcctc taggtcattg tggcgccttg tagctgtccc gggagccctc 60
 agcagcagtt ggagctgggtg cacaggaagg atgaggaaga ccaggctctg ggggctgctg 120
 tggatgctct ttgtctcaga actccgagct gcaactaaat taactgagga aaagtatgaa 180
 ctgaaagagg ggcagaccct ggatgtgaaa tgtgactaca cgctagagaa gtttgccagc 240
 agccagaaaag cttggcagat aataagggac ggagagatgc ccaagaccct ggcatgcaca 300
 gagaggcctt caaagaattc ccatccagtc caagtgggga ggatcatact agaagactac 360
 catgatcatg gtttactgcg cgtccgaatg gtcaaccttc aagtggaaga ttctggactg 420
 tatcagtgtg tgatctacca gcctcccaag gagcctcaca tgctgttcga tcgcatccgc 480
 ttgggtggtga ccaagggggt ccggtgttca acattgtcat tctcctggct ggtggattcc 540
 tgagtaagag cctggctcttc tctgtcctgt ttgctgtcac gctgaggtca tttgtaccct 600
 aggcccacga acccacgaga atgtcctctg acttccagcc acatccatct ggcagttgtg 660
 ccaagggagg agggaggagg taaaaggcag ggagttaata acatgaatta aatctgtaat 720
 cacggctat ttctaaagtc agcgtctcac cttcctgccc actgccctcg ttctctaat 780
 aatcttgggt gggcatttgt gcctcagaaa agaagttaca gcccacaaaca tgcttgggtcc 840
 ttcattccac cagccacttg gggttggcat gaaatacaga cagctcaatg cttttcacccg 900
 taattctctt gtgggggctg tgacatgcag aaggcacacc tgatacttct cctgctcagt 960
 tttgccctgg accatacaat tttggcctga cctggacaga gctcccacta cagaagcatc 1020
 ctgctcgccc catgctggga cttcctcttt ctagcatcag acacttgggt ttcatgctta 1080
 tgtgtggttc tttccaacac tcccagaaaa ggggtgtgaa gattgtggaa cctggagaaa 1140
 taagacatcg tggtgagaaa gtgcacacct ctcagagaaa agagttaaac tgagtatctt 1200
 cttctgggga aatactggca ggccgagatg ggatccatag gagagcaaca acagaccatg 1260
 tcagacatcc tgtgtgcatt tatcgctgga tcctgaaaat agccccgtga aggcagaaat 1320
 gtatgtgact agaacgaggc cacatgaata agccactgcc cactggcagg agtgaaaact 1380
 gaagcgctcc ttacctgaag gacccccaaa ccatatagaa tagaataacc aggagttccg 1440
 cctgtgtcta aatgcctctt ttctgtatc acacaagggc cagggatggg ggagtaaaag 1500
 ctctccccct gggaggcttc tggaggctgt ccccatgtgc ttgcctagtt cccactctg 1560

ccctcctcct cttctctcag tctgctcctg gaacacctgc ctcagtttcc atgctctctc	1620
cagtgccctc cccggtgaag caggtagggtg ttcaggccac cacagagaca atctctgtgg	1680
gagattgtct tgcaatctcc cacagatttc aatcaggatt ttgttatttc ctactttgag	1740
ctttaaaggg aaatgggcct catgggtggg gaaaggatgg tgggtccttc cagcccaatt	1800
tagtgatgcc cagggcagat attatcctca gttcccaaga gcaatcatac tttccacac	1860
ataccgtgtg tctcatgtta ggtaaagtga tttttacaat gagcaccact tctgtggaaa	1920
aagttccctg cacggggagg tccagcttcc agactgctcc atcgcataag gacttcccca	1980
ttcccctaaa tgctgctctg tcagaacctg cccaggtaat ggtaatgacc ctagagagat	2040
gatttctgaa ccgcaatttt gagcccatta gaagggtgtg ggtgggcatt tatttcatcc	2100
tgatgctctg gtgagaatct ttgcagacgc actagatcca gaagctgtta atcttgggtc	2160
atattatttc ctacctaaaa gaaccaagca gctcagaggc agtgactgta caggatgcag	2220
tgtttataat aatgctgagc ttgctgggtct ggaacccac actttagcaa tcccagcatt	2280
gttcctgttt atgaagttga caaagtgacc agggcaaggg ggtattatca ttaaatacac	2340
tctaggagag gcagaacaca tgagggaat gtttttcaga ggtctttagg ccaccgcatc	2400
agattctcct ggagcataaa gcaaagtctt tatgagtcca gggcccctgc agacctactg	2460
tatactagta tacagctccc tcttagtgga tctcaagctt gtttccaaaa agtcattaca	2520
ctccttacca aagcccatga cacattcata cagattcatc cagacataac ccactgcatg	2580
gtccagtgca tgcttgtgtg cttaacttat tatagatcaa gtgttattta agtccaacat	2640
attaaacgtg actgaaatat tatatgcact aaatcggaag acaaattggcc gtgctggata	2700
ctctcccatt tgcacttaca ggccacgcca tgctccatcc tccccatcct gcctgggaac	2760
ctgaccaatg tggctaaacc agcaggctcc ctggctgcca gcttctggct ggttgagcca	2820
atgggaagca tgagaggaga gccgaggggtg gggagacagt cagatcaggg tttctgtcct	2880
cagggctccc tccctggcag gtgggtggcag gagtggctgc attcccctct gaaggctcct	2940
tcaagcctct cagcaaacag ctcccatctc caagtccagc cacctgttcc atcctctcct	3000
ctgtaggccc agcagtggga atgaccacc actattgcca gcctcagcat actgaagcac	3060
cccttactgg attccctaaa ttctatgcac atgtttatta aatgctcctc aattaccag	3120
ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3140

