



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C07K 16/28; C12N 15/63; A61K 39/00; (13) B
A61P 35/00



1-0048587

(21) 1-2021-03779 (22) 18/12/2019
(86) PCT/US2019/067173 18/12/2019 (87) WO2020/132066 25/06/2020
(30) 62/781,689 19/12/2018 US
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/01/2022 406A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, United States of America
(72) MURPHY, Andrew J. (US); SKOKOS, Dimitris (US); WAITE, Janelle (US);
ULLMAN, Erica (US); HERMANN, Aynur (US); SMITH, Eric (US); OLSON, Kara
(US); WEI, Joyce (US); YANCOPOULOS, Geogre, D. (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) PHÂN TỬ LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP ĐƯỢC PHÂN LẬP
VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA PHÂN TỬ LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN NÀY

(21) 1-2021-03779

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 của người, và phân tử liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD-22 của người. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế có khả năng ức chế sự tăng sinh của khối u biểu hiện CD-22, như u lympho tế bào B. Kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hữu dụng trong điều trị bệnh và rối loạn mà mong muốn điều hòa lên hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch hướng đích và/hoặc có lợi về mặt trị liệu.

Điều trị chuột NSG mang khối u WSU-DLCL2 với REGN5834 khi có mặt liều gần hiệu quả của REGN1979 liên quan đến tỷ lệ sống sót đáng kể hơn liệu pháp đơn REGN5737 hoặc REGN1979

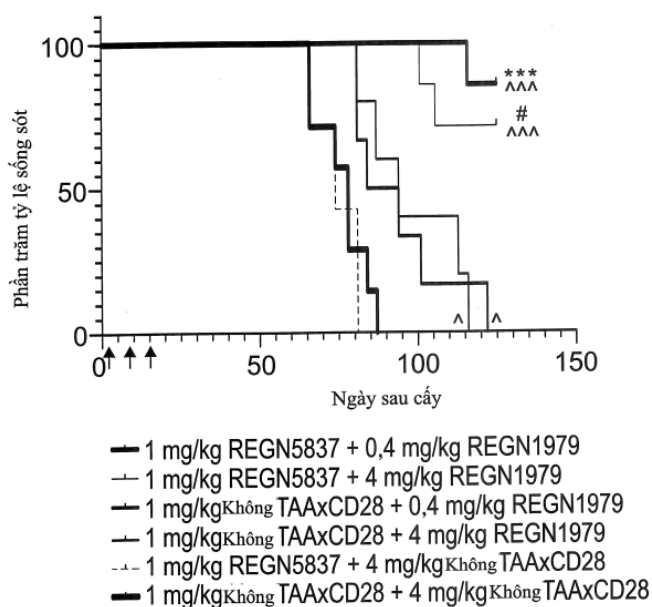


FIG. 14

Đơn sáng chế liên quan

Đơn sáng chế này hưởng quyền ưu tiên của đơn sáng chế Mỹ số 62/781,689 được nộp ngày 19 tháng Mười Hai năm 2018, toàn bộ nội dung của đơn này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Danh sách trình tự

Đơn đăng ký sáng chế này bao gồm Danh sách trình tự đã được nộp bằng theo đường điện tử ở định dạng ASCII và đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ. Bản sao ASCII này, được tạo vào ngày 16 tháng Mười Hai năm 2019, có tên là 118003_49220_SL.txt, và có kích thước 104,353 bit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết CD28 và phân tử đích, như CD22, và các phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD28 là protein xuyên màng loại I được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T, protein này có một miền tương tự Ig-V ngoại bào được lắp ráp thành dime cùng loại. CD28 là thụ thể cho protein CD80 (B7.1) và CD86 (B7.2) và được hoạt hóa bởi CD80 hoặc CD86 được biểu hiện trên tế bào trình diện kháng nguyên (APC). Sự liên kết của CD28 với CD80 hoặc CD86 tạo ra tín hiệu đồng kích thích quan trọng trong quá trình hoạt hóa và khả năng sống của tế bào T. Sự kích thích tế bào T thông qua CD28, ngoài thụ thể của tế bào T (TCR), tạo ra tín hiệu mạnh để sản xuất nhiều loại interleukin khác nhau. CD28 cũng làm tăng tín hiệu tế bào như các con đường được đối chứng bởi yếu tố phiên mã NF κ B sau quá trình hoạt hóa TCR. Đồng tín hiệu CD28 là rất quan trọng để hoạt hóa tế bào T một cách hiệu quả như biệt hóa, tăng sinh tế bào T, giải phóng cytokin và gây chết tế bào.

Kháng thể kháng CD28 đã được đề xuất đối với mục đích trị liệu liên quan đến sự hoạt hóa tế bào T. Một kháng thể kháng CD28 cụ thể, TGN1412 (chất siêu

chủ vận kháng CD28), được sử dụng trong thử nghiệm lâm sàng vào năm 2006. Sáu tình nguyện viên khỏe mạnh được cho dùng liều bằng đường tiêm tĩnh mạch với TGN1412 (chất siêu chủ vận kháng CD28) ở liều là 0,1 mg/kg. Trong hai giờ, tất cả sáu bệnh nhân đều có đáp ứng viêm đáng kể (cơn bão cytokin), và tất cả các bệnh nhân đều suy đa tạng trong vòng mười sáu giờ. Đối tượng được điều trị với corticosteroid, và hàm lượng cytokin đã trở về hàm lượng bình thường trong 2-3 ngày. Liều bắt đầu là 0,1 mg/kg ở nghiên cứu pha 1 (liên quan đến CRS) dựa trên cơ sở nhân lên 500 lần của “NOAEL” của khi đuôi dài là 50 mg/kg (Suntharalingam, *et al.*, Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412, *NEJM* 355:1018-1028 (2006)). Đáng tiếc là, TGN1412 gây ra cơn bão cytokin, điều này không thể dự đoán trước bằng các nghiên cứu độc học ở khi đuôi dài hoặc nghiên cứu PBMC ở người *ex vivo*.

CD22 (còn được biết đến là Siglec-2), thành viên của họ Siglec, nhận diện đặc hiệu axit α 2,6 sialic, và là protein xuyên màng ưu tiên biểu hiện trên tế bào lympho B (tế bào B).

CD22 có một số lượng các chức năng quy định bao gồm, ví dụ, cân bằng nội mô tế bào B, khả năng sống và di cư của tế bào B, làm giảm sự truyền tín hiệu TLR và CD40, và ức chế sự truyền tín hiệu của thụ thể tế bào B (BCR) thông qua sự tuyển chọn phosphatase chứa miền SH2 bằng cách phosphoryl hóa các mô tip ức chế trên cơ sở tyrosin của thụ thể miễn dịch (ITIM) trong vùng tế bào chất, cũng như thúc đẩy sự bám dính giữa tế bào B và các loại tế bào khác.

CD22 không được tìm thấy ở bề mặt của tế bào B trong suốt giai đoạn sớm của sự phát triển, cũng như nó cũng không được biểu hiện ở tế bào gốc. Tuy nhiên, 60-70% trong số các u lympho và bệnh bạch cầu do tế bào B biểu hiện CD22.

Kháng thể kháng CD22 để điều trị u lympho và bệnh bạch cầu do tế bào B đã được điều tra nghiên cứu. Tuy nhiên, kháng thể đơn dòng, Epratuzumab, có thành công hạn chế. (Grant, *et al.* (2013) *Cancer* 119(21): 10.1002/cncr.28299)

Theo đó, có nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật đối với kháng thể kháng CD22 được cải tiến. Có nhu cầu đối với kháng thể kháng CD28 an toàn để sử dụng trong dược phẩm. Ngoài ra, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với cả CD28 và kháng nguyên đích (như CD22) sẽ hữu dụng trong việc trị liệu mong

muốn hướng đích đặc hiệu và tiêu diệt tế bào biểu hiện kháng nguyên đích qua trung gian tế bào T.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết CD28 và kháng nguyên đích. Theo các phương án ví dụ nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết CD28 và CD22; phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép này còn được đề cập trong bản mô tả này là “phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22.” Phần kháng CD22 của phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 hữu dụng để hướng đích tế bào ung thư biểu hiện CD22 (ví dụ, tế bào B ung thư) và phần kháng CD28 của phân tử đặc hiệu kép này hữu dụng để hoạt hóa tế bào T. Sự liên kết đồng thời của CD22 trên tế bào ung thư và CD28 trên tế bào T tạo điều kiện tiêu diệt trực tiếp (phân giải bào) tế bào ung thư đích bởi tế bào T đã hoạt hóa, ví dụ, sau khi hoạt hóa TCR tế bào T. Do đó, phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22 theo sáng chế là hữu dụng, cùng với những thứ khác, để điều trị bệnh và rối loạn liên quan đến hoặc do khối u biểu hiện CD22 (ví dụ, rối loạn tăng sinh tế bào B, ví dụ, u lympho tế bào B, ví dụ, u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), u lympho dạng nang (FL), u lympho vùng rìa).

Các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 ở người và vùng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với CD22. Sáng chế bao gồm các phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) trong đó mỗi vùng liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được ghép cặp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR). Theo một số phương án ví dụ theo sáng chế, vùng liên kết kháng nguyên kháng CD28 và vùng liên kết kháng nguyên kháng CD22, mỗi vùng bao gồm các HCVR khác nhau, riêng biệt được ghép cặp với một LCVR chung.

Sáng chế đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22, trong đó vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 bao gồm trình tự axit amin bất kỳ của HCVR như được nêu trong Bảng 6. Vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 cũng có thể bao gồm trình tự axit amin bất kỳ của LCVR như được nêu trong Bảng 6. Theo các phương án nhất định, miền

liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 bao gồm cặp trình tự bất kỳ trong số các cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được nêu ở Bảng 6. Sáng chế cũng đề xuất các phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22, trong đó vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin CDR1-CDR2-CDR3 chuỗi nặng như được nêu trong Bảng 6 và/hoặc trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin CDR1-CDR2-CDR3 chuỗi nhẹ như được nêu trong Bảng 6.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 28 và 26 hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, hoặc trình tự gần giống của chúng có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 chứa cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 28/10 và 26/10.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 chứa miền CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 32, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, hoặc trình tự gần giống của chúng có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Theo các phương án nhất định, miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 của SEQ ID NO: 32/16.

Sáng chế còn đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu

CD28 chứa miền CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 28, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14, hoặc trình tự gần giống của chúng có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 ví dụ, không giới hạn theo sáng chế chứa miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 chứa miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, tương ứng, có trình tự axit amin là: SEQ ID NO: 28-30-32-12-14-16.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2 và 18, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được lựa chọn là SEQ ID NO: 10, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10 và 18/10.

Sáng chế còn đề xuất phân tử đặc hiệu kép kháng CD28/CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa miền CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8 và 24, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất

95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được lựa chọn là SEQ ID NO:16, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Theo các phương án nhất định, miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8/16 và 24/16.

Sáng chế còn đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa miền CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4 và 20, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6 và 22, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, hoặc trình tự gần giống của nó có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14, hoặc trình tự gần giống của chúng có độ tương đồng trình tự là ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Một số phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 ví dụ, không giới hạn theo sáng chế bao gồm vùng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với CD22 bao gồm miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, có trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 và 20-22-24-12-14-16

Theo phương án liên quan, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 chứa miền CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10 và 18/10.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR, LCVR hoặc CDR của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 được bộc lộ trong bản mô tả này,

bao gồm phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được nêu trong Bảng 7 trong bản mô tả này, cũng như phân tử axit nucleic chứa hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit như được nêu trong Bảng 7 theo sự kết hợp hoặc sắp xếp chức năng bất kỳ của chúng. Các vector biểu hiện tái tổ hợp mang axit nucleic theo sáng chế, và tế bào chủ mà các vector này đã được đưa vào cũng được bao gồm trong sáng chế, cũng như các phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện cho phép sản xuất kháng thể, và phục hồi các kháng thể được sản xuất.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22, trong đó miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu đã nêu trên được kết hợp, được liên kết hoặc kết hợp khác liên quan đến miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đã nêu mà liên kết đặc hiệu với CD22 để tạo thành phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết CD28 và CD22.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 có dạng glycosyl hóa được sửa đổi. Trong một số ứng dụng, việc biến đổi để loại bỏ vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể hữu dụng, hoặc kháng thể thiếu vùng trình diện gốc fucosa trên chuỗi oligosaccharit, ví dụ, để tăng cường chức năng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (xem Shield *et al.* (2002) *JBC* 277:26733). Trong các ứng dụng khác, việc biến đổi quá trình galactosyl hóa có thể được thực hiện để biến đổi hoạt tính gây độc phụ thuộc vào bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 như được mô tả trong tài liệu này và chất mang dược dụng. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế mô tả chế phẩm là sự kết hợp của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 và chất trị liệu thứ hai. Theo một phương án, tác nhân trị liệu thứ hai là tác nhân bất kỳ có khả năng kết hợp với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 một cách thuận lợi. Các chất làm ví dụ có thể được kết hợp một cách thuận lợi với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 được đề cập chi tiết ở phần khác trong tài liệu này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu hướng đích/tiêu diệt tế bào ung thư biểu hiện CD22 bằng cách sử dụng phân tử liên kết

kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế, trong đó các phương pháp trị liệu bao gồm việc cho đối tượng có nhu cầu dùng phương pháp này dùng một lượng có hiệu quả trị liệu của dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế trong sản xuất thuốc điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến hoặc do tế bào biểu hiện CD22.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu hướng đích/tiêu diệt tế bào ung thư biểu hiện CD22 sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 được kết hợp với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chống khối u khác liên kết với CD3 (ví dụ, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 được kết hợp với kháng thể kháng CD3/kháng CD20).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu hướng đích/tiêu diệt tế bào ung thư biểu hiện CD22 sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 được kết hợp với chất ức chế điểm kiểm tra hướng đích PD-1, PD-L1 hoặc CTLA-4 (ví dụ, kháng thể kháng CD28/kháng CD-22 được kết hợp với kháng thể kháng PD-1). Ví dụ, theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được kết hợp với tác nhân hướng đích PD-1, như Pembrolizumab (Keytruda®), Nivolumab (Opdivo®), hoặc Cemiplimab (Libtayo®). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được kết hợp với tác nhân hướng đích PD-L1, như Atezolizumab (Tecentriq®), Avelumab (Bavencio®), hoặc Durvalumab (Imfinzi®). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được kết hợp với tác nhân hướng đích CTLA-4, như Ipilimumab (Yervoy®).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu hướng đích/tiêu diệt tế bào ung thư biểu hiện CD22 sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 được kết hợp với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chống khối u khác mà liên kết với CD3 (ví dụ,

kháng CD28/kháng CD22 kháng thể đặc hiệu kép kháng CD3/kháng CD20, ví dụ, REGN1979 (Xem US9,657,102, trong đó nhánh kháng CD20 chứa cặp axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 1242/1258 và nhánh kháng CD3 chứa cặp axit amin là SEQ ID NO: 1250/1258)) và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra hướng đích PD-1, PD-L1 hoặc CTLA-4 (ví dụ, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 kết hợp với kháng thể kháng PD1). Ví dụ, theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được kết hợp với tác nhân hướng đích PD-1, như Pembrolizumab (Keytruda®), Nivolumab (Opdivo®), hoặc Cemiplimab (Libtayo®, xem ví dụ, US9,987,500, trong đó cemiplimab chứa cặp axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 162/170)). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được kết hợp với tác nhân hướng đích PD-L1, như Atezolizumab (Tecentriq®), Avelumab (Bavencio®), hoặc Durvalumab (Imfinzi®). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được kết hợp với tác nhân hướng đích CTLA-4, như Ipilimumab (Yervoy®).

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng thông qua phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là tập hợp các đồ thị mô tả sự liên kết của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 với tế bào T CD4 của người biểu hiện CD28 và tế bào đích biểu hiện CD22 của người trên bề mặt tế bào.

Fig. 2A và 2B là tập hợp các đồ thị mô tả rằng các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 cho thấy sự sản xuất Luciferaza tăng lên khi có sự kích thích tế bào T sơ cấp và biểu hiện đích CD22. Fig. 2A là tập hợp các đồ thị mô tả sự kích hoạt của tế bào T báo cáo được thiết kế đã được thiết kế đồng thời ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, hoặc tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 cùng với 200pM REGN1945 không đổi (đối chứng kiểu tương đương hIgG4 âm tính), được đánh giá bởi sự sản xuất Luciferaza. Fig. 2B là tập hợp các đồ thị mô tả sự kích hoạt của tế bào T báo cáo được thiết kế đã được thiết kế đồng thời ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 hoặc Raji/CD80 và tế bào âm tính CD86

cùng với 200pM REGN2281 không đổi (kháng CD20 x kháng CD3), được đánh giá bởi sự sản xuất Luciferaza.

Fig. 3A và 3B là tập hợp các đồ thị mô tả rằng kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 làm tăng sản xuất IL-2 khi có sự kích thích tế bào T sơ cấp và biểu hiện đích CD22. Cụ thể hơn, Fig. 3A là tập hợp các đồ thị mô tả sự hoạt hóa của tế bào T CD4⁺ được đồng ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 hoặc Raji/CD80 và tế bào âm tính CD86 khi có mặt 2nM REGN1945 không đổi (đối chứng kiểu tương đương hIgG4), được đánh giá bởi sự sản xuất IL-2. Fig. 3B là tập hợp các đồ thị mô tả sự hoạt hóa của tế bào T CD4⁺ được đồng ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, hoặc tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 khi có mặt 2nM hằng số REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3), được đánh giá bởi sự sản xuất IL-2.

Fig. 4 là tập hợp các đồ thị cho thấy rằng sự kết hợp của REGN5837 với cemiplimab giúp tăng cường giải phóng IL-2 so với khi chỉ xử lý REGN5837 trong tế bào được thiết kế để biểu hiện PD-L1.

Fig. 5A là tập hợp các đồ thị cho thấy rằng sự kết hợp của REGN5837 với cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 khi có mặt tế bào NALM6 được thiết kế để biểu hiện PD-L1.

Fig. 5B là tập hợp các đồ thị cho thấy rằng sự kết hợp của REGN5837 với cemiplimab giúp tăng cường giải phóng IL-2 so với khi xử lý REGN5837 một mình trong tế bào RAJI được thiết kế để biểu hiện PD-L1.

Fig. 6 là biểu đồ cho thấy việc điều trị chuột NSG mang khối u NALM-6-Luc với REGN5837 khi có mặt REGN1979 (kháng CD20 x kháng CD3) có liên quan đến việc ức chế khối u đáng kể. Tóm lại, chuột NSG (n = 6 đến 9 mỗi nhóm) được cấy với PBMC của con người, sau đó được cấy với tế bào bạch cầu tế bào B NALM-6-luc 12 ngày sau khi nuôi (ngày 0). Chuột được sử dụng 4 mg/kg REGN5837 + 0,04 mg/kg REGN1979 (hình tròn bằm), 0,4 mg/kg REGN5837 + 0,04 mg/kg REGN1979 (hình tam giác thẳng đứng kín), 0,04 mg/kg REGN5837 + 0,04 mg/kg REGN1979 (kim cương), 4 mg/kg không phải TAAxCD28⁺ 0,04 mg/kg REGN1979 (hình vuông), 4 mg/kg REGN5837 + 0,4 mg/kg không phải TAAxCD3 (hình tròn mở), hoặc 4 mg/kg không phải TAAxCD28⁺ 0,4 mg/kg không phải TAAxCD3 (hình tam giác ngược kín) vào các ngày 8, 15 và 22 sau khi cấy (mũi

tên). Sự phát triển của khối u được theo dõi bằng hình ảnh phát quang sinh học về thể tích khối u vào các ngày 6, 10, 14, 17, 20 và 23 sau khi cấy ghép. Dữ liệu kết hợp được biểu thị bằng giá trị trung bình của nhóm $\pm$ SEM. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều với thử nghiệm sau hoc môn Tukey. Các ký hiệu sau đây được sử dụng để chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng không TAAxCD28⁺ không TAAxCD3: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Fig. 7A-7C là biểu đồ cho thấy REGN1979 đã kích hoạt và chỉ đạo tế bào T của người tiêu diệt tế bào Nalm6 theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Cụ thể hơn, Fig. 7A là một biểu đồ mô tả tỷ lệ phần trăm sống sót của tế bào Nalm6 khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 7B là biểu đồ mô tả phần trăm tế bào CD8⁺ biểu hiện CD25 (CD25⁺) khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 7C là biểu đồ mô tả sự tăng sinh của tế bào CD25⁺ CD8⁺ được đánh giá bằng phương pháp pha loãng thuốc tím CellTrace khi có mặt các kháng thể được chỉ định.

Fig. 8A, 8B và 8C là biểu đồ cho thấy REGN1979 đã kích hoạt và chỉ đạo tế bào T của người tiêu diệt tế bào WSU-DLCL2 theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Cụ thể hơn, Fig. 8A là biểu đồ mô tả tỷ lệ phần trăm sống sót của tế bào WSU-DLCL2 khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 8B là biểu đồ mô tả phần trăm tế bào CD8⁺ biểu hiện CD25 (CD25⁺) khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 8C là biểu đồ mô tả sự gia tăng của tế bào CD8⁺, được biểu thị bằng % phân chia, khi có mặt các kháng thể được chỉ định.

Fig. 9 là tập hợp các biểu đồ cho thấy rằng trong các thử nghiệm với tế bào PBMC và WSU-DLCL2 của người, REGN1979 gây ra sự giải phóng các cytokin của người, IL-2, IL-4, IL-6 và IL-10. Sự giải phóng cytokin được quan sát với REGN1979 được tăng cường khi có nồng độ cố định của CD22 X CD28 so với sự giải phóng cytokin được gây ra bởi REGN1979.