<210> 7

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 7

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
 1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Thr Thr Glu Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Tyr Lys
 20 25 30

Glu Gly Gln Thr Leu Glu Val Lys Cys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Tyr
 35 40 45

Ala Asn Ser Arg Lys Ala Trp Gln Lys Met Glu Gly Lys Met Pro Lys
 50 55 60

Ile Leu Ala Lys Thr Glu Arg Pro Ser Glu Asn Ser His Pro Val Gln
 65 70 75 80

Val Gly Arg Ile Thr Leu Glu Asp Tyr Pro Asp His Gly Leu Leu Gln
 85 90 95

Val Gln Met Thr Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys
 100 105 110

Val Ile Tyr Gln His Pro Lys Glu Ser His Val Leu Phe Asn Pro Ile
 115 120 125

Cys Leu Val Val Thr Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Gly Ser Ser Glu
 130 135 140

Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Arg Thr Pro Ser Thr Thr Ala Lys Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Pro Arg Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro Pro
 165 170 175

Glu Ser Thr Val Val Val Ser Thr Pro Gly Ser Glu Ile Asn Leu Thr
 180 185 190

Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile Ile
 195 200 205

Val Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu Phe
 210 215 220

Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Gly Pro
 225 230

<210> 8
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> người hiện đại

<400> 8

Met Ser Arg Arg Ser Met Leu Leu Ala Trp Ala Leu Pro Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ala Ala Gln Glu Thr Glu Asp Pro Ala Cys Cys Ser Pro
 20 25 30

Ile Val Pro Arg Asn Glu Trp Lys Ala Leu Ala Ser Glu Cys Ala Gln
 35 40 45

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

Ser Ser Cys Asn Thr Pro Ala Ser Cys Gln Gln Gln Ala Arg Asn Val
 65 70 75 80

Gln His Tyr His Met Lys Thr Leu Gly Trp Cys Asp Val Gly Tyr Asn
 85 90 95

Phe Leu Ile Gly Glu Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Arg Gly Trp Asn
 100 105 110

Phe Thr Gly Ala His Ser Gly His Leu Trp Asn Pro Met Ser Ile Gly
 115 120 125

Ile Ser Phe Met Gly Asn Tyr Met Asp Arg Val Pro Thr Pro Gln Ala
 130 135 140

Ile Arg Ala Ala Gln Gly Leu Leu Ala Cys Gly Val Ala Gln Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Asn Tyr Val Leu Lys Gly His Arg Asp Val Gln Arg Thr

165 170 175
 Leu Ser Pro Gly Asn Gln Leu Tyr His Leu Ile Gln Asn Trp Pro His
 180 185 190
 Tyr Arg Ser Pro
 195
 <210> 9
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> người hiện đại
 <400> 9
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 327

<212> PRT

<213> người hiện đại

<400> 10

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
245	250	255

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1-Aba

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser

100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	165	170
		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
	180	185
		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	195	200
		205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
		240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250
		255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265
		270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280
		285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
		320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330

<210> 12
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng hằng định của chuỗi nặng IgG4-Aba

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> người hiện đại
 <400> 13
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mAb 0318 VH