Fig. 10A-10E là biểu đồ cho thấy REGN1979 đã kích hoạt và chỉ đạo tế bào T của người làm suy yếu NHL theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Việc bổ sung nồng độ cố định của các kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 vào REGN1979 đã nâng cao hiệu quả gây độc tế bào (EC50) của REGN1979 2,3 và 3,5 lần khi so sánh với REGN1979 với kháng thể đối chứng CD28 1 nhánh hoặc không có đối chứng đồng kích thích. Quá trình ly giải tế bào đích được quan sát qua trung gian

REGN1979 có liên quan đến sự kích hoạt và tăng sinh tế bào T, được đo bằng sự điều chỉnh CD25 trên tế bào CD8⁺ và CD4⁺ hoặc pha loãng thuốc tím CellTrace tương ứng. Cụ thể hơn, Fig. 10A là biểu đồ mô tả tỷ lệ phần trăm sống sót của tế bào NHL từ tủy xương của bệnh nhân khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 10B là biểu đồ mô tả phần trăm tế bào CD8⁺ biểu hiện CD25 (CD25⁺) khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 10C là biểu đồ mô tả sự tăng sinh của tế bào CD8⁺ được đánh giá bằng phương pháp pha loãng thuốc tím CellTrace khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 10D là biểu đồ mô tả phần trăm tế bào CD4⁺ biểu hiện CD25 (CD25⁺) khi có mặt các kháng thể được chỉ định. Fig. 10E là biểu đồ mô tả sự tăng sinh của tế bào CD4⁺ được đánh giá bằng phương pháp pha loãng thuốc tím CellTrace khi có mặt các kháng thể được chỉ định.

Fig. 11A-11E là biểu đồ cho thấy REGN5837 tăng cường hiệu lực của độc tế bào qua trung gian REGN1979, biểu hiện bề mặt tế bào của CD25 và tăng sinh tế bào T theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Tóm lại, tế bào WSU-DLCL2 được ủ với PBMC của người được làm giàu tế bào lympho ở tỷ lệ tế bào đích so với PBMC là 1: 5 và với kháng thể kháng CD20xCD3 (REGN1979) ở một phạm vi nồng độ (4,8fM đến 10nM) như tác nhân duy nhất (tức là, không có REGN5837) hoặc có nồng độ cố định của REGN5837 (dao động từ 0,01 đến 15 µg/mL) trong 72 giờ ở 37°C. Điều kiện thiếu REGN1979 chỉ chứa REGN5837 ở nồng độ được chỉ định và được vẽ là 0,04 pM. Các tế bào sống được đã được phát hiện bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy sử dụng nhuộm tế bào LIVE/DEAD (11A). Thuốc nhuộm theo dấu Violet Cell và hỗn hợp kiểu hình của các kháng thể đánh dấu huỳnh quang đối với CD2, CD4, CD8 và CD25 được sử dụng để phát hiện sự hoạt hóa tế bào T (được đo bằng biểu hiện CD25; 11B, 11D) và sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ theo dòng đo tế bào (11C, 11E).

Cụ thể hơn, Fig. 11A là biểu đồ mô tả % tế bào chết với nồng độ được chỉ ra là REGN5837. Fig. 11B là biểu đồ mô tả phần trăm tế bào CD25⁺ CD4⁺ với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 11C là biểu đồ mô tả sự gia tăng của tế bào CD4⁺ được đánh giá bằng phương pháp pha loãng thuốc tím CellTrace với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 11D là biểu đồ mô tả phần trăm của tế bào CD25⁺ CD8⁺. Fig. 11E là biểu đồ mô tả sự gia tăng của tế bào CD8⁺ được đánh giá bằng

phương pháp pha loãng thuốc tím CellTrace với các nồng độ chỉ định của REGN5837.

Fig. 12A-12G là biểu đồ cho thấy REGN5837 tăng cường hiệu lực và mức tối đa của giải phóng cytokin qua trung gian REGN1979 từ tế bào T của người theo cách phụ thuộc vào nồng độ khi có mặt tế bào u lympho tế bào B WSU-DLCL2. Tóm lại, tế bào WSU-DLCL2 được ủ với PBMC của người được làm giàu tế bào lympho ở tỷ lệ tế bào đích so với PBMC là 1:5 và với kháng thể kháng CD20xCD3 (REGN1979) ở một phạm vi nồng độ (4,8fM đến 10nM) là tác nhân duy nhất (tức là, không có REGN5837) hoặc có nồng độ cố định của REGN5837 (dao động từ 0,01 đến 15 $\mu\text{g/mL}$) trong 72 giờ ở 37°C. Điều kiện thiếu REGN1979 chỉ chứa REGN5837 ở nồng độ được chỉ định và được vẽ dưới dạng 0,04pM. Các chất nổi trên được đánh giá về sự giải phóng cytokin của (12A) IL-2, (12B) IL-4, (12C) IL-6, (12D) IL-10, (12E) TNF- α , (12F) IFN- γ , và (12G) IL-17 α sử dụng kit cytokin BD Th1/Th2/Th17 BD Cytometric Bead Array.

Cụ thể hơn, Fig. 12A là biểu đồ mô tả mức IL-2 được giải phóng từ tế bào T của người khi có sự hiện diện của tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 12B là biểu đồ mô tả hàm lượng IL-4 được giải phóng từ tế bào T của người khi có mặt tế bào WSU-DLCL2. Tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 12C là biểu đồ mô tả mức IL-6 được giải phóng từ tế bào T của người khi có mặt tế bào WSU-DLCL2. Tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 12D là biểu đồ mô tả mức IL-10 được giải phóng từ tế bào T của người khi có mặt tế bào WSU-DLCL2 Tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 12E là biểu đồ mô tả mức TNF- α được giải phóng từ tế bào T của người khi có sự hiện diện của tế bào WSU-DLCL2. Tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 12F là biểu đồ mô tả mức IFN- γ được giải phóng từ tế bào T của người khi có sự hiện diện của tế bào WSU-DLCL2. Tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837. Fig. 12G là biểu đồ mô tả mức IL-17 α được giải phóng từ tế bào T của người khi có mặt tế bào WSU-DLCL2 Tế bào WSU-DLCL2 với nồng độ được chỉ định là REGN5837.

Fig. 13A và 13B là biểu đồ cho thấy việc điều trị chuột NSG mang khối u WSU-DLCL2 với REGN5837 khi có mặt REGN1979 0,4 hoặc 4 mg/kg có liên

quan đến việc ức chế khối u đáng kể. Tóm lại, chuột cái NSG ($n = 6$ đến 7 mỗi nhóm) được cấy hỗn hợp 1: 1 gồm tế bào u lympho B WSU-DLCL2 và PBMC của người (ngày 0). Chuột được sử dụng kết hợp 1 mg/kg REGN5837 và $0,4 \text{ mg/kg}$ (13A) hoặc 4 mg/kg (13B) REGN1979 (hoặc đối chứng không bắc cầu) vào ngày 1, 8 và 15 sau khi cấy (mũi tên). Sự phát triển của khối u được theo dõi bằng cách đo bằng thước cặp vào các ngày 7, 10, 14, 16, 28, 31, 35, 38, 43, 46, 49, 53, 57 và 63 sau khi cấy ghép. Dữ liệu kết hợp được biểu thị bằng giá trị trung bình của nhóm $\pm$ SEM. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng cách sử dụng ANOVA hai chiều với kiểm định post-hoc Tukey. Các ký hiệu sau đây được sử dụng để chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. Dấu hoa thị biểu thị ý nghĩa thống kê giữa liệu pháp trị liệu đơn REGN1979 và đối chứng kiểu tương đương, dấu thăng cho biết ý nghĩa giữa sự kết hợp của REGN5837 với REGN1979 và đối chứng kiểu tương đương, và dấu mũ cho biết ý nghĩa giữa đơn trị REGN1979 và sự kết hợp của REGN5837 với REGN1979.

Cụ thể hơn, Fig. 13A là biểu đồ mô tả sự phát triển của khối u ở chuột được sử dụng 1 mg/kg REGN5837 và $0,4 \text{ mg/kg}$ REGN1979 (hoặc đối chứng không bắc cầu, không TAAxCD3). Fig. 13B là biểu đồ mô tả sự phát triển của khối u ở chuột được sử dụng 1 mg/kg REGN5837 và 4 mg/kg (hoặc đối chứng không bắc cầu, không phải TAAxCD3).

Fig. 14 là biểu đồ cho thấy việc điều trị chuột NSG mang khối u WSU-DLCL2 với REGN5837 với liều REGN1979 không hiệu quả có liên quan đến tỷ lệ sống sót cao hơn đáng kể so với REGN5837 hoặc REGN1979 liệu pháp trị liệu đơn. Tóm lại, chuột NSG cái ($n = 6$ đến 7 mỗi nhóm) được cấy hỗn hợp 1: 1 gồm tế bào u lympho B WSU-DLCL2 và PBMC của người (ngày 0). Chuột được sử dụng kết hợp REGN5837 và REGN1979 hoặc đối chứng vào ngày 1, 8 và 15 sau khi cấy (mũi tên). Ý nghĩa thống kê được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Mantel-Cox. Các ký hiệu sau đây được sử dụng để chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$. Dấu mũ biểu thị ý nghĩa thống kê so với đối chứng tương đương, dấu hoa thị biểu thị ý nghĩa so với liệu pháp trị liệu đơn $0,4 \text{ mg/kg}$ REGN1979, và dấu thăng cho biết ý nghĩa so với liệu pháp trị liệu đơn với 4 mg/kg REGN1979.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi bắt đầu mô tả sáng chế, nên hiểu rằng, sáng chế này không bị giới hạn ở các điều kiện thí nghiệm và phương pháp cụ thể đã mô tả, các điều kiện và phương pháp có thể được thay đổi. Cũng nên hiểu rằng, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ được dùng với mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không có mục đích giới hạn sáng chế, bởi vì phạm vi của sáng chế chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ.

Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng một nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Như được sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “khoảng”, khi được sử dụng để tham chiếu đến các giá trị dạng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi không quá 1 % so với giá trị trích dẫn. Ví dụ, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng 100” bao gồm 99 và 01 và tất cả giá trị trong khoảng này (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù bất kỳ phương pháp và vật liệu nào giống hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả sau đây. Tất cả mọi bằng sáng chế, đơn sáng chế và các công bố phi sáng chế đã nêu trong phần mô tả được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của các tài liệu này.

Định nghĩa

Thuật ngữ “CD28,” như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng nguyên được biểu hiện trên tế bào T làm thụ thể đồng kích thích. CD28 của người chứa trình tự axit amin như nêu ở SEQ ID NO: 74, và/hoặc có trình tự axit amin như nêu ở số đăng ký NCBI là NP_006130.1. Tất cả các protein, polypeptit và mảnh protein được đề cập trong bản mô tả này đều được dùng để chỉ kiểu protein, polypeptit và mảnh protein tương ứng ở người trừ khi được chỉ ra rõ ràng là kiểu của các loài không phải con người. Do đó, thuật ngữ “CD28” có nghĩa là CD28 của

người trừ khi được chỉ ra là từ loài không phải con người, ví dụ, "CD28 của chuột," "CD28 của khỉ," v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kháng thể liên kết CD28” hoặc “kháng thể kháng CD28” bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó nhận diện đặc hiệu CD28 monome, cũng như kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó nhận diện đặc hiệu CD 28 dime. Các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể liên kết với CD28 hòa tan và/hoặc CD28 biểu hiện trên bề mặt tế bào. CD28 hòa tan bao gồm các protein CD28 tự nhiên cũng như các biến thể protein CD28 tái tổ hợp, chẳng hạn như ví dụ: cấu trúc CD28 monome và dime, thiếu vùng xuyên màng hoặc không liên kết với màng tế bào.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “CD28 được biểu hiện trên bề mặt tế bào” có nghĩa là một hoặc nhiều protein CD28, mà được biểu hiện trên bề mặt của tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*, sao cho ít nhất một phần của protein CD28 được bộc lộ ở vùng ngoại bào của màng tế bào và có thể tiếp cận mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể. “CD28 biểu hiện trên bề mặt tế bào” bao gồm các protein CD28 có trong phạm vi của thụ thể đồng kích thích tế bào T chức năng trong màng tế bào. Thuật ngữ “CD28 được biểu hiện trên bề mặt tế bào” bao gồm protein CD28 được biểu hiện ở dạng dime giống nhau trên bề mặt tế bào. “CD28 được biểu hiện trên bề mặt tế bào” có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein CD28 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào thường biểu hiện protein CD28. Ngoài ra, “CD28 được biểu hiện trên bề mặt tế bào” có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein CD28 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào thường không biểu hiện CD28 của người trên bề mặt của nó nhưng lại được thiết kế nhân tạo để biểu hiện CD28 trên bề mặt của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể kháng CD28” bao gồm cả kháng thể hóa trị với đặc hiệu đơn, cũng như kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhánh thứ nhất liên kết với CD28 và nhánh thứ hai liên kết với kháng nguyên (đích) thứ hai, trong đó nhánh kháng CD28 chứa trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ được nêu ở Bảng 1 trong bản mô tả này. Ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28 được mô tả ở chỗ khác trong bản mô tả này. Thuật ngữ “phần tử liên kết kháng nguyên” bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, bao gồm, ví dụ là các kháng thể đặc hiệu kép.

Thuật ngữ "CD22", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ protein CD22 của người trừ khi được chỉ rõ là từ loài không phải người (ví dụ: "CD22 của chuột", "CD22 của khỉ", v.v.). Protein CD22 của người có trình tự axit amin như nêu ở số đăng ký CAA42006. Trình tự của miền ngoại bào CD22 của người tái tổ hợp (D20-R687) với đuôi myc myc hexahistidin ("hexahistidin" được bộc lộ ở SEQ ID NO: 60) được nêu ở số đăng ký NP_001762.2 và cả SEQ ID NO: 50. Miền ngoại bào hCD22 (D20-R687).hFc, cũng có thể được mua từ R&D Systems, Catalog# 1968-SL-050.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể liên kết CD22" hoặc "kháng thể kháng CD22" bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể liên kết CD22 hòa tan và/hoặc CD22 được biểu hiện trên bề mặt tế bào. CD22 hòa tan bao gồm protein CD22 tự nhiên cũng như biến thể protein CD22 tái tổ hợp, chẳng hạn như, ví dụ, cấu trúc CD22, thiếu miền xuyên màng hoặc không liên kết với màng tế bào.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể kháng CD22" bao gồm cả kháng thể hóa trị với đặc hiệu đơn, cũng như kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhánh thứ nhất liên kết với CD22 và nhánh thứ hai liên kết với kháng nguyên (đích) thứ hai, trong đó nhánh kháng CD22 chứa trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ được nêu ở Bảng 1 trong bản mô tả này. Ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 được mô tả ở chỗ khác trong bản mô tả này. Thuật ngữ "phân tử liên kết kháng nguyên" bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, bao gồm, ví dụ là các kháng thể đặc hiệu kép.

Thuật ngữ "phân tử liên kết kháng nguyên" bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể, bao gồm, ví dụ là các kháng thể đặc hiệu kép.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là bất kỳ phức hợp phân tử hoặc phân tử liên kết kháng nguyên nào chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) mà liên kết đặc hiệu với hoặc tương tác với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, CD28). Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm phân tử globulin miễn dịch bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), liên kết với nhau ở giữa bằng cầu nối disulfua, cũng như các đa phân của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là

HCVR hoặc VH) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, C_H1 , C_H2 và C_H3 . Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là LCVR hoặc VL) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền (C_L1). Vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định hỗ trợ (CDR), nằm xen kẽ với các vùng bảo thủ hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, vùng khung FR của kháng thể kháng CD28 và/hoặc kháng thể kháng CD22 (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được biến đổi một cách tự nhiên hay nhân tạo. Một chuỗi liên ứng axit amin có thể được xác định dựa vào thử nghiệm phân tích kề nhau của hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, cũng bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên của phân tử kháng thể hoàn chỉnh. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp, hoặc được biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra, ví dụ, từ phân tử kháng thể hoàn chỉnh bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như thủy phân protein hoặc kỹ thuật biến đổi gen tái tổ hợp bao gồm kỹ thuật thao tác trên gen và biểu hiện ADN mã hóa vùng biến đổi và vùng hằng định tùy ý của kháng thể. ADN này đã được biết đến và/hoặc có thể dễ dàng thu được từ, ví dụ, nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thực thể khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN này có thể được giải trình tự hoặc thao tác bằng các kỹ thuật hóa học hoặc sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định thành cấu tạo phù hợp, hoặc để đưa vào bộ ba, tạo gốc cystein, sửa đổi, thêm hoặc bớt các axit amin, v.v..

Ví dụ không giới hạn về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); (vi) mảnh dAb; và (vii) đơn vị nhận diện tối thiểu bao gồm gốc axit amin bất chước

vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định hỗ trợ (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 được ràng buộc với nhau. Phân tử được biến đổi khác, như kháng thể đặc hiệu vùng, kháng thể đơn vùng, kháng thể loại bỏ vùng, kháng thể thể khảm, kháng thể ghép CDR, thể hai, thể ba, thể bốn, thể mini, thể nano (ví dụ, thể nano hóa trị một, thể nano hóa trị hai, v.v.), thuốc miễn dịch mô đun nhỏ (small modular immunopharmaceuticals - SMIP), và vùng IgNAR biến đổi của cá mập, cũng bao gồm trong định nghĩa “mảnh liên kết kháng nguyên” như được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường sẽ bao gồm ít nhất một CDR liên kề hoặc ở trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh liên kết kháng nguyên có miền V_H liên quan đến miền V_L , các miền V_H và V_L có thể được bố trí tương ứng với một vùng khác theo cấu hình thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L monome.

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền hằng định. Ví dụ về cấu hình của miền hằng định và miền biến đổi mà có thể được tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; và (xiv) V_L - C_L . Trong bất kỳ cấu tạo của miền biến đổi và miền hằng định, bao gồm cấu hình ví dụ bất kỳ được liệt kê trên đây, miền biến đổi và miền hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bởi toàn bộ hoặc một phần vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa miền biến đổi và/hoặc miền hằng định liên kề trong một phân tử polypeptit. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên có thể chứa đồng dime hoặc dị dime (hoặc đa phân khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình của miền biến đổi và miền hằng định được liệt kê ở trên mà liên kết không cộng hóa trị với nhau

và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bởi (các) liên kết disulfua).

Đối với phân tử kháng thể hoàn chỉnh, mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng biệt hoặc với quyết định kháng nguyên (epitop) khác trên cùng một kháng nguyên. Bất kỳ định dạng kháng thể đa đặc hiệu nào, bao gồm các định dạng kháng thể đặc hiệu kép ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể được chỉnh sửa để sử dụng trong phạm vi mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế sử dụng các kỹ thuật thông thường có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật.

Kháng thể của sáng chế có thể thực hiện chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) hoặc gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). “Tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể” (CDC) dùng để chỉ việc ly giải tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng kháng thể theo sáng chế với sự có mặt của bổ thể. “Tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể” (ADCC) dùng để chỉ phản ứng trung gian tế bào, trong đó tế bào gây độc không đặc hiệu biểu hiện thụ thể Fc (FcR) (ví dụ, tế bào giết tự nhiên (NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận diện kháng thể được gắn trên bề mặt tế bào đích, nhờ đó gây ra ly giải tế bào đích. CDC và ADCC có thể được xác định bằng các thử nghiệm đã được biết đến rộng rãi và có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật. (Xem, ví dụ, bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,500,362 và 5,821,337, và Clynes *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652- 656). Vùng hằng định của kháng thể có vai trò quan trọng đối với khả năng của kháng thể để cố định bổ thể và làm trung gian gây độc tế bào phụ thuộc tế bào. Vì vậy, tiêu chí lựa chọn isotyp của kháng thể dựa trên cơ sở liệu có mong muốn kháng thể làm trung gian gây độc tế bào hay không.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng CD28 và/hoặc kháng thể kháng CD22 theo sáng chế (đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép) là kháng thể người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể người” bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng dòng mầm người. Kháng thể người theo sáng chế có thể bao gồm gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người (ví dụ, đột

biến được gây ra bởi đột biến ngẫu nhiên hoặc tại vị trí cụ thể *in vitro* hoặc bởi đột biến soma *in vivo*), ví dụ trong CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể ở người”, như được sử dụng trong tài liệu này, không có nghĩa là bao gồm kháng thể mà trong đó trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột, được cấy ghép vào trình tự khung của người.

Kháng thể trong sáng chế có thể, theo một số phương án, là kháng thể người tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể người tái tổ hợp”, như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là bao gồm tất cả các kháng thể người được chuẩn bị, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng các cách tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tái tổ hợp, tái tổ hợp (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển gen globulin miễn dịch người (xem, ví dụ, Taylor et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) hoặc các kháng thể được chuẩn bị, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng các cách bất kỳ khác mà bao gồm bước nối trình tự gen globulin miễn dịch người với trình tự ADN khác. Các kháng thể người tái tổ hợp như trên có vùng biến đổi hoặc vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Tuy nhiên, theo một số phương án, các kháng thể tái tổ hợp này được gây đột biến gen *in vitro* (hoặc, khi chuyển gen động vật cho trình tự Ig của người, đột biến soma *in vivo*) và do đó trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, mặc dù có nguồn gốc từ và liên quan đến trình tự V_H và V_L dòng mầm người, có thể không tồn tại trong tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Kháng thể ở người có thể tồn tại ở hai dạng mà liên quan đến tính không đồng nhất vùng bản lề. Ở dạng thứ nhất, phân tử globulin miễn dịch bao gồm một cấu trúc bốn chuỗi ổn định có khối lượng xấp xỉ 150-160 kDa, trong đó các dime được gắn với nhau bằng một cầu nối disulfua chuỗi nặng giữa chuỗi. Ở dạng thứ hai, các dime không được gắn bằng cầu nối disulfua giữa chuỗi và một phân tử có khối lượng khoảng 75-80 kDa cấu tạo từ một chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cặp hóa trị (một nửa kháng thể). Các dạng này rất khó phân tách, ngay cả sau khi tinh sạch ái lực.