<400> 14

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mAb 0318 VL

<400> 15

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

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

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

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

180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 16
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 0318-IgG1.3f VH
 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 17
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.3f VL

<400> 17

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.1f VH

<400> 18

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala

50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 19
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> 0318-IgG1.1f VL

 <400> 19
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1-Aba VH

<400> 20

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1-Aba VL

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe

```

                20                25                30

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35                40                45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
      50                55                60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
      85                90                95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                105                110

<210>  22
<211> 121
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  0318-IgG4-Aba VH

<400>  22

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
      50                55                60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      85                90                95

```

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG4-Aba VL

<400> 23

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f VH CDR1

<400> 24

Thr Tyr Ala Met His

1

5

<210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f VH CDR2

<400> 25

Arg	Ile	Arg	Thr	Lys	Ser	Ser	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Ser
1				5				10						15	

Val Lys Gly

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f VH CDR3

<400> 26

Asp	Met	Gly	Ile	Arg	Arg	Gln	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f VL CDR1

<400> 27

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Thr	Phe	Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	His
1				5					10					15

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f VL CDR2

<400> 28

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.3f VL CDR3

<400> 29

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.1f VH CDR1

<400> 30

Thr Tyr Ala Met His
1 5

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.1f VH CDR2

<400> 31

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG1.1f VH CDR3

<400> 32

Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG1.1f VL CDR1

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe Asp Tyr Ser Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG1.1f VL CDR2

<400> 34

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG1.1f VL CDR3

<400> 35

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba VH CDR1

<400> 36

Thr Tyr Ala Met His
1 5

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba VH CDR2

<400> 37

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba VH CDR3

<400> 38

Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba VL CDR1

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe Asp Tyr Ser Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba VL CDR2

<400> 40

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba VL CDR3

<400> 41

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG4-Aba VH CDR1

<400> 42

Thr Tyr Ala Met His
1 5

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG4-Aba VH CDR2

<400> 43

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG4-Aba VH CDR3

<400> 44

Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG4-Aba VL CDR1

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe Asp Tyr Ser Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG4-Aba VL CDR2

<400> 46

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG4-Aba VL CDR3

<400> 47

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 48

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LSPGK (Đầu tận cùng C của chuỗi nặng)

<400> 48

Leu Ser Pro Gly Lys
 1 5

<210> 49
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LSPG (Đầu tận cùng C của chuỗi nặng)

<400> 49

Leu Ser Pro Gly
 1

<210> 50
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f HC

<400> 50

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

35

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
 225 230 235 240
 Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

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

<210> 52
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba HC

<400> 52

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys

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

Pro Gly Lys
450

<210> 53
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG4-Aba HC

<400> 53

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

41

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 54
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f LC

<400> 54

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 55
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 0318-IgG1.1f LC
 <400> 55
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 56

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1-Aba LC

<400> 56

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 57
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0318-IgG4-Aba LC

<400> 57

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

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

Asp Tyr Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 58
<211> 1407
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.3f HC

<400> 58

```

atgagggcctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc ggccttggc cgaagtgcag      60
ctcgtggagt ccggcggagg actgggtccaa cctggcggct ccctgaagct gtcctgcgct      120
gcctccggct tcaccttctc cacctacgcc atgcactggg tcaggcaggc ctccggaaaag      180
ggcctggaat gggtcggccg gattaggacc aagtccagca actacgctac ctactacgcc      240
gccagcgtca agggccggtt cacaatctcc cgggacgact ccaagaacac cgcctatctc      300
cagatgaaca gcctgaagac agaggacacc gccgtgtact attgcacccg ggatatgggc      360
attcggaggc agttcgcta ttggggccag ggcacctgg tgacagtcag ctccgccagc      420
acaaaaggac ctagcgtgtt cccctggcc cctagcagca agtcacaaag cggcggcacc      480
gctgcctgg gctgtctggt gaaagactac tttcccgagc ccgtgacagt gagctggaac      540
tctggcgccc tgacatccg agtgcacacc ttccctgccg tgctccagtc cageggcctg      600
tacagcctga gcagcgtcgt gaccgtccct agcagcagcc tgggaacca gacctacatc      660
tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aagggtggaca agagggtgga gccaagtcc      720
tgtgacaaga ccatacctg cccccctgt cctgctcctg aagctgaggg cgcctctcc      780
gtcttctctgt tccctcctaa gcccaaggac accctgatga tctccaggac ccccgaggtg      840
acctgtgtgg tgggtgatgt gtcccacgag gaccccgagg tgaagttcaa ttggtacgtc      900
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aaaccccggg aggagcagta taacagcacc      960
taccgggtgg tgtccgtgct caccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac     1020
aagtgtaaagg tcagcaataa ggccctgcct gcccctatcg agaagaccat tagcaaggct     1080
aagggccagc ccaggaacc ccaggtgtat accctcccc ctagccggga ggagatgacc     1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtg aaaggattct accctagcga catcgctgtg     1200
gagtgggaga gcaatggaca gcccgagaac aactacaaaa ccaccctcc cgtcctggac     1260
tccgatggca gcttctttct gtactccaag ctaccgctcg acaagagccg gtggcagcag     1320
ggcaatgtgt ttagctgctc cgtgatgcac gaggtctctgc acaaccacta taccctaaaag     1380
tccctgtccc tcagccccgg caagtga                                           1407

```

<210> 59

<211> 1404

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.1f HC

<400> 59

```

atgagggcctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc cgaagtgcag      60
ctgggtggaaa gcggcgagg actggtgcag ccaggcgga gcctgaagct gtcttgcgcc      120
gccagcggt tcaccttcag cacctacgcc atgcactggg tccgccaggc cagcggcaag      180
ggcctggaat gggtcggacg gatccggacc aagagcagca actacgccac ctactacgcc      240
gcctccgtga agggccggtt caccatcagc cgggacgaca gcaagaacac cgcctacctg      300
cagatgaaca gcctgaaaac cgaggacacc gccgtgtact actgcacccg ggacatgggc      360
atccggcggc agtttgccta ctggggccag ggcaccctgg tcacagtgtc cagcgcgtcg      420
accaagggcc catcggctctt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca      480
gcggccctgg gctgcctggc caaggactac tccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccgctg tctacagtc ctcaggactc      600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc      660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaattc      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagccgaagg ggccccgtca      780
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc      840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca agcagcatcg agaaaaccat ctccaagcc      1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc      1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      1260
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag      1380
agcctctccc tgtccccggg ttga      1404

```

<210> 60

<211> 1407
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1-Aba HC

<400> 60
 atgagggctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc ggccttggc cgaggccag 60
 ctgggtggaga gcgaggagg actcgtgcag cctggaggat ccctgaagct gtcctgcgct 120
 gcctccggct ttaccttctc cacctacgcc atgcattggg tgaggcaggc ctccggcaag 180
 ggcctggaat ggggtggcag gatcaggaca aagagctcca actacgccac ctactacgcc 240
 gccagcgtga aaggacggtt caccatctcc cgggacgatt ccaaaaacac cgcctacctc 300
 cagatgaata gcctgaagac cgaggacacc gccgtctact actgcaccag ggatatgggc 360
 atccggcggc agtttgccta ctggggccag ggcacctgg tgacagtgtc cagcgctagc 420
 accaaaggcc cctccgtgtt ccccctggct ccctccagca agtccacatc cggcggaacc 480
 gccgctctgg gatgtctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gagctggaac 540
 tctggcgctc tgacctccg cgtgcacacc ttctctgtg tgctgcagtc ctccggcctc 600
 tacagcctgt cctccgtcgt gacagtgcc tcctccagcc tgggcaccca gacctacatc 660
 tgcaacgtga accacaagcc ttccaacacc aagggtggata agcgggtcga acccaagagc 720
 tgcgacaaga cccacaccag ccccccttc cctgtctccg agctcctggg aggcagctcc 780
 gtgtttctgt tccccccaa gcctaaggac accctgatga tcagcaggac cccgaagtg 840
 acatgcgtgg tggctgacgt gtcccacgag gaccccgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gatggagtgg aggtccataa tgccaagacc aagccccggg aggagcagta caattccacc 960
 taccgggtgg tgtccgtgct gacagtcctg catcaggact ggctcaacgg caaggagtac 1020
 aaatgcaagg tgtccaacaa ggctctgccc gccccatcg agaagacaat cagcaaggct 1080
 aagggccagc ctagggagcc ccaggtgtac accctgcccc cttccaggga cgagctcacc 1140
 aagaaccagg tgtccctgac atgcctcgtg aagggtttt accctagcga catcgctgtg 1200
 gagtgggagt ccaacggaca gcccgagaac aactacaaga caacaccccc tgtgctggac 1260
 tccgacggct cttcttctc gtacagcaag ctcaccgtgg acaaattccc gtggcagcag 1320
 ggaaacgtgt tcagctgtc cgtgatgcat gaggccctgc acaaccatta caccagaaa 1380
 tccctgtccc tgtcccccg caagtga 1407