Tần số xuất hiện của dạng thứ hai trong các isotyp IgG nguyên vẹn nhiều là do, nhưng không giới hạn ở, sự khác biệt về mặt cấu trúc liên quan đến isotyp vùng

bản lề của kháng thể. Sự thay thế một axit amin trong vùng bản lề của vùng bản lề của IgG4 người có thể làm giảm đi đáng kể sự xuất hiện của dạng thứ hai (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) tới mức thường được quan sát bằng cách sử dụng vùng bản lề của IgG1 người. Sáng chế bao gồm kháng thể có một hoặc nhiều đột biến trong bản lề, vùng CH2 hoặc CH3 mà có thể là mong muốn, ví dụ, trong sản xuất, để cải thiện lượng dạng kháng thể mong muốn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể được phân lập. “Kháng thể được phân lập” được sử dụng ở đây là kháng thể được nhận biết và phân tách và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần thuộc môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được phân tách hoặc lấy ra từ ít nhất một thành phần của cơ quan hoặc từ mô hoặc tế bào, trong đó, kháng thể tồn tại tự nhiên hoặc được sản xuất tự nhiên, là “kháng thể được phân lập” cho mục đích của sáng chế. Kháng thể được phân lập cũng bao gồm kháng thể tại chỗ trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể được phân lập là kháng thể đã trải qua ít nhất một bước tinh sạch hoặc phân lập. Theo phương án nhất định, kháng thể được phân lập có thể về cơ bản không có các chất hóa học và/hoặc vật liệu tế bào khác.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể một nhánh liên kết CD28 và/hoặc CD22. Như được sử dụng trong tài liệu này, “kháng thể một nhánh” có nghĩa là phân tử liên kết với kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng của kháng thể đơn và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn. Các kháng thể một nhánh theo sáng chế có thể bao gồm trình tự axit amin HCVR/LCVR hoặc CDR bất kỳ được nêu trong Bảng 1.

Kháng thể kháng CD28 và/hoặc kháng thể kháng CD22 trong bản mô tả này, hoặc miền liên kết kháng nguyên của nó, có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm và/hoặc bớt axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với trình tự dòng mầm tương ứng tạo ra protein liên kết kháng nguyên hoặc miền liên kết kháng nguyên. Các đột biến này có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với trình tự có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó, một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được gây đột biến với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà

kháng thể có nguồn gốc từ dòng mầm này, hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người, hoặc đột biến thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các sự thay đổi trình tự như trên được đề cập trong đây gọi chung là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng sản xuất một lượng lớn kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên, mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng lẻ hoặc tổ hợp của các đột biến này. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng V_H và/hoặc V_L được gây đột biến quay trở lại các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà kháng thể được có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ một số gốc được gây đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1, hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR được gây đột biến với các gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (tức là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể ban đầu được tạo ra từ đó). Ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hay nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng lẻ nhất định được gây đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể, trong khi một số gốc khác có khác biệt với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được gây đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác. Khi thu hồi, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên nó, mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được kiểm tra một cách dễ dàng đối với một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tăng độ đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, tăng hoặc cải thiện đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận (trong trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nó, thu được theo cách này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD28 và/hoặc kháng thể kháng CD22 và phân tử liên kết kháng nguyên chứa biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này. Các biến thể ví dụ theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm biến thể của trình tự

bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều sự thay thế bảo thủ. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD28 có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. Sự thay thế axit amin bảo thủ liên quan đến trình tự bất kỳ trong số các bộ trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả trong Bảng 6 trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” dùng để chỉ yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với một vùng gắn kết với kháng nguyên đặc hiệu trên vùng biến đổi của phân tử kháng thể được gọi là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Quyết định kháng nguyên có thể là lập thể hoặc thẳng. Quyết định kháng nguyên lập thể được tạo ra bởi các axit amin kề nhau về mặt không gian từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Quyết định kháng nguyên thẳng là quyết định kháng nguyên được tạo ra bằng các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Trong một số trường hợp, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các gốc saccarit, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ “về cơ bản tương đồng” hoặc “gần tương đồng” được dùng khi đề cập đến axit nucleic hoặc đoạn của nó, ngụ ý rằng, việc thêm hoặc bớt một nucleotit thích hợp bằng axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó) được sắp xếp một cách tối ưu, có độ tương đồng trình tự nucleotit ít nhất khoảng 95%, và tốt hơn là ít nhất khoảng 96%, 97%, 98%, và 99% của các cặp bazơ nucleotit. Phương pháp xác định độ tương đồng sử dụng bất kỳ thuật toán đã được biến đến rộng rãi như FASTA, BLAST hoặc Gap, điều này sẽ được thảo luận dưới đây. Một phân tử axit nucleic về cơ bản tương đồng với phân tử axit nucleic đã nêu có thể trong một số trường hợp nhất định, mã hóa một chuỗi polypeptit có trình tự axit amin về cơ bản tương tự chuỗi polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Đối với polypeptit, thuật ngữ “về cơ bản giống” hoặc “gần giống” có nghĩa là hai chuỗi peptit, khi được sắp xếp một cách tối ưu, được xác định độ tương tự bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng trọng lượng khoảng trống mặc định, tìm ra được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất khoảng 96%, 97%, 98%, và 99%. Tốt hơn là, vị trí các gốc không tương

đồng khác biệt bởi việc thay thế axit amin bảo thủ. “Thay thế axit amin bảo thủ” là, trong đó một gốc axit amin được thay thế bởi một gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với các đặc điểm hóa học tương tự (ví dụ, mang điện tích hoặc kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo toàn về cơ bản sẽ không thay đổi tính năng của protein. Trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự thay thế bảo thủ, phần trăm độ tương đồng trình tự hoặc độ tương tự có thể được điều chỉnh lên cho đúng với bản chất bảo thủ của sự thay thế. Các phương pháp điều chỉnh đã được biết đến rộng rãi đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Các ví dụ về nhóm axit amin có chuỗi bên có các thuộc tính hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên aliphatic: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên aliphatic-hydroxyl: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên vòng thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên bazơ: lysin, arginin, và histidin; (6) chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh là cystein và metionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, sự thay thế bảo thủ là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bọc lại trong Gonnet *et al* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Sự thay thế "tương đối bảo toàn" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý.

Sự giống nhau về trình tự đối với polypeptit, mà còn gọi là độ tương đồng về trình tự, thường được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein nói các trình tự tương tự sử dụng các biện pháp đo lường tương tự với việc thay thế, xóa bỏ hoặc các sửa đổi khác, bao gồm việc thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG bao gồm các chương trình như Gap và Bestfit, các phần mềm này có thể được sử dụng với thông số mặc định để xác định độ tương đồng trình tự hoặc độ đồng nhất trình tự giữa các polypeptit gần gũi, như các polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của sinh vật hoặc giữa protein kiểu dại và biến thể của nó. Xem, ví dụ, GCG phiên bản 6.1. Các chuỗi polypeptit cũng có thể được so sánh với nhau bằng FASTA sử dụng thông số mặc định hoặc thông số khuyến nghị, chương trình trong GCG ver.6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và

FASTA3) tạo ra thông tin về sự bất cập và phần trăm độ tương đồng về trình tự của vùng có sự trùng lặp tốt nhất giữa các trình tự tra cứu và truy vấn (Pearson (2000) supra). Kỹ thuật giải được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Thuật ngữ “rối loạn tăng sinh tế bào” và “rối loạn tăng sinh” dùng để chỉ rối loạn liên quan đến một số mức độ tăng sinh tế bào bất thường mà sẽ có thể được điều trị hiệu quả bằng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 hoặc phương pháp theo sáng chế. Rối loạn này bao gồm rối loạn mạn tính và cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh khiến động vật mắc rối loạn được đề cập. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh ung thư, tình trạng sinh lý ở động vật có vú thường được đặc trưng bởi sự phát triển/tăng sinh không được điều hòa của tế bào.

“Khối u,” như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ tất cả sự phát triển và tăng sinh của tế bào ung thư, bất kể là ác tính hay lành tính, và tất cả tế bào và mô tiền ung thư và ung thư. Thuật ngữ “ung thư,” “dạng ung thư,” “rối loạn tăng sinh tế bào,” “rối loạn tăng sinh” và “khối u” không loại trừ lẫn nhau như được đề cập trong bản mô tả này.

“Rối loạn tăng sinh tế bào B” bao gồm u lympho Hodgkin, non-u lympho Hodgkin (NHL), như NHL xâm lấn, NHL xâm lấn tái phát, NHL mức độ nhẹ/dạng nang, NHL tế bào lympho nhỏ, NHL mức độ trung bình/dạng nang, NHL nguyên bào miễn dịch mức độ nặng, NHL tế bào không phân cắt nhỏ mức độ nặng, NHL bệnh có khối u lớn, NHL không đau bao gồm NHL không đau tái phát và NHL không đau kháng rituximab; NHL kháng thuốc, NHL không đau kháng thuốc, u lympho tế bào vỏ, u lympho liên quan đến AIDS, và tăng globulin đại phân tử Waldenstrom, bệnh Hodgkin chủ yếu là tế bào lympho (LPHD), u lympho liên quan đến tế bào lympho nhỏ (SLL), bệnh bạch cầu liên quan đến tế bào lympho mạn tính (CLL); bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu liên quan đến tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào tủy, bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính; và các bệnh máu ác tính.

Thuật ngữ “u lympho không phải Hodgkin” hoặc “NHL”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ bệnh ung thư của hệ bạch huyết mà không phải là u lympho Hodgkin. U lympho Hodgkin thường có thể được phân biệt với u lympho không phải Hodgkin bởi sự có mặt của tế bào Reed-Sternberg ở u lympho Hodgkin và sự vắng mặt của tế bào này ở u lympho không phải Hodgkin. Ví dụ về u lympho không phải Hodgkin theo thuật ngữ này như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm tất cả các u lympho mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết đến (ví dụ, nhà ung thư học hoặc nhà nghiên cứu bệnh học) theo sơ đồ phân loại đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như sơ đồ u lympho Châu Âu-Châu Mỹ sửa đổi (Revised European-American Lymphoma - REAL) như được mô tả trong cuốn Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand và John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Xem, cụ thể, danh sách ở Fig. 11.57, 11.58 và 11.59. Ví dụ cụ thể hơn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, NHL tái phát hoặc kháng thuốc, NHL mức độ nhẹ tuyến đầu, NHL giai đoạn III/IV, NHL kháng hóa trị, bệnh bạch cầu và/hoặc u lympho tiền nguyên bào lympho B, u lympho liên quan đến tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu liên quan đến tế bào lympho mạn tính tế bào B và/hoặc bệnh bạch cầu và/hoặc u lympho liên quan đến tế bào lympho nhỏ của tiền tế bào lympho, u lympho tiền tế bào lympho tế bào B, u lympho tế bào miễn dịch và/hoặc bào tương tế bào lympho, u lympho bào tương tế bào lympho, u lympho tế bào B vùng rìa, u lympho vùng rìa lá lách, u lympho vùng rìa ngoài hạch - MALT, u lympho vùng rìa hạch, bệnh bạch cầu tế bào tóc, u tương bào và/hoặc u tủy tế bào tương, u lympho mức độ nhẹ/dạng nang, NHL mức độ trung bình/dạng nang, u lympho tế bào vỏ, u lympho tâm nang (dạng nang), NHL lan tỏa mức độ trung bình, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, NHL xâm lấn (bao gồm NHL tuyến đầu xâm lấn và NHL tái phát xâm lấn), NHL tái phát sau hoặc kháng lại sự cấy ghép tế bào gốc tự miễn, u lympho tế bào B lớn ở trung thất nguyên phát, u lympho tràn dịch nguyên phát, NHL nguyên bào lympho mức độ nặng, NHL tế bào không phân cắt nhỏ mức độ nặng, NHL bệnh có khối u lớn, u lympho Burkitt, bệnh bạch cầu hạt lớn tiền chất (ngoại vi), u sùi dạng nấm và/hoặc hội chứng Sezary, u lympho da (thuộc da), u lympho lớn không biệt hóa, u lympho quanh mạch.

Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép

Các kháng thể theo sáng chế có thể là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu đối với quyết định kháng nguyên khác của một polypeptit đích hoặc có thể chứa vùng liên kết kháng nguyên đặc hiệu đối với nhiều hơn một polypeptit đích. Xem, ví dụ, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Kháng thể kháng CD28 và/hoặc kháng thể kháng CD22 theo sáng chế có thể được liên kết hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, với một peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng ghép cặp hóa học, dung hợp gen, kết hợp không cộng hóa trị hoặc các dạng khác) đến một hoặc nhiều khác phân tử khác, như kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có tính đặc hiệu liên kết thứ hai.

Việc sử dụng cụm từ "kháng thể kháng CD28" và/hoặc "kháng thể kháng CD22" trong bản mô tả này dùng để chỉ cả kháng thể kháng CD28 đặc hiệu đơn và/hoặc kháng CD22 đặc hiệu đơn cũng như kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhánh liên kết CD28 hoặc nhánh liên kết CD22 và nhánh liên kết kháng nguyên đích. Do đó, sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép trong đó một nhánh của globulin miễn dịch liên kết với CD28 hoặc CD22 của người, và một nhánh khác của globulin miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên đích. Kháng nguyên đích mà nhánh khác của kháng thể đặc hiệu kép CD28 hoặc CD22 liên kết có thể là kháng nguyên bất kỳ được biểu hiện trên hoặc ở gần tế bào, mô, cơ quan, vi sinh vật hoặc virus, mà đáp ứng miễn dịch hướng đích được mong muốn. Nhánh liên kết CD28 có thể chứa bất kỳ trình tự axit amin trong số các trình tự axit amin của HCVR/LCVR hoặc CDR như được mô tả trong Bảng 1 trong bản mô tả này. Nhánh liên kết CD22 có thể chứa bất kỳ trình tự axit amin trong số các trình tự axit amin của HCVR/LCVR hoặc CDR như được mô tả trong Bảng 1 trong bản mô tả này. Theo một số phương án nhất định, nhánh liên kết CD28 liên kết với CD28 của người và gây ra sự tăng sinh của tế bào T của người.

Trong phạm vi của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế trong đó một nhánh của kháng thể liên kết CD28 và nhánh khác liên kết với kháng nguyên đích, kháng nguyên đích có thể là kháng nguyên liên quan đến khối u, như CD22.

Theo một số phương án ví dụ, sáng chế bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với CD28 và CD22. Các phân tử này có thể được đề cập trong bản mô tả này là, ví dụ, phân tử đặc hiệu kép "kháng CD28/kháng CD22," hoặc "kháng CD28xCD22," hoặc "CD28xCD22" hoặc "kháng CD22/kháng CD28," hoặc "kháng CD22xCD28," hoặc "CD22xCD28", hoặc " $\square$ CD22 x $\square$ CD28", hoặc " $\square$ CD28 x $\square$ CD22", hoặc các thuật ngữ tương tự.

Theo các phương án ví dụ nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) có thể có nhánh tác động và nhánh hướng đích. Nhánh tác động có thể là miền liên kết kháng nguyên thứ nhất (ví dụ, kháng thể kháng CD28) mà liên kết với kháng nguyên trên bề mặt tế bào tác động (ví dụ, tế bào T). Nhánh hướng đích có thể là miền liên kết kháng nguyên thứ hai (ví dụ, kháng thể kháng CD22) mà liên kết với kháng nguyên trên tế bào đích (ví dụ, tế bào khối u). Theo các phương án ví dụ nhất định, nhánh tác động liên kết với CD28 và nhánh hướng đích liên kết với CD22. Kháng thể kháng CD28/CD22 đặc hiệu kép có thể tạo ra tín hiệu đồng kích thích đến tế bào tác động (ví dụ, tế bào T). Nhánh tác động không có tác động kích thích tế bào T mà không cụm lại. Chỉ một mình nhánh tác động thì có rất ít tác động kích thích tế bào T trừ khi kết hợp với nhánh hướng đích. Nhánh hướng đích khối u có thể có tính đặc hiệu khối u không hoàn hảo. Kháng nguyên mà là đích của nhánh hướng đích (ví dụ, CD22) có thể được biểu hiện trên phần của tế bào khối u. Tính đặc hiệu của nhánh hướng đích khối u có thể được tăng lên bằng cách gộp lên tổ hợp với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép CD3 (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD3/CD20).

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "phân tử liên kết kháng nguyên" có nghĩa là protein, polypeptit hoặc phức hợp phân tử bao gồm hoặc chỉ bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) mà độc lập hoặc kết hợp với một hoặc nhiều CDR bổ sung và/hoặc vùng sườn (FR), để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Theo các phương án cụ thể, phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh kháng thể, khi các thuật ngữ này được định nghĩa ở một nơi khác trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong tài liệu này, khái niệm "phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép" có nghĩa là protein, polypeptit hoặc phức hợp phân tử bao gồm ít nhất vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất và vùng liên kết kháng nguyên thứ

hai. Mỗi vùng liên kết kháng nguyên trong phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một CDR độc lập hoặc kết hợp với một hoặc nhiều CDR và/hoặc FR bổ sung, liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên cụ thể. Trong phạm vi của sáng chế, vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (ví dụ là CD28) và vùng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác biệt thứ hai (ví dụ là CD22).

Theo một số phương án ví dụ của sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép là kháng thể đặc hiệu kép. Mỗi vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR). Trong phạm vi của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai (ví dụ là kháng thể đặc hiệu kép), các CDR của vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất có thể được ký hiệu bằng tiền tố "D1" và các CDR của vùng liên kết kháng nguyên thứ hai có thể được ký hiệu bằng tiền tố "D2". Do đó, các CDR của vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất có thể được gọi là D1-HCDR1, D1-HCDR2 và D1-HCDR3; và các CDR của vùng liên kết kháng nguyên thứ hai có thể được gọi là D2-HCDR1, D2-HCDR2 và D2-HCDR3 trong tài liệu này.

Miền liên kết kháng nguyên thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai có thể được kết nối trực tiếp hoặc gián tiếp với nhau để tạo thành phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. Ngoài ra, mỗi miền liên kết kháng nguyên thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai có thể được liên kết với miền đa phân hóa riêng biệt. Sự liên kết của một miền đa phân hóa với một miền đa phân hóa khác tạo điều kiện cho sự liên kết giữa hai miền liên kết kháng nguyên, do đó hình thành phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép. Như được sử dụng trong tài liệu này, "miền đa phân hóa" là đại phân tử, protein, polypeptit, peptit hoặc axit amin có khả năng liên kết với miền đa phân hóa thứ hai của cấu trúc hoặc cấu tạo giống hoặc tương tự. Ví dụ, miền đa phân hóa có thể là polypeptit chứa miền C_H3 globulin miễn dịch. Ví dụ không giới hạn về thành phần đa phân hóa là phần Fc của globulin miễn dịch (bao gồm miền C_H2-C_H3), ví dụ, miền Fc của IgG được lựa chọn từ các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, cũng như các allotyp trong mỗi nhóm isotyp.

Các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế thường sẽ bao gồm hai miền đa phân hóa, ví dụ là mỗi trong số hai miền Fc là phần riêng biệt của chuỗi nặng của kháng thể riêng biệt. Miền đa phân hóa thứ nhất và thứ hai có thể có cùng isotype IgG như, ví dụ là IgG1/IgG1, IgG2/IgG2 và IgG4/IgG4. Ngoài ra, các miền đa phân hóa thứ nhất và thứ hai có thể là các isotyp IgG khác nhau, chẳng hạn như, ví dụ là IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4, v.v..

Theo một số phương án, miền phần đa phân hóa là mảnh Fc hoặc trình tự axit amin có độ dài từ 1 đến khoảng 200 axit amin chứa ít nhất một gốc cystein. Theo các phương án khác, miền đa phân hóa là gốc cystein, hoặc peptit ngắn chứa cystein. Các miền đa phân hóa khác chứa peptit hoặc polypeptit bao gồm hoặc chỉ bao gồm vùng khóa kéo leuxin, motif helix-thông lọng hoặc motif lõi được cuộn.

Định dạng hoặc kỹ thuật bất kỳ của kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng liên kết hóa học, dung hợp gen, kết hợp không cộng hóa trị hoặc các dạng khác) với một hoặc nhiều khác phân tử khác, như kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác có tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép. Ví dụ cụ thể về dạng đặc hiệu kép mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, dạng đặc hiệu kép thể đôi hoặc trên cơ sở scFv, dung hợp IgG-scFv, miền biến đổi kép (OVO)-Ig, Quadroma, bấm vào lỗ (knobs-into-holes), chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường bấm vào lỗ, v.v.), CrossMab, CrossFab, (SEEO)body, vùng khóa kéo leuxin, Ouobody, IgG1/IgG2, Fab (OAF)-IgG tác động kép, và dạng đặc hiệu kép Mab² (xem, ví dụ, Klein *et al.* 2012, *mAbs* 4:6, 1-11, và các tài liệu được trích dẫn trong bản mô tả này nhằm mục đích xem xét lại các dạng trước đây).