<210> 61
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG4-Aba HC

<400> 61
 atgagggcctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc ggccttggc cgaggtccag 60
 ctggctcgaga gcggcggagg actggtccag cctggaggat ccctgaagct ctctgtgcc 120
 gctagcggat ttaccttcag cacctacgct atgcattggg tgaggcaggc ttccggcaag 180
 ggactggagt ggggtgggacg gattcggacc aagagctcca attacgccac ctattacgcc 240
 gcttccgtga agggccggtt caccatctcc agggacgact ccaagaacac cgcttacctg 300
 cagatgaact ccctcaagac cgaggacacc gccgtgtatt actgcacccg ggacatgggc 360
 atccggaggc agttcgctta ttggggacag ggcaccctgg tgaccgtgag ctccgcctcc 420
 accaagggcc cttccgtgtt ccctctggcc ccctgtagca ggtccaccag cgagtccaca 480
 gctgctctgg gctgtctggt gaaggattat ttccccgagc ccgtgacagt gtcctggaat 540
 agcggcgccc tgacctccg cgtgcatacc ttccctgccg tcctgcaaag cagcggcctg 600
 tacagcctgt cctccgtggt gacagtccct tcctccagcc tgggaaccaa gacctacacc 660
 tgcaatgtgg accacaagcc tagcaacacc aaggtggaca agagggtcga gcccaagtcc 720
 tgcgataaga cacacacctc ccctccttcc cctgtctctg agctgctcgg cggaagcagc 780
 gtgttctctgt tccctcctaa gcctaaggac accctgatga tcagccggac ccctgaggtg 840
 acctgtgtcg tgggtggacgt gtcccacgaa gaccccgagg tgaaattcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgctc aggtgcacaa cgctaagaca aaaccaggg aggagcagta caattccacc 960
 taccgggtcg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac 1020
 aagtgtgaagg tcagcaataa ggccctgcct gccccattg agaagaccat ttccaaggcc 1080
 aagggccagc ccagggaacc tcaggtgtac accctgcctc cctcccggga cgagctgacc 1140
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctcgtg aagggttct accctagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggagt ccaacggcca gcctgagaac aattacaaga ccaccccccc tgcctggac 1260
 tccgacggat cttcttctt gtactccaag ctgacagtgg ataagtccc gtggcagcag 1320
 ggaaatgtgt tctcctgctc cgtcatgcac gaagccctgc ataaccacta cacacagaag 1380
 agcctgtccc tgagccctgg caagtga 1407

<210> 62
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.3f LC

<400> 62
 atgagggcctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc cgatatcgtg 60
 ctgaccacaga gccccgatag cctggctgtg agcctgggag agagagccac catcaactgc 120
 agggcctccc agagcgtcga caccttcgac tacagcttcc tccactggta ccagcagaag 180
 cctggccagc cccccaagct gctgatctac agggccagca acctggagag cggagtgtcc 240
 gataggttca gcggcagcgg ctccggaacc gactttaccc tcaccatcag ctccctgcag 300
 gccgaggatg tggccgtcta ctactgccag cagagcaacc aggacccta cacctttggc 360
 cagggcacca agctggagat caagaggacc gtggccgccc cctccgtgtt catcttcctt 420
 cccagcgacg agcagctgaa gagcggaaacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 480
 taccacaggg aggccaaggt gcagtggaag gtcgacaacg ccctgcagag cggcaatagc 540
 caggagagcg tgaccgaaca ggacagcaag gactccacct actccctgag cagcaccctg 600
 accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgtgaggt gaccaccag 660
 ggactgagca gccccgtgac aaagagcttt aacaggggag agtgctga 708

<210> 63
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1.1f LC

<400> 63
 atgagggcctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc cgatatcgtg 60
 ctgaccacaga gccccgatag cctggctgtg agcctgggag agagagccac catcaactgc 120
 agggcctccc agagcgtcga caccttcgac tacagcttcc tccactggta ccagcagaag 180
 cctggccagc cccccaagct gctgatctac agggccagca acctggagag cggagtgtcc 240
 gataggttca gcggcagcgg ctccggaacc gactttaccc tcaccatcag ctccctgcag 300
 gccgaggatg tggccgtcta ctactgccag cagagcaacc aggacccta cacctttggc 360
 cagggcacca agctggagat caagaggacc gtggccgccc cctccgtgtt catcttcctt 420

cccagcgacg agcagctgaa gagcggaacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 480
 taccacaggg aggccaaggt gcagtggaag gtcgacaacg ccctgcagag cggcaatagc 540
 caggagagcg tgaccgaaca ggacagcaag gactccacct actccctgag cagcaccctg 600
 accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgtgaggt gaccaccag 660
 ggactgagca gccccgtgac aaagagcttt aacaggggcg agtgctga 708