Trong phạm vi của các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu theo sáng chế, các miền đa phân hóa, ví dụ là vùng Fc, có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thay đổi axit amin (ví dụ là chèn, xóa bỏ hoặc thay thế) so với phiên bản kiểu đại, tồn tại trong tự nhiên của vùng Fc. Ví dụ, sáng chế bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm một hoặc nhiều sửa đổi trong vùng Fc dẫn đến vùng Fc được sửa đổi có tương tác liên kết được sửa đổi (ví dụ là tăng cường hoặc làm

giảm) giữa Fc và FcRn. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa sự biến đổi trong vùng C_H2 hoặc C_H3 , trong đó (các) biến đổi này làm tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong hạt cơ quan nội bào mà pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Ví dụ không giới hạn về các biến đổi Fc này bao gồm, ví dụ, biến đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); và 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, LN/FIW hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T) và 256 (ví dụ, S/R/Q/EID hoặc T); hoặc biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, UR/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc V); hoặc biến đổi ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, biến đổi bao gồm biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); biến đổi 428L, 2591 (ví dụ, V2591), và 308F (ví dụ, V308F); biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và biến đổi 434 (ví dụ, 434Y); biến đổi 252,254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, biến đổi T250Q và M428L); và 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

Sáng chế cũng bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm miền C_H3 thứ nhất và miền C_H3 Ig thứ hai, trong đó miền C_H3 Ig thứ nhất và thứ hai khác so với miền khác ở ít nhất một axit amin, và trong đó ít nhất một sự khác nhau về axit amin làm giảm việc liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác nhau về axit amin này. Theo một phương án, miền C_H3 Ig thứ nhất liên kết với Protein A và miền C_H3 Ig thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc ngăn ngừa sự liên kết với Protein A như biến đổi H95R (IMGT bằng phương pháp đếm exon; H435R bằng phương pháp đếm EU). C_H3 thứ hai có thể còn chứa sự biến đổi Y96F (bằng IMGT; Y436F bằng EU). Sự biến đổi khác nữa mà có thể thực hiện trong $CH3$ thứ hai bao gồm: D16E, L 18M, N44S, K52N, V57M, và V821 (bằng IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V4221 bằng EU) trong trường hợp là kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V821 (IMGT; N384S, K392N, và V4221 bằng EU) trong trường hợp là kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V821 (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V4221 bằng EU) trong trường hợp là kháng thể IgG4.

Theo một số phương án nhất định, vùng Fc có thể là thể khảm, kết hợp các trình tự Fc có nguồn gốc từ nhiều hơn một isotyp globulin miễn dịch. Ví dụ, vùng

Fc mã hóa có thể bao gồm một phần hoặc tất cả trình tự C_H2 có nguồn gốc từ IgG1 của người, IgG2 của người hoặc vùng C_H2 của IgG4 của người, và một phần hoặc tất cả trình tự C_H3 có nguồn gốc từ IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Vùng Fc thể khảm cũng có thể chứa vùng bản lề thể khảm. Ví dụ, vùng bản lề khảm có thể chứa trình tự của "vùng bản lề trên" được tạo ra từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được kết hợp với trình tự của "vùng bản lề dưới" được tạo ra từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Một ví dụ cụ thể về vùng Fc thể khảm có thể được bao gồm trong phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được nêu trong tài liệu này bao gồm, từ đầu N đến đầu C: [IgG4 C_{H1}] - [bản lề trên IgG4] - [bản lề dưới IgG2] - [IgG4 C_{H2}] - [IgG4 C_{H3}]. Một ví dụ khác về vùng Fc thể khảm có thể có trong phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được nêu trong tài liệu này bao gồm, từ đầu N đến đầu C: [IgG1 C_{H1}] - [bản lề trên IgG1] - [bản lề dưới IgG2] - [IgG4 C_{H2}] - [IgG1 C_{H3}]. Các ví dụ này và các ví dụ khác về miền Fc thể khảm có thể được bao gồm trong phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ nào theo sáng chế được mô tả trong WO2014/022540A1, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các vùng Fc thể khảm có sự sắp xếp cấu trúc chung này và các biến thể của chúng, có thể được thay đổi liên kết với thụ thể Fc, do đó ảnh hưởng đến chức năng tác động của Fc.

Biến thể trình tự

Các kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm và/hoặc bớt axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với trình tự dòng mầm tương ứng mà các vùng liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ đó. Các đột biến này có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó, một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ dòng mầm này, hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người, hoặc

đột biến thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các sự thay đổi trình tự như trên được đề cập trong đây gọi chung là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng sản xuất một lượng lớn kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên, mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng lẻ hoặc tổ hợp của các đột biến này. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng V_H và/hoặc V_L được gây đột biến quay trở lại các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà mảnh liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ một số gốc được gây đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1, hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến với các gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác (cụ thể là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà vùng liên kết kháng nguyên được tạo ra từ đó). Hơn nữa, vùng liên kết kháng nguyên sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hay nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng lẻ nhất định bị đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể, trong khi một số gốc khác có khác biệt với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được gây đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác. Sau khi thu hồi, các vùng liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được kiểm tra với một hoặc nhiều thuộc tính mong muốn như: cải thiện tính đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, cải thiện hoặc tăng cường các đặc tính đối vận hay đồng vận (như trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm một hoặc nhiều vùng liên kết kháng nguyên thu được theo cách này nói chung, được bao hàm trong sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên, trong đó một hoặc tất cả vùng liên kết kháng nguyên bao gồm biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều sự thể bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết kháng nguyên có trình tự axit amin của HCVR, LCVR,

và/hoặc CDR có, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. sự thay thế axit amin bảo toàn liên quan đến trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả ở đây. "Thay thế axit amin bảo thủ" là, trong đó một gốc axit amin được thay thế bởi một gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với các đặc điểm hóa học tương tự (ví dụ, mang điện tích hoặc kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo toàn về cơ bản sẽ không thay đổi tính năng của protein. Các ví dụ về nhóm axit amin có chuỗi bên có các thuộc tính hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên aliphatic: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên aliphatic-hydroxyl: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên vòng thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên bazơ: lyxin, arginin, và histidin; (6) chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh là cystein và metionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, sự thay thế bảo thủ là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bộc lộ trong Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. Sự thay thế "tương đối bảo toàn" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý.

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng liên kết kháng nguyên với trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR về cơ bản tương đồng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR được mô tả trong tài liệu này. Thuật ngữ "cơ bản tương đồng" hoặc "về cơ bản tương đồng", khi đề cập đến trình tự axit amin có nghĩa là hai trình tự axit amin, khi được sắp xếp một cách tối ưu, được xác định độ tương tự bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng trọng lượng khoảng trống mặc định, tìm ra được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất khoảng 98%, và 99%. Tốt hơn là, vị trí các gốc không tương đồng khác biệt bởi việc thay thế axit amin bảo thủ. Trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự thay thế bảo thủ, phần trăm độ tương đồng trình tự hoặc độ tương tự có thể được điều chỉnh lên cho đúng với bản chất bảo thủ của sự thay thế. Các phương pháp điều chỉnh đã được biết đến rộng rãi đối với người có hiểu biết trung

binh trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

Độ tương tự đối với polypeptit, cũng được đề cập như là độ tương đồng, thường được đo bằng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein nổi các trình tự tương tự sử dụng các biện pháp đo lường tương tự với việc thay thế, xóa bỏ hoặc các sửa đổi khác, bao gồm việc thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG bao gồm các chương trình như Gap và Bestfit, các phần mềm này có thể được sử dụng với thông số mặc định để xác định độ tương đồng trình tự hoặc độ đồng nhất trình tự giữa các polypeptit gần gũi, như các polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của sinh vật hoặc giữa protein kiểu đại và biến thể của nó. Xem, ví dụ, GCG phiên bản 6.1. Các chuỗi polypeptit cũng có thể được so sánh với nhau bằng FASTA sử dụng thông số mặc định hoặc thông số khuyến nghị, chương trình trong GCG ver.6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các sắp xếp và phần trăm độ tương đồng của vùng xếp chồng giữa trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Kỹ thuật giải được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Liên kết phụ thuộc độ pH

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD28/kháng CD22 và các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22, với các đặc điểm liên kết phụ thuộc vào độ pH. Ví dụ, kháng thể kháng CD28 theo sáng chế có thể làm giảm việc liên kết với CD28 ở pH axit khi so với pH trung tính. Ngoài ra, các kháng thể kháng CD22 theo sáng chế có thể biểu hiện tăng cường liên kết với CD22 ở pH axit so với pH trung tính. Thuật ngữ “pH axit” bao gồm các giá trị pH nhỏ hơn 6,2, ví dụ, khoảng 6,0; 5,95; 5,9; 5,85; 5,8; 5,75; 5,7; 5,65; 5,6; 5,55; 5,5; 5,45; 5,4; 5,35; 5,3; 5,25; 5,2; 5,15; 5,1; 5,05; 5,0; hoặc thấp hơn. Như được sử dụng ở đây, diễn đạt “pH trung tính” có nghĩa là độ pH khoảng 7,0 đến khoảng 7,4. Thuật ngữ “pH trung tính” bao gồm các giá trị pH khoảng 7,0; 7,05; 7,1; 7,15; 7,2; 7,25; 7,3; 7,35; và 7,4.

Trong một số trường hợp, "làm giảm liên kết với ... ở pH axit khi so với pH trung tính" được thể hiện theo tỷ lệ của giá trị K_D của kháng thể liên kết với kháng nguyên của nó ở pH axit đến giá trị K_D của kháng thể liên kết với kháng nguyên của nó ở pH trung tính (hoặc ngược lại). Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được xem là "làm giảm liên kết với CD28 ở pH axit khi so với pH trung tính" theo sáng chế nếu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có tỷ lệ K_D axit/trung hòa là khoảng 3,0 hoặc lớn hơn. Theo các phương án tiêu biểu nhất định, tỉ lệ K_D axit/trung tính của một kháng thể hay đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể khoảng 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5; 14,0; 14,5; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 100,0 hoặc lớn hơn.

Kháng thể có đặc điểm gắn kết phụ thuộc độ pH có thể thu hồi, ví dụ, bằng cách sàng lọc quần thể kháng thể giảm (hoặc tăng) gắn kết với một kháng nguyên cụ thể ở pH axit so với pH trung tính. Ngoài ra, việc biến đổi vùng gắn kết với kháng nguyên ở cấp axit amin có thể thu được kháng thể có đặc tính phụ thuộc độ pH. Ví dụ, việc thay thế một hoặc nhiều axit amin của vùng gắn kết với kháng nguyên (ví dụ, trong một CDR) bằng một gốc histidin giúp thu được kháng thể có đặc tính giảm gắn kết với kháng nguyên ở pH axit so với pH trung tính.

Kháng thể bao gồm các biến thể Fc

Theo một số phương án theo sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 được đề xuất chứa vùng Fc chứa một hoặc nhiều đột biến mà làm tăng hoặc làm giảm việc liên kết kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở pH axit khi so với pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên chứa đột biến trong vùng C_H2 hoặc C_H3 của vùng Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của vùng Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong hạt cơ quan nội bào trong đó pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến này có thể làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể khi được dùng cho động vật. Ví dụ không giới hạn về các biến đổi Fc này bao gồm, ví dụ, biến đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); và 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T) và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví

dụ, H/F hoặc Y); hoặc biến đổi ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, biến đổi bao gồm biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); biến đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và biến đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

Ví dụ, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 bao gồm vùng Fc chứa một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm của các đột biến được chọn lọc từ nhóm bao gồm: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả các dạng kết hợp có thể có của các vùng Fc đột biến trên đây, và đột biến khác trong vùng biến đổi của kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Đặc điểm sinh học của kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu

Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết CD28 và/hoặc CD22 của người với ái lực cao. Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết CD28 và/hoặc CD22 của người với ái lực trung bình hoặc thấp, tùy thuộc vào phạm vi điều trị và các đặc tính hướng đích cụ thể được mong muốn. Ví dụ, trong phạm vi của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép, trong đó một nhánh liên kết với CD28 và nhánh khác liên kết với kháng nguyên đích (ví dụ là CD22), nó có thể được mong muốn để nhánh liên kết kháng nguyên đích liên kết với kháng nguyên đích với ái lực cao trong khi nhánh kháng CD28 liên kết với CD28 chỉ với ái lực trung bình hoặc thấp. Theo cách này, có thể đạt được sự hướng đích ưu tiên của phân tử liên kết kháng nguyên vào tế bào biểu hiện kháng nguyên đích trong khi tránh được sự liên kết CD28 chung/không được hướng đích và các tác dụng phụ có hại gây ra từ đó.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết CD22 (ví dụ, ở 25°C) với K_D là nhỏ hơn

khoảng 15 nM khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD22 của người với K_D là nhỏ hơn khoảng 15 nM, nhỏ hơn khoảng 14 nM, nhỏ hơn khoảng 13 nM, nhỏ hơn khoảng 12 nM, nhỏ hơn khoảng 11 nM, nhỏ hơn khoảng 10 nM, nhỏ hơn khoảng 9 nM, nhỏ hơn khoảng 8 nM, nhỏ hơn khoảng 7 nM, nhỏ hơn khoảng 6 nM, nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 4 nM, nhỏ hơn khoảng 3 nM, nhỏ hơn khoảng 2 nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 1 nM, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết CD 22 của khí (*ví dụ*, ở 25°C) với K_D là nhỏ hơn khoảng 60 μ M khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD22 của khí với K_D là nhỏ hơn khoảng 60 μ M, nhỏ hơn khoảng 59 μ M, nhỏ hơn khoảng 58 μ M, nhỏ hơn khoảng 57 μ M, nhỏ hơn khoảng 56 μ M, nhỏ hơn khoảng 55 μ M, nhỏ hơn khoảng 54 μ M, nhỏ hơn khoảng 53 μ M, nhỏ hơn khoảng 52 μ M, nhỏ hơn khoảng 51 μ M, nhỏ hơn khoảng 50 μ M, nhỏ hơn khoảng 49 μ M, nhỏ hơn khoảng 48 μ M, nhỏ hơn khoảng 47 μ M, nhỏ hơn khoảng 46 μ M, nhỏ hơn khoảng 45 μ M, nhỏ hơn khoảng 44 μ M, nhỏ hơn khoảng 43 μ M, nhỏ hơn khoảng 42 μ M, nhỏ hơn khoảng 41 μ M, nhỏ hơn khoảng 40 μ M, nhỏ hơn khoảng 39 μ M, nhỏ hơn khoảng 38 μ M, nhỏ hơn khoảng 37 μ M, nhỏ hơn khoảng 36 μ M, nhỏ hơn khoảng 35 μ M, nhỏ hơn khoảng 34 μ M, nhỏ hơn khoảng 33 μ M, nhỏ hơn khoảng 32 μ M, nhỏ hơn khoảng 31 μ M, nhỏ hơn khoảng 30 μ M, nhỏ hơn khoảng 25 μ M, nhỏ hơn khoảng 20 μ M, nhỏ hơn khoảng 15 μ M, hoặc nhỏ hơn khoảng 10 μ M, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết CD28 của người (*ví dụ*, ở 25°C) với K_D là nhỏ hơn khoảng 45 μ M khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này. Theo các

phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD28 của người với K_D là nhỏ hơn khoảng 45 μM , nhỏ hơn khoảng 44 μM , nhỏ hơn khoảng 43 μM , nhỏ hơn khoảng 42 μM , nhỏ hơn khoảng 41 μM , nhỏ hơn khoảng 40 μM , nhỏ hơn khoảng 39 μM , nhỏ hơn khoảng 38 μM , nhỏ hơn khoảng 37 μM , nhỏ hơn khoảng 36 μM , nhỏ hơn khoảng 35 μM , nhỏ hơn khoảng 34 μM , nhỏ hơn khoảng 33 μM , nhỏ hơn khoảng 32 μM , nhỏ hơn khoảng 31 μM , nhỏ hơn khoảng 30 μM , nhỏ hơn khoảng 25 μM , nhỏ hơn khoảng 20 μM , nhỏ hơn khoảng 15 μM , nhỏ hơn khoảng 10 μM , khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết CD22 của người với chu kỳ bán rã phân ly ($t_{1/2}$) là lớn hơn khoảng 7,5 phút khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD22 của người với $a t_{1/2}$ là lớn hơn khoảng 7 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 15 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 25 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 35 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 45 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 55 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 65 phút, lớn hơn khoảng 70 phút, lớn hơn khoảng 75 phút, hoặc lớn hơn khoảng 100 phút, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết CD 22 của khỉ với chu kỳ bán rã phân ly ($t_{1/2}$) là lớn hơn khoảng 4,3 phút khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD28 với $t_{1/2}$ là lớn hơn khoảng 4 phút, lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 6 phút, lớn hơn khoảng 7 phút, lớn hơn khoảng 8 phút, lớn hơn khoảng 9 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 15 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 25 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn

khoảng 35 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 45 phút, hoặc lớn hơn khoảng 50 phút, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết CD28 của người với chu kỳ bán rã phân ly ($t_{1/2}$) là lớn hơn khoảng 2,3 phút khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD28 với $t_{1/2}$ là lớn hơn khoảng 2 phút, lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 70 phút, lớn hơn khoảng 80 phút, lớn hơn khoảng 90 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 200 phút, lớn hơn khoảng 300 phút, lớn hơn khoảng 400 phút, lớn hơn khoảng 500 phút, lớn hơn khoảng 600 phút, lớn hơn khoảng 700 phút, lớn hơn khoảng 800 phút, lớn hơn khoảng 900 phút, lớn hơn khoảng 1000 phút, hoặc lớn hơn khoảng 1200 phút, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép (*ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép) có khả năng liên kết với CD28 của người và CD22 của người và của khỉ. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế tương tác đặc hiệu với tế bào biểu hiện CD28 và/hoặc CD22. Mức độ mà phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với tế bào biểu hiện CD28 và/hoặc CD22 có thể được đánh giá bằng cách phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), như được minh họa trong Ví dụ 6 trong tài liệu này. Ví dụ, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với dòng tế bào của người hoặc tế bào của khỉ đuôi dài mà biểu hiện CD28 nhưng không biểu hiện CD22 (ví dụ, tế bào T), và dòng tế bào người hoặc tế bào khỉ đuôi dài biểu hiện CD22 nhưng không biểu hiện CD28 (*ví dụ*, tế bào B hoặc tế bào Nalm6). Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với tế bào bất kỳ trong số tế bào và dòng tế bào nêu trên với giá trị EC_{50} từ khoảng

$1,3 \times 10^{-6}$ đến khoảng $2,3 \times 10^{-8}$ M, hoặc nhỏ hơn, khi được xác định bằng thử nghiệm FACS như nêu ở Ví dụ 6 hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép (*ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép) có khả năng liên kết với CD28 của người và/hoặc CD22 của người. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế tương tác đặc hiệu với tế bào biểu hiện CD28 và/hoặc CD22. Mức độ mà phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với tế bào biểu hiện CD28 và/hoặc CD22 có thể được đánh giá bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy, như được minh họa trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này. Ví dụ, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu tế bào của người biểu hiện CD28 nhưng không biểu hiện CD22 (*ví dụ*, tế bào T), và dòng tế bào người biểu hiện CD22 nhưng không biểu hiện CD28 (*ví dụ*, tế bào HEK293 được tải nạp với CD22 của người và tế bào B Raji được biến đổi di truyền để loại bỏ CD80 và CD86). Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết tế bào bất kỳ trong số tế bào và dòng tế bào nêu trên với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ $1,14 \times 10^{-8}$ đến khoảng $9,76 \times 10^{-9}$ M, hoặc nhỏ hơn, như được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy như nêu ở Ví dụ 7 hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 tạo ra hoặc tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T CD20xCD3. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng CD28xCD22 kháng thể tạo ra hoặc làm tăng khả năng tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T CD20xCD3 với EC_{50} là nhỏ hơn khoảng $1,48 \times 10^{-10}$ M, như được xác định trong thử nghiệm tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T *in vitro*, *ví dụ*, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 8 trong bản mô tả này (*ví dụ*, đánh giá mức độ tiêu diệt tế bào Raji bởi PBMC của người khi có mặt kháng thể kháng CD20xCD3 và kháng CD28xCD22), hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế gây ra sự tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T (*ví dụ*, tiêu diệt tế bào Raji qua trung gian PBMC) với giá trị EC_{50} là nhỏ hơn khoảng 150 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 75 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 25 pM, nhỏ hơn khoảng 10 pM, nhỏ hơn khoảng 5,0 pM, nhỏ hơn khoảng 4,0 pM, nhỏ hơn

khoảng 3,0 pM, nhỏ hơn khoảng 2,5 pM, nhỏ hơn khoảng 2,0 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 1,5 pM, như được đo bằng thử nghiệm tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T *in vitro*, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 8 trong bản mô tả này, hoặc hoặc các thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 có một hoặc nhiều đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm: hoạt hóa tế bào T, gây giải phóng IL-2, gây điều hòa tăng CD25⁺ ở PBMC của người; và tăng khả năng gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của người trên dòng tế bào biểu hiện CD22 (xem, ví dụ, Ví dụ 9 trong bản mô tả này). Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 tăng cường sự tiêu diệt tế bào khối u biểu hiện CD22 khi kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép liên kết CD20 và CD3, như, nhưng không giới hạn ở, REGN1979. Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 tăng cường sự tiêu diệt tế bào khối u biểu hiện CD22 khi kết hợp với kháng thể liên kết PD-1, như, nhưng không giới hạn ở, cemiplimab. (Xem Ví dụ 10-15).

Lập bản đồ quyết định kháng nguyên và các kỹ thuật liên quan

Các quyết định kháng nguyên trên CD28 hoặc CD22 mà các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết có thể chỉ chứa một trình tự liên tục của 3 hoặc nhiều (ví dụ là 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) axit amin của protein CD28 hoặc CD22. Ngoài ra, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các axit amin không liên tiếp (hoặc trình tự axit amin) của CD28 hoặc CD22. Kháng thể theo sáng chế có thể tương tác với axit amin có trong monome CD28, hoặc có thể tương tác với axit amin trên hai chuỗi CD28 khác nhau của dime CD28. Thuật ngữ "quyết định kháng nguyên" đề cập đến quyết định kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của kháng thể phân tử đã biết như paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Quyết định kháng nguyên có thể là lập thể hoặc thẳng. Quyết định kháng nguyên lập thể được tạo ra bởi các axit amin kề nhau về mặt không gian từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Quyết định kháng nguyên thẳng là quyết định

kháng nguyên được tạo ra bằng các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Trong một số trường hợp, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các gốc saccarit, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định việc vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật ví dụ có thể được sử dụng để xác định quyết định kháng nguyên hoặc vùng liên kết của kháng thể hoặc vùng liên kết kháng nguyên cụ thể bao gồm, ví dụ, kỹ thuật phong bế mang đường như được mô tả trong *Antibodies*, Harlow và Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), gây đột biến điểm (ví dụ, gây đột biến alanin, gây đột biến arginin, *etc.*), phân tích thâm peptit (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), bảo vệ proteaza và phân tích cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, chiết quyết định kháng nguyên và biến đổi hóa học của kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với là phương pháp trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng khối phổ. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm đánh dấu đoteri vào protein cần quan tâm, sau đó gắn kháng thể với protein đã được gắn nhãn đoteri. Tiếp theo, phức hệ protein/kháng thể được chuyển vào nước để cho phép trao đổi hydro-đoteri nhằm tiến hành loại bỏ tất cả các gốc trừ các gốc được kháng thể bảo vệ (còn lại các gốc có gắn nhãn đoteri). Sau quá trình phân ly của kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và được phân tích khối phổ, qua đó bộc lộ các gốc được đánh dấu bằng đoteri tương ứng với axit amin cụ thể có tương tác với kháng thể. Xem, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Phương pháp phân tích cấu trúc tinh thể bằng tia X cũng được sử dụng để nhận diện axit amin nằm trong polypeptit có tương tác với kháng thể.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD28 và kháng CD22 liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể về kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin như được nêu ở Bảng 6 trong bản mô tả này).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết quyết định kháng nguyên trên CD22 của người chứa một hoặc nhiều axit amin của SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, và/hoặc SEQ ID NO:36 như được xác định bởi sự trao đổi hydro/đơteri được phát hiện bởi khối phổ như nêu ở Ví dụ 3 và 4.

Tương tự, sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng CD28 và/hoặc kháng CD22 cạnh tranh liên kết với CD28 và/hoặc CD22 với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ* kháng thể chứa trình tự axit amin bất kỳ như được nêu ở Bảng 6 trong bản mô tả này).

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 của người, và mảnh liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 của người, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên CD28 như miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu CD28 ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên CD22 như miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu CD22 ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này.

Tương tự, sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 của người, và mảnh liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu CD22 của người, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất cạnh tranh liên kết với CD28 với miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu CD28 ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai cạnh tranh liên kết với CD22 với miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu CD22 ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này.

Người ta có thể dễ dàng xác định xem một phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu (ví dụ là kháng thể) hoặc vùng liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như, hoặc cạnh tranh để liên kết với, phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu của sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, để xác định nếu kháng thể thử nghiệm liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên CD28 (hoặc CD22)

nghư một phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu theo sáng chế, trước tiên phân tử đặc hiệu kép đã nêu được phép liên kết với protein CD28 (hoặc protein CD22). Tiếp theo, khả năng của kháng thể thử nghiệm liên kết với phân tử CD28 (hoặc CD22) được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với CD28 (hoặc CD22) sau khi liên kết bão hòa với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với quyết định kháng nguyên khác của CD28 (hoặc CD22) hơn là với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không thể liên kết với phân tử CD28 (hoặc CD22) sau khi liên kết bão hòa với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên của CD28 (hoặc CD22) như là quyết định kháng nguyên được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu theo sáng chế. Sau đó, có thể thực hiện các thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, gây đột biến peptit và phân tích liên kết) để xác định việc không quan sát thấy sự liên kết của kháng thể thử nghiệm là do việc liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu hoặc nếu sự phong bế về mặt không gian (hoặc hiện tượng khác) gây ra việc không quan sát thấy sự liên kết. Các thí nghiệm loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp như ELISA, RIA, Biacore, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc bất kỳ các phương pháp định tính, hoặc định lượng khác có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một số phương án của sáng chế, hai protein liên kết kháng nguyên liên kết với cùng một (hoặc trùng khớp) quyết định kháng nguyên nếu, ví dụ, dư lượng 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một protein liên kết kháng nguyên ức chế việc liên kết của kháng thể khác bằng ít nhất 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% như được xác định trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (xem, ví dụ, Junghans et al., Cancer Res. 1990;50:1495-1502). Ngoài ra, hai protein liên kết kháng nguyên được coi là liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một protein liên kết kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể khác. Hai protein liên kết kháng nguyên được coi là “xếp chồng quyết định kháng nguyên” nếu chỉ có một nhóm các đột biến axit amin làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một protein liên kết kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể khác.

Để xác định liệu kháng thể hoặc vùng liên kết kháng nguyên của chúng có cạnh tranh để liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu, phương pháp liên kết được mô tả ở trên được thực hiện theo hai hướng: Theo hướng thứ nhất, phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu được cho liên kết với protein CD28 (hoặc protein CD22) trong các điều kiện bão hòa, sau đó là đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử CD28 (hoặc CD22). Theo định hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho liên kết với phân tử CD28 (hoặc CD22) trong điều kiện bão hòa, sau đó là đánh giá khả năng liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu với phân tử CD28 (hoặc CD22). Nếu, trong cả hai hướng, chỉ có phân tử liên kết kháng nguyên thứ nhất (bão hòa) có khả năng liên kết với phân tử CD28 (hoặc CD22), thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu cạnh tranh để liên kết với CD28 (hoặc CD22). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng kháng thể cạnh tranh liên kết với protein liên kết kháng nguyên đã nêu có thể không cần liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế không gian bằng cách liên kết quyết định kháng nguyên xếp chồng hoặc liên kề.

Điều chế vùng liên kết kháng nguyên và xây dựng phân tử đặc hiệu kép

Vùng liên kết kháng nguyên đặc hiệu với các kháng nguyên cụ thể có thể được điều chế bằng công nghệ tạo kháng thể bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Sau khi thu được, hai vùng liên kết kháng nguyên khác nhau, đặc hiệu với hai kháng nguyên khác nhau (ví dụ là CD28 và CD22), có thể được sắp xếp một cách thích hợp với nhau để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. sử dụng các phương pháp thông thường. (Phần thảo luận về các dạng kháng thể đặc hiệu kép ví dụ có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế được đề cập ở nơi khác trong tài liệu này). Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều thành phần riêng lẻ (ví dụ là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) của các phân tử liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế có nguồn gốc từ các kháng thể khảm, nhân hóa hoặc hoàn toàn ở người. Phương pháp tạo ra các kháng thể như vậy đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này. Ví dụ, một hoặc nhiều chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được điều chế bằng công nghệ VELOCIMMUNE™. Sử dụng

công nghệ VELOCIMMUNE™ (hoặc công nghệ tạo kháng thể của người bất kỳ khác), các kháng thể khảm có ái lực cao đối với kháng nguyên cụ thể (ví dụ là CD28 hoặc CD22) ban đầu được phân lập có vùng biến đổi ở người và vùng hằng định ở chuột. Các kháng thể được mô tả đặc điểm và lựa chọn theo các đặc điểm mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v.. Các vùng hằng định ở chuột được thay thế bằng vùng hằng định mong muốn ở người để tạo ra chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ hoàn toàn ở người có thể kết hợp vào phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế.

Động vật biến đổi gen có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu ở người. Ví dụ, có thể sử dụng chuột biến đổi gen không có khả năng tái sắp xếp và biểu hiện trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch nội sinh ở chuột, trong đó chuột chỉ biểu hiện một hoặc hai vùng biến đổi chuỗi nhẹ ở người được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch ở người được liên kết hoạt động với gen kapa cố định ở chuột ở locut kapa nội sinh ở chuột. Chuột biến đổi gen này có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ở người hoàn toàn bao gồm hai chuỗi nặng khác nhau liên kết với chuỗi nhẹ giống nhau bao gồm vùng biến đổi có nguồn gốc từ một trong hai đoạn gen vùng biến đổi chuỗi nhẹ ở người khác nhau. (Xem, ví dụ, US 2011/0195454, toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách tham khảo, để thảo luận chi tiết về chuột được biến đổi như vậy và sử dụng chúng để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép).

Tương đương sinh học

Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên có trình tự axit amin khác với trình tự của các phân tử được mô tả nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết CD28 và/hoặc CD22. Các phân tử biến thể như vậy chứa một hoặc nhiều sự thêm, bớt, hoặc thay thế axit amin khi so với trình tự ban đầu, nhưng có hoạt tính sinh học mà về cơ bản tương đương với hoạt tính sinh học của các phân tử liên kết kháng nguyên được mô tả. Tương tự, trình tự ADN mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm trình tự chứa một hoặc nhiều sự thêm, bớt hoặc thay thế nucleotit so với trình tự đã được bộ lộ, tuy nhiên mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên về cơ bản tương đương sinh học với phân tử liên kết kháng nguyên được mô

tả theo sáng chế. Các ví dụ về trình tự ADN và axit amin biến đổi được thảo luận ở trên.

Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên tương đương sinh học với phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được nêu trong tài liệu này. Hai protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể, được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng tương đương về mặt được dụng hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng mà tốc độ và mức độ hấp thụ không có sự khác biệt đáng kể khi được sử dụng ở cùng một liều lượng mol dưới điều kiện thí nghiệm tương tự, cùng liều đơn hoặc đa liều. Một số kháng thể sẽ là được xem là tương đương hoặc có thể thay thế lẫn nhau về mặt được dụng nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng khác nhau về tốc độ hấp thụ và còn có thể được xem là tương đương sinh học vì sự khác biệt về tốc độ hấp thụ là do có chủ đích và được tạo ra trong quá trình đánh dấu, không nhất thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu trong cơ thể đối với, ví dụ, sử dụng mạn tính, và được xem là không khác nhau đáng kể về mặt y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên tương đương sinh học nếu không có sự khác nhau đáng kể về mặt lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể thay đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm đối chứng và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ tác dụng phụ có hại, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng trong tính sinh miễn dịch, hoặc làm giảm hiệu lực so với liệu pháp trị liệu liên tục mà không thực hiện sự thay đổi này.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu cả hai đều tác động theo một cơ chế chung hoặc cơ chế tác động đối với điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, trong phạm vi mà cơ chế này đã được biết đến.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* hoặc *in vitro*. Phương pháp xác định tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được xác định trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác dưới dạng hàm theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà

tương ứng với và được cho là phù hợp với dữ liệu độ sinh khả dụng ở người *in vivo*; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc khác động vật có vú trong đó tác dụng dược lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định dưới dạng hàm theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng để đối chứng mà xác định độ an toàn, hiệu lực, hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Biến thể tương đương sinh học của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ví dụ theo sáng chế có thể được cấu thành bởi, ví dụ, việc tạo nhiều đột biến thay thế các gốc hay trình tự hoặc việc xóa các gốc ở đầu hoặc ở giữa hoặc các trình tự không cần cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, gốc cystein không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế với các axit amin khác để ngăn chặn sự hình thành cầu nối disulfua trong phân tử không cần thiết hoặc không chính xác trong quá trình hội tính. Trong các ngữ cảnh khác, kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ví dụ được nêu trong bản mô tả này chứa sự thay đổi axit amin làm biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, đột biến mà ngăn ngừa hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Tính chọn lọc loài và phản ứng chéo loài

Sáng chế, theo các phương án nhất định, đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với CD28 của người nhưng không liên kết với CD28 từ các loài khác. Sáng chế còn đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với CD22 của người nhưng không liên kết với CD22 từ các loài khác. Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với CD28 của người và với CD28 từ một hoặc nhiều loài không phải người; và/hoặc phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với CD22 của người và với CD22 từ một hoặc nhiều loài không phải người.

Theo một số phương án ví dụ của sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên được đề xuất liên kết với CD28 và/hoặc CD22 ở người và có thể liên kết hoặc không liên kết, tùy từng trường hợp, với một hoặc nhiều CD28 và/hoặc CD22 của chuột, chuột lang, chuột đồng, chuột nhắt, lợn, mèo, chó, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ đuôi dài, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh. Ví dụ, theo một phương án ví dụ cụ thể của sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được đề xuất chứa vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết với CD28 của người và vùng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với CD22 của người.

Liên hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên được liên hợp với gốc tri liệu ("liên hợp miễn dịch"), như độc tố tế bào, thuốc hóa trị liệu, thuốc ức chế miễn dịch hoặc đồng vị phóng xạ. Tác nhân gây độc tế bào bao gồm bất kỳ tác nhân nào gây hại cho tế bào. Ví dụ về các tác nhân gây độc tế bào và chất hóa trị liệu để tạo ra liên hợp miễn dịch đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, (xem, ví dụ, WO 05/103081, toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Bào chế và sử dụng trong tri liệu

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế với các chất mang thích hợp, các tá dược, và các tác nhân khác giúp cải thiện việc chuyển nhiễm, phát tán, độ dung nạp và các đặc tính tương tự khác. Nhiều công thức bào chế thích hợp có thể được tìm thấy trong tập công thức và được tất cả nhà hóa dược biết đến: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Những công thức này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, thạch, sáp, dầu, chất béo, chất béo (cationic hoặc anionic) gồm các hạt (như LIPOFECTINTM, Life Technologies, Carlsbad, CA), liên hợp ADN, bột nhão hấp thụ khan, hệ nhũ tương dầu-trong-nước và nước-trong-dầu, hệ nhũ tương carbowax (polyetylen glycol của nhiều trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, hỗn hợp bán rắn chứa carbowax. Ngoài ra, xem, Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

Liều phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng đối với bệnh nhân có thể thay đổi phụ thuộc vào tuổi và thể trọng của bệnh nhân, đích bệnh, tình trạng bệnh lý, đường sử dụng, và yếu tố tương tự. Liều dùng được tính ưu tiên theo trọng lượng cơ thể hoặc diện tích về mặt cơ thể. Khi phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế được sử dụng cho mục đích điều trị ở một bệnh nhân trưởng thành, việc tiêm vào tĩnh mạch phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có vẻ thuận lợi hơn, thông thường, một liều khoảng 0,01 đến khoảng 20 mg/kg trọng lượng cơ thể, hoặc hơn nữa khoảng 0,02 đến khoảng 7, khoảng 0,03 đến khoảng 5, hoặc

khoảng 0,05 đến khoảng 3 mg/kg trọng lượng cơ thể. Phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Lịch trình và liều lượng hiệu quả sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép có thể được xác định dựa theo kinh nghiệm; ví dụ, sự cải thiện bệnh của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng việc đánh giá định kỳ, và có điều chỉnh liều cho phù hợp. Hơn nữa, việc xác định thang khác loài của liều lượng có thể được thực hiện bằng các phương pháp phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Ví dụ, các hệ phân phối đã biết và có thể được sử dụng để dùng dược phẩm theo sáng chế bao gồm, ví dụ, bao trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Các phương pháp đưa dược phẩm vào bao gồm, nhưng không hạn chế, trong da, trong cơ, trong bụng, trong ven, dưới da, qua mũi, gây tê ngoài màng cứng, và qua đường uống. Chế phẩm có thể được sử dụng theo đường thông dụng bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh một liều, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu bì hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc cục bộ.

Dược phẩm của sáng chế có thể được tiêm dưới da hoặc trong ven bằng một ống tiêm và mũi kim tiêu chuẩn. Ngoài ra, đối với việc đưa thuốc vào dưới da, thiết bị đưa thuốc vào dạng bút được áp dụng để đưa dược phẩm của sáng chế vào cơ thể bệnh nhân. Thiết bị đưa thuốc vào dạng bút có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần. Thiết bị đưa thuốc vào dạng bút tái sử dụng thường dùng vỏ có thể thay thế chứa dược phẩm. Khi tất cả dược phẩm trong hộp chứa được sử dụng và hộp chứa rỗng, thì hộp chứa rỗng có thể được loại bỏ một cách dễ dàng và được thay bằng hộp chứa mới mà chứa dược phẩm. Thiết bị đưa thuốc vào dạng bút sau đó có thể được tái sử dụng. Đối với thiết bị đưa thuốc vào dạng bút dùng một lần thì không có vỏ thay thế. Đúng hơn là, thiết bị đưa thuốc vào dạng bút dùng một lần đóng sẵn dược phẩm trong một chỗ chứa bên trong thiết bị. Khi ngăn chứa hết dược phẩm, toàn bộ thiết bị sẽ bị vứt bỏ.

Các bút tái sử dụng lại và thiết bị phân phối tự tiêm có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn

ở AUTOPENTM (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONICTM (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25TM, bút HUMALOGTM, bút HUMALIN 70/30TM (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPENTM I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIORTM (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BDTM (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPENTM, OPTIPEN PROTM, OPTIPEN STARLETTM, và OPTICLIKTM (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), chỉ nêu tên một vài thiết bị. Ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần có thể được sử dụng để phân phối được phẩm theo sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không giới hạn ở bút SOLOSTARTM (Sanofi-Aventis), FLEXPENTM (Novo Nordisk), và KWIKPENTM (Eli Lilly), SURECLICKTM Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLETTM (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và HUMIRATM Pen (Abbott Labs, Abbott Park IL), chỉ nêu tên một vài thiết bị.

Trong một số trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong hệ giải phóng có đối chứng. Theo một phương án, ống bơm có thể được sử dụng (tham khảo Langer, ở trên; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). Theo một phương án khác, các vật liệu polymeric có thể được sử dụng; tham khảo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer và Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Theo các phương án khác nữa, hệ giải phóng có đối chứng có thể được đặt ở vị trí lân cận với đích của dược phẩm, do đó chỉ cần sử dụng một phần của liều toàn thân (xem, ví dụ, Goodson, 1984, trong cuốn *Medical Applications of Controlled Release, supra*, vol. 2, pp. 115-138). Các hệ thống giải phóng có kiểm soát khác được thảo luận trong bài đánh giá của Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Dược phẩm tiêm có thể bao gồm dạng liều để tiêm trong tĩnh mạch, dưới da, trong da và trong cơ, truyền nhỏ giọt, v.v. Các dược phẩm tiêm này có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, dược phẩm tiêm có thể được điều chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, phân tán hoặc tạo nhũ tương kháng thể hoặc muối của nó được mô tả trên đây trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu thường được sử dụng để tiêm. Ví dụ, môi trường nước để tiêm có thể bao gồm nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và chất phụ trợ khác, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất làm hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), polyalcohol

(ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (sản phẩm cộng polyoxyetylen (50 mol) của dầu thầu dầu được hydro hóa)], v.v.. Môi trường dầu có thể sử dụng bao gồm, ví dụ, dầu vừng, dầu đậu tương, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất làm tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Do đó, tốt hơn nếu được phẩm tiêm được điều chế được làm đầy trong ống thuốc tiêm thích hợp.

Tốt hơn là, dược phẩm để sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả trên đây được điều chế ở dạng liều ở liều đơn vị được làm thích hợp cho liều chứa thành phần hoạt tính. Dạng liều này ở dạng liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên thuốc, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v. lượng kháng thể trên đây có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 500 mg mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng tiêm. Tốt hơn là nếu kháng thể trên đây có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100 mg và nằm trong khoảng từ 10 đến 250 mg đối với dạng liều khác.

Công dụng trị liệu của phân tử liên kết kháng nguyên

Sáng chế bao gồm phương pháp bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu dùng phương pháp này dùng chế phẩm trị liệu chứa kháng thể kháng CD28 hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu CD28 và kháng nguyên đích (ví dụ, CD22). Chế phẩm điều trị có thể bao gồm kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bất kỳ theo sáng chế và chất mang hoặc chất độn được dùng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng có nhu cầu dùng phương pháp này" có nghĩa là đối tượng là động vật không phải con người hoặc là người có một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh ung thư (ví dụ, đối tượng có khối u hoặc mắc bệnh ung thư bất kỳ được nêu dưới đây), hoặc nếu không đối tượng sẽ hưởng lợi từ sự ức chế hoặc giảm hoạt tính CD22 hoặc sự suy yếu của tế bào CD22+.

Các kháng thể và các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế (và các chế phẩm trị liệu chứa chúng) rất hữu ích, ngoài ra, để điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ trong đó kích thích, hoạt hóa và/hoặc hướng đích đáp ứng miễn dịch theo hướng có lợi. Cụ thể, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa

và/hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan hoặc được điều tiết bởi sự biểu hiện của CD22 hoặc hoạt tính hoặc sự tăng sinh của tế bào CD22+. Cơ chế hoạt động mà các phương pháp điều trị theo sáng chế đạt được bao gồm tiêu diệt tế bào biểu hiện CD22 khi có mặt của tế bào phản ứng kích thích, ví dụ, tế bào T. Tế bào biểu hiện CD22 có thể bị ức chế hoặc bị tiêu diệt bằng cách sử dụng các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tế bào B ung thư.

Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, ví dụ, khối u sơ cấp và/hoặc di căn từ máu, tủy xương, hạch bạch huyết, (ví dụ, tuyến ức, lá lách), bệnh ung thư kết tràng, gan, phổi, vú, thận, hệ thần kinh trung ương, và bệnh ung thư bàng quang. Theo các phương án ví dụ nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế được sử dụng để điều trị rối loạn tăng sinh tế bào B.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp điều trị ung thư tồn lưu ở đối tượng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ung thư tồn lưu" có nghĩa là có nghĩa là sự tồn tại hoặc tồn lưu của một hoặc nhiều tế bào ung thư ở đối tượng sau khi điều trị với liệu pháp chống ung thư.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện CD22 (ví dụ, rối loạn tăng sinh tế bào B) bao gồm bước cho đối tượng dùng một hoặc nhiều phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được mô tả ở phần khác trong bản mô tả này sau khi đối tượng thể hiện sự không đáp ứng với các loại liệu pháp chống ung thư khác. Ví dụ, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm bước cho bệnh nhân dùng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 vào 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần hoặc 4 tuần, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng, 8 tháng, 1 năm, hoặc lâu hơn sau khi đối tượng tiếp nhận tiêu chuẩn chăm sóc cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư, ví dụ, rối loạn tăng sinh tế bào B. Theo khía cạnh khác, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế (phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22) chứa miền Fc IgG4 bắt đầu được dùng cho đối tượng ở một hoặc hai thời điểm (ví dụ, để tạo ra sự suy yếu mạnh ban đầu tế bào ung thư tuyến tiền liệt), sau đó dùng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép tương đương chứa miền IgG khác, như miền Fc IgG1, ở các thời điểm sau đó. Có thể hình dung rằng kháng thể kháng

CD28/kháng CD22 theo sáng chế có thể được sử dụng liên hợp với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép, như với kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20/kháng CD3. Có thể hình dung rằng kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế sẽ được sử dụng liên hợp với chất ức chế điểm kiểm tra, ví dụ, chất hướng đích PD-1 và CTLA-4, và các đích khác. Có thể có lợi khi kết hợp hai kháng thể đặc hiệu kép hướng đích cùng một kháng nguyên khối u (ví dụ, CD22), nhưng với một trong số đặc hiệu kéo hướng đích CD3 trên tế bào T và hướng đích đặc hiệu kép phân tử đồng kích thích như CD28. Kết hợp này có thể được sử dụng một mình để tăng cường sự tiêu diệt tế bào khối u, hoặc có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế điểm kiểm tra.