<210> 64
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG1-Aba LC

<400> 64
 atgagggctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc cgatatcgtg 60
 ctgaccaga gccccgatag cctggctgtg agcctgggag agagagccac catcaactgc 120
 agggcctccc agagcgtcga caccttcgac tacagcttcc tccactggta ccagcagaag 180
 cctggccagc cccccaagct gctgatctac agggccagca acctggagag cggagtggcc 240
 gataggttca gcggcagcgg ctccggaacc gactttaccc tcaccatcag ctccctgcag 300
 gccgaggatg tggccgtcta ctactgccag cagagcaacc aggacccta cacctttggc 360
 cagggcacca agctggagat caagaggacc gtggccggc cctccgtgtt catcttccct 420
 cccagcgacg agcagctgaa gagcggaacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 480
 taccacaggg aggccaaggt gcagtggaag gtcgacaacg ccctgcagag cggcaatagc 540
 caggagagcg tgaccgaaca ggacagcaag gactccacct actccctgag cagcaccctg 600
 accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgtgaggt gaccaccag 660
 ggactgagca gccccgtgac aaagagcttt aacaggggcg agtgctga 708

<210> 65
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318-IgG4-Aba LC

<400> 65
 atgagggctt ggatcttctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc cgatatcgtg 60

ctgaccacaga gccccgatag cctggctgtg agcctgggag agagagccac catcaactgc 120
 agggcctccc agagcgtcga caccttcgac tacagcttcc tccactggta ccagcagaag 180
 cctggccagc cccccaagct gctgatctac agggccagca acctggagag cggagtgtcc 240
 gatagggtca gcggcagcgg ctccggaacc gactttaccc tcaccatcag ctccctgcag 300
 gccgaggatg tggccgtcta ctactgccag cagagcaacc aggacccta cacctttggc 360
 cagggcacca agctggagat caagaggacc gtggccgccc cctccgtgtt catcttcctt 420
 cccagcgacg agcagctgaa gagcgggaacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc 480
 taccacaggg aggccaaggt gcagtggaag gtcgacaacg ccctgcagag cggcaatagc 540
 caggagagcg tgaccgaaca ggacagcaag gactccacct actccctgag cagcaccctg 600
 accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgtgaggt gaccaccag 660
 ggactgagca gccccgtgac aaagagcttt aacaggggag agtgctga 708

<210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318 Ab - VH CDR1

<400> 66

Thr Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318 Ab - VH CDR2

<400> 67

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 68
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318 Ab - VH CDR3

<400> 68

Asp	Met	Gly	Gln	Arg	Arg	Gln	Phe	Ala	Tyr
1			5						10

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318 Ab - VL CDR1

<400> 69

Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Phe	Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	His
1				5					10					15

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318 Ab - VL CDR2

<400> 70

Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0318 Ab - VL CDR3

<400> 71

Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318 AB - VH CDR3 (thể đột biến)

<400> 72

Asp	Gln	Gly	Ile	Arg	Arg	Gln	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318 AB - VH CDR3 (thể đột biến)

<400> 73

Asp	Leu	Gly	Ile	Arg	Arg	Gln	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318 Ab - VH CDR1 (thể đột biến)

<400> 74

Thr	Tyr	Ala	Gln	His
1			5	

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318 Ab - VH CDR1 (thể đột biến)

<400> 75

Thr	Tyr	Ala	Leu	His
1			5	

<210> 76

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318 Ab - HC (IgG4)

<400> 76

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Leu His Asn Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val
 435 440 445

Ser Leu Gly
 450

<210> 77
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng hằng định của IgG1 WT (Biến thể alotyp)

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 78

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng hằng định của HC IgG1.1f

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 79
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng hằng định của HC IgG1.3f

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 319 Ab - Thẻ đột biến

<400> 82

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Leu Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 320 Ab - Thẻ đột biến

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

65

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 85

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0318-IgG1.3f HC Kdel

<400> 85

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Thr Lys Ser Ser Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Met Gly Ile Arg Arg Gln Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

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

Pro Gly
450