Bào chế và liệu pháp điều trị kết hợp

Sáng chế bao gồm chế phẩm và dạng bào chế trị liệu chứa kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ví dụ được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung, và phương pháp điều trị bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu dùng phương pháp này dùng kết hợp này.

Tác nhân điều trị bổ sung ví dụ có thể được kết hợp với hoặc được dùng kết hợp với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm, ví dụ, hóa trị, xạ trị, chất ức chế điểm kiểm tra hướng đích PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như pembrolizumab, nivolumab, hoặc cemiplimab, xem US9,987,500, HCVR/LCVR của SEQ ID NO 162/170), CTLA-4, LAG3, TIM3, và kháng thể khác, kháng thể hóa trị hai chủ vận đồng kích thích hướng đích phân tử như GITR, OX40, 4-1BB, và kháng thể khác, CD3x kháng thể đặc hiệu kép (Xem ví dụ US9,657,102 (REGN1979), WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 và WO2018/058001A1), kháng thể khác hướng đích CD22 X CD3, CD22 X CD28, hoặc hướng đích CD20 X CD3 và kháng thể CD28x đặc hiệu kép đồng kích thích khác.

Các tác nhân khác có thể được dùng một cách hiệu quả kết hợp với kháng thể theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tamoxifen, chất ức chế aromataza, và chất ức chế cytokin, bao gồm chất ức chế cytokin phân tử nhỏ và kháng thể liên kết với cytokin như IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, hoặc với thụ thể tương ứng của chúng. Dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng CD28/kháng CD22 như

được bộc lộ trong bản mô tả này) cũng có thể được dùng làm một phần của phác đồ trị liệu bao gồm một hoặc nhiều kết hợp trị liệu được chọn từ "ICE": ifosfamid (ví dụ, Ifex®), carboplatin (ví dụ, Paraplatin®), etoposide (ví dụ, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": dexamethason (ví dụ, Decadron®), cytarabin (ví dụ, Cytosar-U®, cytosin arabinosit, ara-C), cisplatin (ví dụ, Platinol®-AQ); và "ESHAP": etoposid (ví dụ, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), metylprednisolon (ví dụ, Medrol®), cytarabin liều cao, cisplatin (ví dụ, Platinol®-AQ).

Sáng chế còn bao gồm kết hợp trị liệu chứa phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này và chất ức chế của một hoặc nhiều trong số VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1 R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1, PRLR, STEAP1, STEAP2, Tmprss2, MSLN, CA9, uroplakin, hoặc cytokin bất kỳ nêu trên, trong đó chất ức chế là aptame, phân tử đối nghĩa, ribozym, siARN, thể peptit, thể nano hoặc mảnh kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab; mảnh F(ab')₂; mảnh Fd; mảnh Fv; scFv; mảnh dAb; hoặc phân tử được thiết kế khác, như thể hai, thể ba, thể bốn, thể mini và đơn vị nhận diện tối thiểu). Các phân tử liên kết với kháng nguyên theo sáng chế cũng có thể được sử dụng và/hoặc đồng công thức kết hợp với thuốc kháng virus, thuốc kháng sinh, thuốc giảm đau, corticosteroid và/hoặc NSAID. Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể còn được dùng làm một phần của phác đồ điều trị mà còn bao gồm xạ trị và/hoặc hóa trị thông thường, hoặc điều trị với sinh vật học, bao gồm chất ức chế điểm kiểm tra hoặc kháng thể đặc hiệu kép khác.

Sáng chế bao gồm chế phẩm và dạng bào chế trị liệu chứa phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với một hoặc nhiều chất hóa trị liệu. Ví dụ về chất hóa trị liệu bao gồm tác nhân alkyl hóa như thiotepea và cyclophosphamid (CytosanTM); alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenemelamin, trietylenephosphoramit, trietylthiophosphoramit và trimetylolomelamin; nitrogen mustards như clorambuxin, clornaphazin, chlophosphamid, estramustin, ifosfamid, meclorethamin, meclorethamin oxit hydroclorit, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, uraxin mustard; nitrosure như carmustin,

clorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; kháng sinh như aclaxinomysin, actinomycin, authramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, calicheamixin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin, epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomycin, mitomycin, mycophenolic axit, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxitin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; kháng metabolites như metotrexat và 5-flouraxin (5-FU); chất tương tự axit folic như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; pyrimidin analogs như ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, ditoxurydin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; vàrogen như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; chất kháng adrenal như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất độn axit folic như axit frolinic; aceglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabuxin; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziqun; elfornithin; elliptinium axetat; etogluxit; gallium nitrat; hydroxyurea; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK™; razoxan; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziqun; 2,2',2"-trichlorotrietylamin; uretan; vindesin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosin; arabinosit ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; taxan, ví dụ paclitaxel (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) và docetaxel (Taxotere™, Aventis Antony, France); clorambuxin; gemcitabin; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; chất tương tự bạch kim như cisplatin và carboplatin; vinblastin; platinum; etoposit (VP-16); ifosfamid; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposit; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; difluorometylnithin (DMFO); axit retinoic; esperamixin; capecitabin; và muối được dùng, axit hoặc dẫn xuất của chúng. Cũng bao gồm trong định nghĩa này là các tác nhân kháng nội tiết tố giữ vai trò điều hòa hoặc ức chế hoạt động hormone lên khối u như kháng estrogen bao gồm, ví dụ, tamoxifen, raloxifen, aromataza ức chế 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen,

trioxifen, keoxifen, LY 117018, onapriston, và toremifen (Fareston); và kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; và các axit, muối nhận được học hoặc các dẫn xuất từ các chất bất kỳ ở trên.

(Các) thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được sử dụng ngay trước khi, đồng thời với hoặc ngay sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế; (đối với mục đích của sáng chế này, phác đồ dùng thuốc như trên được coi là việc sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên "kết hợp với" thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung).

Sáng chế bao gồm được phẩm trong đó phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được bào chế cùng với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính trị liệu bổ sung như được mô tả trong các phần khác của bản mô tả này.

Phác đồ dùng thuốc

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, đa liều của phân tử liên kết kháng nguyên (ví dụ là kháng thể kháng CD28 hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với CD22 và CD28) có thể được sử dụng cho đối tượng trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cho đối tượng dùng liên tục đa liều phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Như được sử dụng trong tài liệu này, "sử dụng liên tục" có nghĩa là mỗi liều của phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng cho đối tượng ở các thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau được tách riêng bằng khoảng thời gian xác định (ví dụ, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế bao gồm phương pháp bao gồm việc cho bệnh nhân sử dụng liên tục liều duy nhất bắt đầu của phân tử liên kết kháng nguyên, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thứ hai của phân tử liên kết kháng nguyên, và theo tùy chọn là một hoặc nhiều liều thứ ba của phân tử liên kết kháng nguyên.

Các thuật ngữ "liều ban đầu", "liều thứ hai" và "liều thứ ba" đề cập đến trình tự thời gian sử dụng của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Do đó, "liều ban đầu" là liều mà được sử dụng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị (còn gọi là "liều cơ sở"); "liều thứ hai" là liều mà được sử dụng sau liều thứ nhất; và "liều thứ ba" là liều mà được sử dụng sau liều thứ hai. Tất cả các liều ban đầu, thứ hai và thứ ba đều có thể chứa cùng một lượng phân tử liên kết kháng nguyên, nhưng nhìn

chung có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, lượng phân tử liên kết kháng nguyên có trong liều ban đầu, thứ hai và/hoặc thứ ba thay đổi khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh nhiều hoặc ít sao cho thích hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được dùng tại thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị làm "liều nạp" sau đó là liều tiếp theo mà được sử dụng trên cơ sở tần suất sử dụng ít hơn (ví dụ, "liều duy trì").

Theo một số phương án cụ thể của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được sử dụng từ 1 đến 26 (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc nhiều) tuần sau liều ngay trước. Thuật ngữ "liều mới sử dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là, trong trình tự của việc sử dụng nhiều liều, liều chứa phân tử liên kết kháng nguyên, mà được sử dụng cho bệnh nhân trước khi sử dụng của liều tiếp theo trong trình tự mà không có liều xen giữa.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm cho bệnh nhân sử dụng số lượng bất kỳ của liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba của phân tử liên kết kháng nguyên (ví dụ là kháng thể kháng CD28 hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với CD22 và CD28). Ví dụ, theo một số phương án, chỉ một liều thứ hai được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều) liều thứ hai được dùng cho bệnh nhân. Tương tự, theo một số phương án, chỉ duy nhất liều thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ ba được dùng cho bệnh nhân.

Theo phương án bao gồm nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được dùng ở cùng một tần suất dùng như liều thứ hai khác. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho bệnh nhân dùng 1 đến 2 tuần sau liều ngay trước. Tương tự, theo phương án bao gồm nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được dùng ở cùng một tần suất dùng như liều thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được dùng cho bệnh nhân 2 đến 4 tuần sau liều ngay trước. Theo một số phương án theo sáng chế, tần suất dùng trong đó liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi theo phác đồ điều trị. Tần suất dùng có thể còn được

điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sỹ, phụ thuộc vào nhu cầu của mỗi bệnh nhân sau khi được kiểm tra lâm sàng.

Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên (ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu với CD22 và CD28) được sử dụng cho đối tượng dưới dạng liều tính theo trọng lượng. "Liều tính theo trọng lượng" (ví dụ, liều tính bằng mg/kg) là liều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép sẽ thay đổi tùy thuộc vào trọng lượng của đối tượng.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được sử dụng cho đối tượng như một liều cố định. "Liều cố định" (ví dụ, liều tính bằng mg) có nghĩa là một liều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được sử dụng cho tất cả các đối tượng bất kể yếu tố bất kỳ liên quan đến đối tượng cụ thể, chẳng hạn như trọng lượng. Theo một phương án cụ thể, liều cố định của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế dựa trên trọng lượng hoặc tuổi được xác định trước.

Nhìn chung, liều thích hợp của phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 200,0 miligam trên kilogam thể trọng ở người nhận, thường nằm trong khoảng từ 1 đến 50mg trên kilogam thể trọng. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép có thể được sử dụng với liều khoảng 0,1 mg/kg, khoảng 0,2 mg/kg, khoảng 0,5 mg/kg, khoảng 1 mg/kg, khoảng 1,5 mg/kg, khoảng 2 mg/kg, khoảng 3 mg/kg, khoảng 5 mg/kg, khoảng 10 mg/kg, khoảng 15 mg/kg, khoảng 20 mg/kg, khoảng 25 mg/kg, khoảng 30 mg/kg, khoảng 40 mg/kg, khoảng 50 mg/kg mỗi liều duy nhất. Các giá trị và phạm vi trung gian giữa các giá trị được nêu cũng nhằm mục đích là một phần của sáng chế này.

Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được sử dụng dưới dạng liều cố định nằm trong khoảng từ 25 mg đến 2500 mg. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được sử dụng theo liều cố định khoảng 25 mg, khoảng 30 mg, khoảng 50 mg, khoảng 75 mg, khoảng 100 mg, khoảng 125 mg, khoảng 150 mg, khoảng 175 mg, 200 mg, khoảng 225 mg,

khoảng 250 mg, khoảng 275 mg, khoảng 300 mg, khoảng 325 mg, khoảng 350 mg, khoảng 375 mg, khoảng 400 mg, khoảng 425 mg, khoảng 450 mg, khoảng 475 mg, khoảng 500 mg, khoảng 525 mg, khoảng 550 mg, khoảng 575 mg, khoảng 600 mg, khoảng 625 mg, khoảng 650 mg, khoảng 675 mg, khoảng 700 mg, khoảng 725 mg, khoảng 750 mg, khoảng 775 mg, khoảng 800 mg, khoảng 825 mg, khoảng 850 mg, khoảng 875 mg, khoảng 900 mg, khoảng 925 mg, khoảng 950 mg, khoảng 975 mg, khoảng 1000 mg, khoảng 1500 mg, khoảng 2000 mg, hoặc khoảng 2500 mg. Các giá trị và phạm vi trung gian giữa các giá trị được nêu cũng nhằm mục đích là một phần của sáng chế này.

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán

Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc xác định CD28 hoặc CD22, hoặc tế bào biểu hiện CD28 hoặc biểu hiện CD22 trong mẫu, ví dụ, cho mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng kháng CD28 x kháng CD22, hoặc mảnh của nó, có thể được sử dụng để chẩn đoán tình trạng bệnh lý hoặc bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện khác thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện, v.v.) của CD28 hoặc CD22. Ví dụ về thử nghiệm chẩn đoán đối với CD28 hoặc CD22 có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân, tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, trong đó kháng thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phần tử báo cáo. Ngoài ra, kháng thể không được đánh dấu có thể được sử dụng để chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ cấp mà được đánh dấu theo cách phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc chất báo cáo có thể phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc quang hóa như florescein isothiocyanat hoặc rhodamin; hoặc enzym như alkaline phosphatase, betagalactosidase, peroxidase cải ngựa hoặc luciferase. Ví dụ về thử nghiệm đặc hiệu mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định CD8 hoặc CD22 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Mẫu mà có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán CD28 hoặc CD22 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch lỏng bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân, mà chứa lượng có thể phát hiện được của protein CD28 hoặc CD22, hoặc mảnh của nó, dưới điều kiện bệnh lý hoặc điều kiện

bình thường. Nhìn chung, mức CD28 hoặc CD22 trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị ảnh hưởng do bệnh hoặc triệu chứng kết hợp với hoạt tính hoặc mức CD28 hoặc CD22 bất thường) sẽ được xác định trước để thiết lập một đường cơ sở hoặc tiêu chuẩn, của mức CD28 hoặc CD22. Đường cơ sở của mức CD28 hoặc CD22 có thể sau đó được so sánh với mức CD28 hoặc CD22 đo được trong các mẫu thu được từ các đối tượng nghi ngờ mắc bệnh hoặc triệu chứng có liên quan đến CD28 hoặc CD22.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được trình bày để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện với công bố đầy đủ và bản mô tả cách để sản xuất và sử dụng phương pháp và dược phẩm theo sáng chế và không có mục đích giới hạn phạm vi các tác giả sáng chế quan tâm trong sáng chế này. Mặc dù, các tác giả sáng chế đã cố gắng để tạo ra sự chính xác đối với số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), nhưng các sai số thực nghiệm và độ lệch là không thể tránh được. Do đó trừ khi được chỉ ra theo cách khác, phần là phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là theo độ oC, và áp suất là ở hoặc gần với áp suất khí quyển.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể kháng CD22xCD28

Tạo ra kháng thể kháng CD28

Kháng thể kháng CD28 được thu bằng cách gây miễn dịch ở chuột VELOCIMMUNE® (tức là, chuột được thiết kế chứa ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kappa globulin miễn dịch của người) với protein CD2 của người được dung hợp với phần Fc của IgG2a của chuột, hoặc với tế bào biểu hiện CD28 hoặc với ADN mã hóa CD28. Đáp ứng miễn dịch của kháng thể được quan sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu CD28. Phản ứng miễn dịch mong muốn đạt được khi tế bào lách được thu hồi và dung hợp với tế bào tủy chuột để bảo tồn tính khả thi và hình dạng của dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và lựa chọn để xác định các dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu CD28. Một số kháng thể thể khám kháng CD28 (tức là, các kháng thể sở hữu vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột) đã được thu lại bằng cách sử dụng kỹ thuật này. Hơn nữa,

một số kháng thể kháng CD28 hoàn toàn của người được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính kháng nguyên mà không dung hợp với thể bào tủy, như được mô tả trong US 2007/0280945A1.

Một số đặc tính sinh học nhất định của các kháng thể kháng CD28 được tạo ra theo phương pháp của Ví dụ này được mô tả chi tiết trong các Ví dụ nêu dưới đây.

Tạo ra kháng thể kháng CD22

Kháng thể kháng CD22 thu được bằng cách gây miễn dịch ở chuột được biến đổi di truyền (chuột VELOCIMMUNE®, xem dưới đây) với kháng nguyên CD22 của người antigen (ví dụ, Xem hCD22 ecto (D20-R687).hFc, R&D Systems, Catalog# 1968-SL-050; Accession# CAA42006 (Xem also, Fig. 3), hoặc bằng cách gây miễn dịch chuột được thiết kế chứa ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kappa globulin miễn dịch của người với kháng nguyên CD22 của người.

Sau khi được gây miễn dịch, tế bào lách được thu lại từ mỗi con chuột và (1) hợp nhất với tế bào u tủy của chuột để bảo tồn khả năng tồn tại của chúng và tạo thành tế bào hybridoma và được sàng lọc để xác định tính đặc hiệu của CD22, hoặc (2) tế bào B được phân loại (như mô tả trong US 2007/0280945A1) sử dụng mảnh CD22 ở người làm chất phản ứng phân loại mà liên kết và xác định các kháng thể phản ứng (tế bào B dương tính với kháng nguyên).

Các kháng thể kháng đối với CD22 được phân lập ban đầu có vùng biến đổi ở người và vùng hằng định ở chuột. Kháng thể được xác định đặc tính và lựa chọn theo các đặc điểm mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, v.v. Nếu cần, vùng hằng định của chuột được thay thế bằng vùng hằng định mong muốn ở người, ví dụ vùng hằng định IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được sửa đổi, để tạo ra kháng thể kháng CD22 ở người hoàn toàn. Mặc dù vùng hằng định được chọn có thể thay đổi tùy theo việc sử dụng cụ thể, tuy nhiên đặc trưng về tính đặc hiệu đích và liên kết kháng nguyên với ái lực cao là do vùng biến đổi tạo ra.

Tạo ra kháng thể đặc hiệu kép liên kết với CD28 và CD22

Các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng liên kết kháng CD22 đặc hiệu và vùng liên kết kháng CD28 đặc hiệu được xây dựng bằng cách sử dụng các phương pháp luận tiêu chuẩn, trong đó vùng liên kết kháng nguyên kháng CD22 và vùng

liên kết kháng nguyên kháng CD28, mỗi vùng chứa các HCVR khác nhau, riêng biệt được ghép cặp với một LCVR chung. Theo một số ví dụ kháng thể đặc hiệu kép được xây dựng bằng các dùng chuỗi nặng từ kháng thể kháng CD28, chuỗi nặng từ kháng thể kháng CD22 và chuỗi nhẹ chung (Xem Bảng 1).

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra theo phân Ví dụ này chứa hai miền liên kết kháng nguyên riêng biệt (*tức là*, nhánh liên kết). Miền liên kết kháng nguyên thứ nhất chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể kháng CD28 ("CD28-VH"), và miền liên kết kháng nguyên thứ hai chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể kháng CD22 ("CD22-VH"). Cả kháng thể kháng CD22 và kháng thể kháng CD28 đều có chung chuỗi nhẹ. Việc bắt cặp CD28-VH/CD22-VH tạo ra miền liên kết kháng nguyên nhận diện đặc hiệu CD28 trên tế bào T và CD22 trên tế bào khối u.

Ví dụ 2. Trình tự axit amin và axit nucleic vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ

Bảng 1 trình bày các mã nhận biết trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và CDR được lựa chọn từ các kháng thể kháng CD22 theo sáng chế. Mã nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng được mô tả trong Bảng 2.

Bảng 1: Mã nhận dạng trình tự axit amin của kháng thể CD22

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb33037 P2	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb33041 P2	18	20	22	24	10	12	14	16

Bảng 2: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic của kháng thể CD22

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb33037 P2	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb33041 P2	17	19	21	23	9	11	13	15

Bảng 3 trình bày các mã nhận biết trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (HCVR và LCVR) CDR được lựa chọn từ các kháng thể kháng CD28 theo sáng chế. Các mã nhận biết axit nucleic tương ứng được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 3: Mã nhận dạng trình tự axit amin của kháng thể CD28

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb14226 P2	26	28	30	32	10	12	14	16

Bảng 4: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic của kháng thể CD28

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV	HCDR	HCDR	HCDR	LCV	LCDR	LCDR	LCDR
	R	1	2	3	R	1	2	3
mAb14226 P2	25	27	29	31	9	11	13	15

Tóm tắt về các thành phần cấu thành của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28 khác nhau đã được xây dựng được nêu trong Bảng 5. Bảng 6, 7 và 7 liệt kê HCVR, LCVR, CDR và các mã nhận dạng trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể đặc hiệu kép.

Bảng 5: Tóm tắt các thành phần cấu thành của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28

Mã nhận dạng kháng thể đặc hiệu kép	Kháng CD22	Kháng CD28	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ chung
	Vùng liên kết kháng nguyên	Vùng liên kết kháng nguyên	
	Vùng biến đổi chuỗi nặng	Vùng biến đổi chuỗi nặng	

REGN5837	mAb33037P2	mAb14226P2	ULC3-20
REGN5838	mAb33041P2	mAb14226P2	ULC3-20

Bảng 6 thể hiện mã nhận dạng trình tự axit amin đối với kháng thể kháng CD22 x kháng CD28 đặc hiệu kép được lấy ví dụ trong bản mô tả này. Mã nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng được mô tả trong Bảng 7.

Bảng 6: Trình tự axit amin của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28

Mã nhận dạng kháng thể đặc hiệu kép	Kháng CD28					Kháng CD22					Vùng biến đổi chuỗi nhẹ chung				
	Miền liên kết kháng nguyên thứ nhất (D1)					Miền liên kết kháng nguyên thứ hai (D2)									
	D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3	D2-HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3		
REGN5837	26	28	30	32	32	2	4	6	8	10	12	14	16		
REGN5838	26	28	30	32	32	18	20	22	24	10	12	14	16		

Bảng 7: Trình tự axit cucleic của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28

Mã nhận dạng kháng thể đặc hiệu kép	Kháng CD28					Kháng CD22					Vùng biến đổi chuỗi nhẹ chung				
	Miền liên kết kháng nguyên thứ nhất (D1)					Miền liên kết kháng nguyên thứ hai (D2)									
	D1-HCVR	D1-HCDR1	D1-HCDR2	D1-HCDR3	D1-HCDR3	D2-HCVR	D2-HCDR1	D2-HCDR2	D2-HCDR3	D2-HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3		
REGN5837	25	27	29	31	31	1	3	5	7	9	11	13	15		
REGN5838	25	27	29	31	31	17	19	21	23	9	11	13	15		

Ví dụ 3: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên của REGN5837 liên kết với CD22 bằng các trao đổi hydro đoteri

Lập bản đồ quyết định kháng nguyên trao đổi H/D với khối phổ (HDX-MS) được thực hiện để xác định gốc axit amin của CD22 (CD22 tái tổ hợp của người, SEQ ID NO:50) tương tác với H4sH33037P2 (Xem Bảng 1, cặp HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 2/10) (kháng thể đơn dòng kháng hCD22; kháng thể kháng hCD22 mẹ của REGN5837). Mô tả chung về phương pháp trao đổi H/D được nêu trong, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; và Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Thí nghiệm HDX-MS được thực hiện trên nền tảng HDX/MS tích hợp, bao gồm hệ Leaptac HDX PAL để đánh dấu và dập tắt đoteri, Waters Acquity M-Class (chất quản lý dung môi hỗ trợ) để phân hủy và tải mẫu, Waters Acquity M-Class (chất quản lý dung môi μ Binary) cho gradien phân tích, và Thermo Q Exactive HF máy đo khối phổ để đo khối lượng peptit.

Dung dịch đánh dấu được chuẩn bị là đệm PBS trong D₂O ở pD 7,0 (10 mM đệm phosphat, 140 mM NaCl, và 3 mM KCl, tương đương pH 7,4 ở 25°C). Để đánh dấu đoteri, 11 μ L CD22.mmH (REGN5140 (SEQ ID NO:50), 56,7 μ M) hoặc CD22.mmH được trộn trước với H4sH33037P2 (xem ở trên) trong 1:0,6 tỷ lệ mol (phức hệ Ag-Ab) được ủ ở 20°C với 44 μ L dung dịch đánh dấu D₂O nhiều thời điểm hai lần (ví dụ, đối chứng không được đánh dấu đoteri = 0 giây; được đánh dấu đoteri trong 5 phút và 10 phút). Phản ứng đoteri được dập tắt bằng cách thêm 55 μ L đệm dập tắt của đệm dập tắt được làm mát trước (0,5 M TCEP-HCl, 8 M urea và 1% axit formic) vào mỗi mẫu để ủ trong 5 phút ở 20°C. Mẫu được dập tắt sau đó được tiêm vào máy quản lý Waters HDX Manager để tiêu hóa XIII pepsin/proteaza trực tuyến. Peptit được tiêu hóa được phân tách bởi cột C8 (1,0 mm x 50 mm, NovaBioassays) với gradien 13 phút từ 10%-32% B (pha động A: 0,5% axit formic trong nước, giai đoạn biến đổi B: 0,1% axit formic trong axetonitril). Peptit được rửa giải được phân tích bởi máy khối phổ Q Exactive HF ở chế độ LC-MS/MS hoặc LC-MS.

Dữ liệu LC-MS/MS của mẫu CD22 không được đoteri hóa được dò tìm lại ở kho dữ liệu bao gồm CD22 và trình tự ngẫu nhiên của nó sử dụng máy dò tìm Byonic (Protein Metrics). Thông số dò tìm (trong ELN) được thiết lập mặc định sử

dụng tiêu hóa enzym không đặc hiệu và glycosyl ở người làm cải biến biến đổi chung. Sau đó danh sách các peptit được định danh được nhập vào phần mềm HDX Workbench (phiên bản 3.3) để tính toán lượng hấp thụ đơteri của mỗi peptit được phát hiện bởi LC-MS từ tất cả các mẫu được đơteri hóa. Đối với từng peptit nhất định, khối lượng tâm (khối lượng trung bình cổ trọng số cường độ) tại mỗi thời điểm được sử dụng để tính độ hấp thụ đơteri (D) và phần trăm hấp thụ đơteri (%D) (xem bên dưới).

Hấp thụ đơteri (hấp thụ -D)	=	Khối lượng trung bình (đơteri hóa)- khối lượng trung bình (không đơteri)
Phần trăm hấp thụ đơteri (%D)	=	$\frac{\text{Hấp thụ D đối với peptit ở thời điểm X}}{100\%} \times 100\%$ $\frac{\text{Hấp thụ D tối đa của peptit (được xác định trong ELN)}}{100\%} \times 100\%$

Tổng số 427 peptit từ hCD22.mmH (SEQ ID NO: 50) được nhận diện từ cả một mình hCD22.mmH và hCD22.mmH tạo phức với mẫu H4sH33037P2 (cặp HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 2/10), là 92,0% trình tự bao phủ hCD22. Bất kỳ peptit nào có giá trị hấp thụ D dưới dạng phần trăm khác nhau trên 5% được xác định là được bảo vệ đáng kể ở Bảng 8). Đối với hCD22.mmH, peptit tương ứng với axit amin 481-505 (NVQYAPRDVRVRKIKPLSEIHSGNS; SEQ ID NO:57) và 523-537 (FWEKNGRLLGKESQLNF; SEQ ID NO:58) được bảo vệ đáng kể bởi H4sH33037P2.

Bảng 8: Peptit CD22.mmH chọn lọc được bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4sH33037P2

		5 phút			10 phút			
		REGN5140	REGN5140		REGN5140	REGN5140		
			+			+		
CD22			H4sH330			H4sH33037		

			37P2			P2		
Góc	Điện tử (+)	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	$\Delta \% D$
481-492	2	1477,27	1476,94	-0,33	1477,51	1477,01	-0,50	-5,7
481-497	4	2059,98	2059,38	-0,60	2060,24	2059,62	-0,62	-5,9
481-499	4	2277,09	2276,48	-0,61	2277,33	2276,65	-0,68	-5,4
482-490	3	1108,33	1108,02	-0,32	1108,46	1108,20	-0,26	-5,99
484-492	3	1136,43	1136,22	-0,22	1136,56	1136,29	-0,27	-5,08
484-499	4	1935,26	1934,65	-0,61	1935,40	1934,69	-0,70	-6,82
488-505	3	2043,24	2042,65	-0,60	2043,42	2042,69	-0,73	-5,52
489-497	3	1113,62	1113,13	-0,49	1113,71	1113,17	-0,53	-10,63
489-499	3	1330,85	1330,31	-0,54	1330,93	1330,32	-0,61	-8,96
489-505	2	1927,04	1926,45	-0,59	1927,17	1926,46	-0,70	-5,76
489-505	3	1928,14	1927,55	-0,59	1928,26	1927,61	-0,65	-5,56
491-499	2	1074,18	1073,78	-0,41	1074,19	1073,74	-0,45	-8,94
491-499	3	1075,28	1074,83	-0,45	1075,31	1074,80	-0,51	-9,97
491-505	2	1671,53	1671,05	-0,48	1671,59	1671,11	-0,48	-5,02
491-505	3	1672,53	1672,04	-0,48	1672,59	1672,10	-0,49	-5,09
491-505	4	1673,57	1673,08	-0,50	1673,64	1673,14	-0,50	-5,19
493-505	2	1415,81	1415,33	-0,48	1415,87	1415,40	-0,47	-5,91
523-531	2	1167,25	1166,91	-0,34	1167,40	1166,97	-0,43	-6,87
523-531	3	1168,23	1167,88	-0,36	1168,41	1167,93	-0,48	-7,48
523-534	4	1484,62	1484,25	-0,37	1484,68	1484,12	-0,56	-5,80
523-536	3	1699,57	1699,11	-0,46	1699,77	1699,24	-0,53	-5,16
524-534	3	1336,24	1335,83	-0,41	1336,31	1335,93	-0,38	-5,50
526-537	2	1348,48	1348,17	-0,32	1348,76	1348,27	-0,49	-5,03
527-537	2	1220,04	1219,62	-0,42	1220,31	1219,81	-0,50	-6,44
528-534	2	776,80	776,55	-0,26	776,92	776,60	-0,32	-7,19
528-536	2	992,76	992,44	-	992,95	992,57	-0,38	-6,30

				0,32				
528-537	2	1105,90	1105,60	-0,30	1106,06	1105,71	-0,35	-5,11
528-537	3	1106,65	1106,35	-0,30	1106,83	1106,47	-0,37	-5,20

Ví dụ 4: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên của H4sH33041P2 liên kết với CD22 bằng các trao đổi hydro đơteri

Lập bản đồ quyết định kháng nguyên trao đổi H/D với khối phổ (HDX-MS) được thực hiện để xác định gốc axit amin của CD22 (CD22 tái tổ hợp của người, SEQ ID NO:50) tương tác với H4sH33041P2 (kháng thể đơn dòng kháng hCD22 có cặp HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 18/10), kháng thể kháng hCD22 mẹ của REGN5838). Mô tả chung về phương pháp trao đổi H/D được nêu trong, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; và Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Thí nghiệm HDX-MS được thực hiện trên nền tảng HDX/MS tích hợp, bao gồm hệ Leaptac HDX PAL để đánh dấu và dập tắt đơteri, Waters Acquity M-Class (chất quản lý dung môi hỗ trợ) để phân hủy và tái mẫu, Waters Acquity M-Class (chất quản lý dung môi μ Binary) cho gradien phân tích, và Thermo Q Exactive HF máy đo khối phổ để đo khối lượng peptit.

Dung dịch đánh dấu được chuẩn bị là đệm PBS trong D₂O ở pD 7,0 (10 mM đệm phosphat, 140 mM NaCl, và 3 mM KCl, tương đương pH 7,4 ở 25°C). Để đánh dấu đơteri, 11 μ L CD22.mmH (REGN5140 (SEQ ID NO:50), 56,7 μ M) hoặc CD22.mmH được trộn trước với H4sH33041P2 trong 1:0,6 tỷ lệ mol (phức hệ Ag-Ab) được ủ ở 20°C với 44 μ L dung dịch đánh dấu D₂O nhiều thời điểm hai lần (ví dụ, đối chứng không được đánh dấu đơteri = 0 giây; được đánh dấu đơteri trong 5 phút và 10 phút). Phản ứng đơteri được dập tắt bằng cách thêm 55 μ L đệm dập tắt của đệm dập tắt được làm mát trước (0,5 M TCEP-HCl, 8 M urea và 1% axit formic) vào mỗi mẫu để ủ trong 5 phút ở 20°C. Mẫu được dập tắt sau đó được tiêm vào máy quản lý Waters HDX Manager để tiêu hóa XIII pepsin/proteaza sẵn sàng. Peptit được tiêu hóa được phân tách bởi cột C8 (1,0 mm x 50 mm, NovaBioassays) với gradien 13 phút từ 10%-32% B (pha động A: 0,5% axit formic trong nước, giai đoạn biến đổi B: 0,1% axit formic trong axetonitril). Peptit được rửa giải được phân tích bởi máy khối phổ Q Exactive HF ở chế độ LC-MS/MS hoặc LC-MS.

Dữ liệu LC-MS/MS của mẫu CD22 không được đơteri hóa được dò tìm lại ở kho dữ liệu bao gồm CD22 và trình tự ngẫu nhiên của nó sử dụng máy dò tìm Byonic (Protein Metrics). Thông số dò tìm (trong ELN) được thiết lập mặc định sử dụng tiêu hóa enzym không đặc hiệu và glycosyl ở người làm cải biến biến đổi chung. Sau đó danh sách các peptit được định danh được nhập vào phần mềm HDX Workbench (phiên bản 3.3) để tính toán lượng hấp thụ đơteri của mỗi peptit được phát hiện bởi LC-MS từ tất cả các mẫu được đơteri hóa. Đối với từng peptit nhất định, khối lượng tâm (khối lượng trung bình có trọng số cường độ) tại mỗi thời điểm được sử dụng để tính độ hấp thụ đơteri (D) và phần trăm hấp thụ đơteri (%D) như nêu dưới đây.

Hấp thụ đơteri (hấp thụ -D)	=	Khối lượng trung bình (đơteri hóa)- khối lượng trung bình (không đơteri)
Phần trăm hấp thụ đơteri (%D)	=	$\frac{\text{Hấp thụ D đối với peptit ở thời điểm X}}{\text{Hấp thụ D tối đa của peptit (được xác định trong ELN)}} \times 100\%$

Tổng số 454 peptit từ hCD22.mmH (SEQ ID NO: 50) được nhận diện từ cả một mình hCD22.mmH và hCD22.mmH tạo phức với mẫu H4sH33041P2, có 90,5% trình tự bao phủ của hCD22. Bất kỳ peptit nào có giá trị hấp thụ D dưới dạng phần trăm khác nhau trên 5% được xác định là được bảo vệ đáng kể. Đối với hCD22.mmH, peptit tương ứng với axit amin 246-277 (CEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLLKQNTFTLNL; SEQ ID NO:59) được bảo vệ đáng kể bởi H4sH33041P2. **Bảng 9** thể hiện kết quả từ peptit được lựa chọn được bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4sH33041P2.

Bảng 9: Peptit CD22.mmH chọn lọc được bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4sH33041P2

		5 phút			10 min			
		REGN5 140	REGN51 40		REGN5 140	REGN5 140		
			+			+		
CD22			H4sH330 41P2			H4sH33 041P2		
Gốc	Điện tử (+)	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Δ% D
246-260	2	1695,69	1693,75	-1,94	1695,81	1693,88	-1,94	-20,2
247-255	1	1014,95	1013,86	-1,09	1015,09	1013,90	-1,19	-23,7
248-255	1	885,67	884,67	-1,00	885,72	884,68	-1,03	-25,4
248-257	1	1088,87	1087,06	-1,81	1088,95	1087,08	-1,86	-32,8
248-258	1	1188,86	1186,62	-2,24	1188,80	1186,76	-2,03	-33,4
248-260	1	1462,34	1460,14	-2,20	1462,56	1460,37	-2,19	-27,5
248-260	2	1462,38	1460,87	-1,51	1462,50	1461,05	-1,45	-18,5
248-267	2	2179,41	2177,73	-1,68	2179,48	2177,78	-1,70	-12,4
250-255	1	698,73	698,06	-0,68	698,74	698,07	-0,67	-28,2
256-260	1	595,67	595,38	-0,29	595,77	595,43	-0,34	-13,2
256-277	3	2506,39	2505,08	-1,31	2506,57	2505,28	-1,28	-8,1
258-277	3	2303,55	2302,37	-1,18	2303,70	2302,61	-1,09	-7,9
258-277	4	2304,39	2303,05	-1,34	2304,54	2303,17	-1,37	-9,4
259-274	3	1863,23	1862,24	-1,00	1863,34	1862,39	-0,95	-8,7
259-276	3	2090,99	2089,88	-1,11	2091,03	2090,10	-0,93	-8,0
259-277	2	2202,69	2201,88	-0,82	2202,82	2201,99	-0,83	-6,1
259-277	3	2204,00	2202,93	-1,07	2204,07	2203,10	-0,97	-7,5
260-267	2	923,71	923,41	-0,30	923,83	923,53	-0,30	-6,2
261-267	1	736,43	736,18	-0,25	736,55	736,26	-0,29	-6,7

261-267	2	737,43	737,18	-0,26	737,55	737,28	-0,28	-6,7
261-272	2	1339,48	1338,86	-0,62	1339,58	1338,99	-0,59	-7,5
261-272	3	1340,56	1339,91	-0,65	1340,66	1340,07	-0,59	-7,8
261-273	2	1487,02	1486,00	-1,02	1487,11	1486,15	-0,96	-11,2
261-273	3	1488,10	1487,01	-1,09	1488,13	1487,19	-0,94	-11,5
261-274	2	1588,74	1587,70	-1,04	1588,85	1587,90	-0,94	-10,3
261-276	2	1816,39	1815,41	-0,98	1816,48	1815,57	-0,92	-8,5
261-277	2	1929,27	1929,31	-1,04	1928,23	1928,38	-0,93	-8,2
261-277	3	1930,39	1929,37	-1,01	1930,45	1929,55	-0,89	-7,9
261-277	4	1931,34	1930,30	-1,05	1931,40	1930,46	-0,94	-8,3
262-267	1	622,98	622,71	-0,27	623,08	622,80	-0,27	-8,4
262-274	3	1475,17	1474,20	-0,97	1475,28	1473,08	-2,20	-18,0
262-275	4	1590,80	1589,66	-1,13	1590,89	1589,77	-1,12	-11,7
262-276	3	1704,03	1701,62	-2,41	1704,09	1701,66	-2,43	-23,3
262-277	2	1816,39	1815,41	-0,98	1816,48	1815,57	-0,92	-8,5
262-277	3	1817,40	1816,38	-1,02	1817,50	1816,57	-0,93	-8,7
264-273	2	1129,77	1128,49	-1,28	1129,74	1128,78	-0,96	-17,5
264-274	2	1231,69	1231,40	-0,29	1231,77	1231,25	-0,52	-5,6
267-276	2	1212,11	1211,38	-0,73	1212,10	1211,47	-0,63	-10,6
267-277	2	1325,86	1325,12	-0,74	1325,83	1325,22	-0,61	-9,4
268-273	2	769,65	768,82	-0,83	769,64	768,88	-0,76	-24,9
268-274	1	870,35	869,46	-0,89	870,28	869,56	-0,73	-20,2
268-274	2	871,36	870,53	-0,83	871,34	870,61	-0,73	-19,4
268-276	2	1099,07	1098,29	-0,79	1099,07	1098,36	-0,70	-13,3
268-277	1	1211,10	1210,45	-0,66	1211,10	1210,45	-0,65	-10,2
268-277	2	1212,11	1211,38	-0,73	1212,10	1211,47	-0,63	-10,6
268-277	3	1212,84	1212,11	-0,73	1212,81	1212,16	-0,64	-10,7

Ví dụ 5: Ái lực liên kết thu được từ cộng hưởng plasmon bề mặt và hằng số động học của kháng thể đặc hiệu kép CD22 xCD28

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) đối với hCD22.mmH (SEQ ID NO: 50) và mfCD22.mmH (SEQ ID NO: 51) liên kết với mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 được tinh sạch hoặc mAb mẹ hóa trị hai kháng CD22 (Xem Bảng 1, mAb33037P2; HCVR/LCVR: SEQ ID NO: 2/10) và mAb33041P2; HCVR/LCVR: SEQ ID NO: 18/10) được xác định sử dụng bộ cảm biến sinh học plasmon bề mặt thời gian thực sử dụng thiết bị Biacore T-200 hoặc Biacore 4000. Bề mặt cảm biến CM5 Biacore dẫn xuất bởi amin ghép cặp với kháng thể kháng Fc của người của chuột đơn dòng (REGN2567: HCVR/LCVR: SEQ ID NO: 33/34) để cấp mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 hoặc mAb mẹ kháng CD22 được tinh sạch (Xem Bảng 1 và 2 đối với mAb33037P2 và mAb33041P2). Nghiên cứu liên kết Biacore được thực hiện trong đệm chứa 0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v Chất hoạt động bề mặt P20 (đệm chạy HBS-EP). Nồng độ khác nhau của hCD22 (SEQ ID NO: 50) và mfCD22 (SEQ ID NO: 51) với đuôi hexahistidin myc.myc đầu C ("hexahistidin" được bộc lộ ở SEQ ID NO: 60) được điều chế trong đệm chạy HBS-EP (nằm trong khoảng từ 90 nM đến 3,33 hoặc 0,37nM, pha loãng 3 lần) được tiêm vào bề mặt được bắt bởi mAb ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút. Sự kết hợp của CD22.mmH (SEQ ID NO: 50) để kháng thể đơn dòng được bắt được theo dõi trong 5 phút và sự phân ly của CD22.mmH trong đệm chạy HBS-EP được dùng để theo dõi 10 phút. Tất cả thí nghiệm động năng liên kết được thực hiện ở 25°C. Hằng số tốc độ kết hợp động năng (k_a) và phân ly động năng (k_d) được xác định bằng cách khớp với biểu đồ cảm biến thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán từ hằng số tốc độ động năng như sau:

$$K_D (M) = k_d/k_a, \text{ và } t_{1/2} (\text{phút}) = 0.693/k_d / 60$$

Thông số động năng liên kết đối với CD22 của người và khỉ đuôi dài với mAb được tinh sạch ở 25°C được thể hiện ở bảng 10-12 dưới đây.

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) đối với hCD28.mmH (SEQ ID NO: 54) mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 hoặc mAb mẹ hóa trị hai kháng CD28 (Xem bảng 3 và 4 đối với mAb14226P2) được xác định sử dụng bộ cảm biến sinh

học plasmon bề mặt thời gian thực sử dụng thiết bị Biacore T-200. Bề mặt cảm biến CM4 Biacore dẫn xuất bởi amin ghép cặp với kháng thể kháng Fc của người của chuột đơn dòng (REGN2567:HCVR/LCVR SEQ ID NO: 33/34) để cặp mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 hoặc mAb mẹ kháng CD28 được tinh sạch (Xem ở trên). Nghiên cứu liên kết Biacore được thực hiện trong đệm chứa 0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v Chất hoạt động bề mặt P20 (đệm chạy HBS-EP). Nồng độ khác nhau của hCD28 với đuôi hexahistidin myc.myc đầu C ("hexahistidin" được bộc lộ ở SEQ ID NO: 60) được điều chế trong đệm chạy HBS-EP (nằm trong khoảng từ 600 nM đến 2,47 nM, pha loãng 3 lần) được tiêm vào bề mặt được bắt bởi mAb ở tốc độ dòng là 50 μ L/phút. Phân ly của CD28.mmH (SEQ ID NO: 54) để kháng thể đơn dòng được bắt được theo dõi trong 5 phút và sự phân ly của CD28.mmH trong đệm chạy HBS-EP được dùng để theo dõi 10 phút. Tất cả thí nghiệm động năng liên kết được thực hiện ở 25°C. Hằng số tốc độ kết hợp (k_a) và phân ly (k_d) được xác định bằng cách khớp với biểu đồ cảm biến thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán từ hằng số tốc độ động năng như sau:

$$K_D (M) = k_d/k_a, \text{ và } t_{1/2} (\text{phút}) = 0,693/k_d / 60$$

Thông số động năng liên kết đối với CD28 của người với mAb được tinh sạch ở 25°C được thể hiện ở bảng 13 dưới đây.

Bảng 10: Động năng liên kết CD22.mmH của người với mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 ở 25°C

REGN# /Ab PID #	l«	Tên chung	Bắt mAb (RU)	Liên kết 90nM hCD22. mmH (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (ph út)
REGN5 837	REGN583 7-L3	CD22xCD 28 mAb	379,1 $\pm$ 2,4	100,5	1,70E +05	1,49 E-03	8,75 E-09	7,8

H4sH33 037P2	H4sH3303 7P2-L2	CD22 mAb	358,3 ± 2,0	192,6	1,95E +05	1,48 E-03	7,60 E-09	7,8
REGN5 838	REGN583 8-L4	CD22xCD 28 mAb	475,3 ± 5,3	26,7	2,11E +04	3,02 E-04	1,43 E-08	38, 2
H4sH33 041P2	H4sH3304 1P2-L2	CD22 mAb	581,7 ± 1,9	61,5	2,05E +04	1,93 E-04	9,43 E-09	59, 8

Bảng 11: Động năng liên kết CD22.mmH (XP_005588899.1) của khỉ với mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 ở 25°C

REGN#/ Ab PID #	l«	Tên chung	Bắt mAb (RU)	Liên kết 90nM REGN 5280 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (ph út)
H4sH330 37P2	H4sH3303 7P2-L2	CD22 mAb	423,8 ± 3,6	112,8	6,55E +04	2,66E -03	4,06E -08	4,3
H4sH330 41P2	H4sH3304 1P2-L2	CD22 mAb	500,9 ± 0,9	13,2	6,83E +03	2,91E -04	4,26E -08	39,8

Bảng 12: Động năng liên kết CD22.mmH (EHH59463.1) của khỉ với mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 ở 25°C

REGN#/ Ab PID #	l«	Tên chung	Bắt mAb (RU)	Liên kết 84nM REGN 5281 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (ph út)
H4sH330 37P2	H4sH3303 7P2-L2	CD22 mAb	426,4 ± 1,6	127,5	8,07E +04	2,87E -03	3,56E -08	4,0
H4sH330	H4sH3304	CD22	499,7	10,9	6,59E	3,90E	5,92E	29,6

41P2	1P2-L2	mAb	$\pm 3,5$		+03	-04	-08	
------	--------	-----	-----------	--	-----	-----	-----	--

Bảng 13: Động năng liên kết CD28.mmH của người với mAb đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 ở 25°C

REGN #/Ab PID #	l«	Tên chung	Bắt mAb (RU)	Liên kết 600nM hCD28. mmH (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (ph út)
REGN 5837	REGN58 37-L3	CD22xCD 28 mAb	1060,7 $\pm 7,0$	72,9	1,39E +04	4,73 E-03	3,41 E-07	2,4
REGN 5838	REGN58 38-L4	CD22xCD 28 mAb	1289,2 $\pm 10,5$	77,0	1,23E +04	4,96 E-03	4,04 E-07	2,3
REGN 5705	REGN57 05-L2	CD28 mAb	564,5 $\pm$ 5,2	88,4	1,31E +04	4,80 E-03	3,65 E-07	2,4

Ví dụ 6 Độ đặc hiệu liên kết cả kháng thể kháng CD28 và kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 với dòng tế bào đích (Nalm6), dòng tế bào tác động (Jurkat), và tế bào T và B của khí đuôi dài sử dụng máy đếm tế bào theo dòng chảy

Phân tích tế bào theo dòng chảy được dùng để xác định sự liên kết của kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 với tế bào Nalm6 biểu hiện CD22 của người và tế bào Jurkat biểu hiện CD28 của người với tế bào T (CD28+) và B (CD22+) của khí đuôi dài. Tóm lại, 1×10^5 tế bào/giếng được ủ trong 30 phút ở 4°C với phân pha loãng liên tục của kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 hoặc H4sH15260P (kháng thể IgG4 của người đối chứng kiểu tương đương liên kết kháng nguyên của người mà không có phản ứng chéo với CD28 hoặc CD22 của người hoặc của khí), nằm trong khoảng từ 133 nM đến 61 pM đối với tế bào Jurkat và tế bào Nalm6. PBMC của khí đuôi dài được ủ với một nồng độ kháng thể là 67 nM. Sau khi ủ, tế bào được rửa hai lần với PBS lạnh chứa 1% FBS được lọc và kháng thể thứ cấp kháng người

được liên hợp với PE được thêm vào tế bào và được ủ thêm 30 phút. Cốc tai kháng thể kiểu hình bổ sung (kháng CD2, kháng CD20, kháng CD16, kháng CD14) được thêm vào giếng có PBCM của khi đuôi dài. Giếng không chứa kháng thể hoặc chỉ chứa kháng thể thứ cấp được sử dụng làm đối chứng.

Sau khi ủ với kháng thể thứ cấp, tế bào được rửa, tái huyền phù trong 200 μ L PBS lạnh chứa 1% FBS được lọc và được phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy trên BD LSR_Fortessa. Tế bào T của khi đuôi dài được xác định là CD2+/CD16- và tế bào B là CD20+. Giá trị EC₅₀ để liên kết FACS được tính toán sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính 4 thông số ở phần mềm Prism.

Bảng 14 thể hiện dữ liệu liên kết của kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 với bề mặt của dòng tế bào biểu hiện CD22 như được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Bảng 14 cũng thể hiện dữ liệu liên kết của kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 với bề mặt của dòng tế bào biểu hiện người CD28 của người như được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

REGN5837 được liên kết với tế bào Nalm6 có giá trị EC₅₀ là 1,3E-08M. REGN5838 được liên kết với tế bào Nalm6 có giá trị EC₅₀ là 1,8E-08M. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương không có khả năng liên kết với dòng tế bào biểu hiện CD22.

REGN5837 được liên kết với tế bào Jurkat có giá trị EC₅₀ là 2,1E-08M. REGN5838 được liên kết với tế bào Jurkat có giá trị EC₅₀ là 2,3E-08M. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương không có khả năng liên kết với dòng tế bào biểu hiện CD28.

Bảng 15 thể hiện dữ liệu liên kết của kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 với bề mặt của tế bào T và B của khi đuôi dài (nguồn gốc Campuchia) như được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

REGN5837 liên kết tế bào B của 12 trong số 12 và tế bào T của 11 trong số 12 con khi đuôi dài được thử nghiệm. Liên kết với tế bào B CD20+ nằm trong khoảng từ 12,6 đến 30,3 lần so với kháng thể thứ cấp, trung bình là 15,7 lần. Liên kết với tế bào T CD2+/CD16- nằm trong khoảng từ 1,2 đến 5,2 lần so với kháng thể thứ cấp, trung bình là 3,5 lần. Liên kết dương được xác định là lớn hơn 1,2 lần so với kháng thể thứ cấp. REGN5838 liên kết tế bào B của 12 trong số 12 và tế bào T của 11 trong số 12 con khi đuôi dài được thử nghiệm. Liên kết với tế bào B CD20+

nằm trong khoảng từ 6,5 đến 13,5 lần so với kháng thể thứ cấp, trung bình là 9,3 lần. Liên kết với tế bào T CD2+/CD16- nằm trong khoảng từ 1,2 đến 4,7 lần so với kháng thể thứ cấp, trung bình là 3,8 lần. Liên kết dương được xác định là lớn hơn 1,2 lần so với kháng thể thứ cấp. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương không có khả năng liên kết với tế bào T hoặc B của khí đuôi dài,

Bảng 14: Liên kết và kết quả liên kết số lần tăng đối với thí nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy trên đích được thiết kế và tế bào tác động.

Kháng thể PiD	Jurkat FACS [M]	Jurkat Lần FACS	Nalm6 FACS [M]	Nalm6 Lần FACS
REGN5837	2,1E-08	198	1,3E-08	12,2
REGN5838	2,3E-08	203	1,8E-08	11,7
Đối chứng kiểu tương đương	Không liên kết	1	Không liên kết	1

Bảng 15: Kết quả liên kết số lần tăng đối với thí nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy trên tế bào T và tế bào B của khí đuôi dài (có nguồn gốc Campuchia)

	Liên kết tế bào B (số lần tăng so với kháng thể thứ cấp)			Liên kết tế bào T (số lần tăng so với kháng thể thứ cấp)		
			Đối chứng kiểu tương đương			Đối chứng kiểu tương đương
	REGN583 7	REGN583 8		REGN583 7	REGN583 8	
Khí đuôi dài 1	22,4	12,2	1,3	4,3	4,3	1,2
Khí	28	13,4	1,1	5,2	3,9	1,2

đuôi dài 2						
Khí đuôi dài 3	22,5	13,5	1	5,2	4,7	1
Khí đuôi dài 4	15,4	7,9	1	1,5	1,4	0,9
Khí đuôi dài 5	13,2	7,4	1	2,9	2,8	1,1
Khí đuôi dài 6	30,3	17	1	3,5	3,7	1,2
Khí đuôi dài 7	19,8	11,9	1	4,1	4	1
Khí đuôi dài 8	10,6	6,5	1,2	3,5	4	1,2
Khí đuôi dài 9	12,8	7,2	1,1	2,6	3	1,1
Khí đuôi dài 10	16	10,2	1,4	3,5	3,8	1,1
Khí đuôi dài 11	14,5	8,4	1,2	1,5	1,4	1
Khí đuôi	12,6	7,5	1	1,2	1,2	0,8

dài 12						
Trung bình	15,7	9,3	1,05	3,5	3,75	1,1

Ví dụ 7 Khả năng liên kết của kháng thể kháng CD28 và kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22xCD28 với tế bào T CD4⁺ và tế bào đích được thiết kế sử dụng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy

Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để nghiên cứu về sự liên kết của kháng thể đặc hiệu kép CD22 x CD28 (REGN5837; REGN5838) và kháng thể đối chứng với tế bào tác động biểu hiện CD28 của người (tế bào T CD4⁺ của người) và tế bào đích biểu hiện CD22 của người (tế bào B âm tính HEK293/hCD20/hCD22 và Raji/CD80 và CD86). Tế bào HEK293/hCD20 bao gồm dòng tế bào âm tính đối với CD28 và CD22.

Tế bào T CD4⁺ của người được phân lập từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC) thu được từ bao bạch cầu của vật cho khỏe mạnh. Phân lập PBMC được thực hiện bằng cách quay ly tâm gradien sử dụng ống SepMate™ 50 mL theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Tóm lại, 15 mL của Ficoll-Paque PLUS được tạo lớp vào ống SepMate 50 mL, sau đó thêm 30 mL bạch cầu được pha loãng theo tỷ lệ 1:2 với D-PBS+2% FBS. Bước tiếp theo được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất SepMate. Tế bào T CD4⁺ được phân lập từ PBMC sử dụng kit Microbead CD4 từ Miltenyi Biotec theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào T CD4⁺ được đông lạnh trong FBS chứa 10% DMSO ở nồng độ là 5×10^6 tế bào trên bình.

Tế bào đích, bao gồm dòng tế bào HEK293 và tế bào B Raji được chuẩn bị như sau.

Dòng tế bào HEK293 ổn định (ATCC, # CRL-1573) biểu hiện axit amin CD20 của người (axit amin M1 đến P297 có số đăng ký NP_068769.2) được tải nạp với CD22 của người (axit amin M1 đến A847 có số đăng ký NP_001762.2). Tế bào CD22 của người được phân lập bằng kỹ thuật phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) và tách dòng đơn. Dòng tế bào tách dòng thu được

(HEK293/hCD20/hCD22 dòng E4) được duy trì trong DMEM + 10% + P/S/G + NEAA được bổ sung với 500 g/mL G418.

Tế bào B Raji B (ATCC # CCL-86), biểu hiện nội sinh CD20, CD22, Fc thụ thể gamma (Fc γ R), CD80 và CD86 trên bề mặt tế bào được biến đổi di truyền bằng cách loại bỏ CD80 và CD86 sử dụng kỹ thuật CRISPR. CD80 và CD86 là phối tử đã biết đối với CD28. Tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 được thiết kế được duy trì ở RPMI + 10% FBS + penicillin + streptomycin + glutamin được bổ sung với HEPES và natri pyruvat.

Tế bào được nhuộm như sau.

Tóm lại, tế bào T CD4⁺, tế bào âm tính HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 và Raji/CD80 và CD86 được tái huyền phù trong đệm nhuộm chứa D-PBS+2% FBS. Tế bào Raji được ủ với IgG của chuột (nồng độ cuối là 625mg/mL) để phong bế thụ thể Gamma Fc nội sinh). Tóm lại, ở đĩa 96 giếng, 2×10^5 tế bào/giếng được ủ trong 30-60 phút ở 4°C với phân pha loãng liên tiếp của kháng thể, nằm trong khoảng từ 6,1pM đến 100nM. Mẫu đối chứng âm tính không chứa kháng thể. Tế bào được rửa một lần với đệm nhuộm lạnh và được ủ trong 30-45 phút với Allophycocyanin (APC) được đánh dấu kháng thể thứ cấp kháng con người. Sau khi ủ, tế bào được rửa một lần với đệm D-PBS lạnh mà không chứa FBS và được ủ với chủng tế bào chết xanh có thể cố định LIVE/DEAD (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất để phân biệt giữa tế bào sống và tế bào chết. Sau đó tế bào được cố định trong đệm BD Cytotfix theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được rửa, tái huyền phù trong đệm nhuộm, và được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào trên máy đếm tế bào theo dòng chảy iQue Screener. Để xác định EC₅₀, giá trị mật độ huỳnh quang trung bình hình học (MFI) được phân tích bằng cách sử dụng phương trình logistic bốn thông số trên đường cong đáp ứng 9 điểm sử dụng GraphPad Prism. Số lần tăng liên kết được tính toán theo phương trình sau:

Số lần tăng liên kết = Giá trị MFI hình học tối đa trong giới hạn liều được thử nghiệm

Giá trị MFI hình học cơ sở [0nM]

Khả năng liên kết của kháng thể đặc hiệu kép CD22 x CD28 với CD22 của người và CD28 được đánh giá trên tế bào T CD4⁺ của người sơ cấp và tế bào được

thiết kế biểu hiện quá mức CD22 (HEK293/hCD20/hCD22) hoặc nội sinh (âm tính Raji/CD80 và CD86) bằng kỹ thuật tế bào theo dòng chảy. Dòng tế bào âm tính được dùng làm đối chứng (HEK293/hCD20).

Giá trị EC_{50} /số lần tăng liên kết được tóm tắt ở Fig. 1 và Bảng 16.

Bảng 16: EC_{50} và kết quả số lần tăng liên kết từ thí nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy trên tế bào T $CD4^+$ của người và tế bào đích được thiết kế:

Kháng thể	HEK293/hCD 20		HEK293/hCD 20 /hCD22		Âm tính Raji/CD80 và CD86		Tế bào T $CD4^+$ của người	
	EC_{50} [M]	Số lần tăng liên kết	EC_{50} [M]	Số lần tăng liên kết	EC_{50} [M]	Số lần tăng liên kết	EC_{50} [M]	Số lần tăng liên kết
REGN5837	ND	1,07	NC	16,44	9,76E-09	38,35	NC	9,25
REGN5838	ND	1,11	1,14E-08	34,90	1,49E-08	81,74	NC	10,63
REGN5705	ND	1,11	ND	1,00	ND	1,04	4,13E-09	37,48
Đối chứng CD28 một nhánh	ND	1,05	ND	1,11	ND	1,07	n/c	10,97
Đối chứng kiểu tương đương	NC	1,82	ND	1,15	ND	1,08	ND	1,11

Từ viết tắt: NC = không tính được (được biểu thị cho các đường cong trong đó liên kết không đạt được độ bão hòa); ND = không xác định

Bảng 16. Giá trị EC_{50} và số lần tăng liên kết của kháng thể so với tế bào T $CD4^+$ của người và dòng tế bào được thiết kế như HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 hoặc tế bào B âm tính Raji/CD80 và CD86.

Như mong đợi, không có kháng thể CD28, kháng thể mẹ (REGN5705; HCVR/LCVR SEQ ID NO: 35/36) hoặc dạng đặc hiệu kép của nó (REGN5837, REGN5838 và đối chứng CD28 một nhánh (SEQ ID NO: 48) được liên kết với tế bào HEK293/hCD20 âm tính. Liên kết yếu, xấp xỉ 1,8 lần ở nồng độ cao nhất, được phát hiện với kháng thể đối chứng kiểu tương đương do liên kết không đặc hiệu (Fig. 1 và Bảng 16).

Liên kết của kháng thể kháng CD22 x kháng CD28 được quan sát thấy ở HEK293/hCD20/hCD22, (16,44 lần đối với REGN5837 và 34,9 lần đối với REGN5838 với EC_{50} xấp xỉ là 11,4nM) và trên tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 (38,35 lần đối với REGN5837 với EC_{50} là xấp xỉ 9,76nM và 81,74 lần đối với REGN5838 với EC_{50} là xấp xỉ 14,9nM). Không phát hiện sự liên kết đáng kể nào với đối chứng CD28 một nhánh và đối chứng kiểu tương đương (Fig. 1 và Bảng 16).

Liên kết của kháng thể hướng đích CD28 của người được phát hiện trên tế bào T $CD4^+$ của người sơ cấp. Kháng thể CD28 mẹ, REGN5705, được liên kết 37,48 lần với EC_{50} là xấp xỉ 4,13nM so với giá trị cơ sở, trong đó kháng thể đặc hiệu kép, REGN5837, REGN5838 và đối chứng một nhánh thể hiện sự liên kết lần lượt là 9,25 lần, 10,63 lần và 10,97 lần. Như mong đợi, đối chứng kiểu tương đương không liên kết với tế bào (Fig. 1 và Bảng 16).

Ví dụ 8. Đồng kích thích kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 tăng cường khả năng gây độc tế bào, hoạt hóa tế bào T, và giải thích cytokin bằng kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20xCD3

Sự tăng cường CD22xCD28 về việc tiêu diệt hướng đích CD20xCD3 được đánh giá trong thử nghiệm gây độc tế bào 96 giờ hướng đích tế bào Raji được thiết kế để không biểu hiện CD80 và CD86 (Raji-80/86DKO). Tóm lại, PBMC của người được để trong môi trường RPMI huyền phù ở 1×10^6 tế bào/mL và được ủ qua đêm ở 37°C để làm giàu tế bào bạch huyết bằng cách làm suy yếu đại thực bào bám

đỉnh, tế bào sao và một số tế bào bạch cầu đơn nhân khác. Ngày sau đó, tế bào Raji-80/86DKO được đánh dấu với 1uM thuốc nhuộm theo dấu huỳnh quang CFDA-SE và PBMC được làm yếu tế bào bám dính với 1uM thuốc nhuộm theo dấu huỳnh quang CellTrace Violet. Tế bào đích được đánh dấu và PBMC (tế bào tác động/tế bào đích với tỷ lệ 10:1) được đồng ủ với phần pha loãng liên tục của CD20xCD3 kháng thể đặc hiệu kép, REGN1979, có một nhánh chuỗi nặng chứa của SEQ ID NO: 42, nhánh chuỗi nặng khác chứa SEQ ID NO: 43 và chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 44), (khoảng nồng độ: từ 5 nM đến 0,64pM) và nồng độ cố định của phân tử đồng kích thích CD22xCD28 REGN5837 hoặc REGN5838, kháng thể đặc hiệu kép CD28 đối chứng 1 nhánh (REGN5678), hoặc đối chứng kiểu tương đương IgG4s (H4sH10154P3, đối chứng kiểu tương đương có cặp HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 37/38) ở 2,5ug/ml (16,7nM) trong 96 giờ ở 37°C. Tế bào được thu hoạch từ đĩa và được phân tích bằng FACS trên FACS BD LSRFortessa-X20. Đối với phân tích FACS, tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm phản ứng Fixable Live/Dead Far Red (Invitrogen). 20.000 đầu đếm được thêm vào mỗi giếng ngay trước phân tích FACS và 10.000 đầu được thu lại đối với mỗi mẫu. Để đánh giá tính đặc hiệu của việc tiêu diệt, tế bào được giám sát trên quần thể được đánh dấu CFDA-SE sống. Phần trăm quần thể sống được ghi lại và sử dụng để tính toán tỷ lệ sống sót.

Sự hoạt hóa tế bào T được đánh giá bằng cách ủ tế bào với kháng thể được liên hợp trực tiếp với CD2, CD4, CD8, và CD25. Phần trăm tế bào CD8⁺ biểu hiện CD25 được ghi nhận để xác định sự hoạt hóa tế bào T. Ngoài ra, khi tế bào T tăng sinh, CellTraceViolet được pha loãng, dẫn đến giảm MFI như được xác định bởi FACS. Do đó, sự tăng sinh của tế bào T được ghi lại khi có sự giảm MFI của CellTraceViolet trên tế bào T CD8⁺. Giá trị EC₅₀ đối với tế bào Raji đích không biểu hiện và liên kết với CD80 và CD86 sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính 4 thông số ở phần mềm Prism.

Chất nổi bề mặt từ thử nghiệm này được thu lại để phân tích hàm lượng cytokin. Nồng độ của IL 17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4, và IL-2 được phân tích sử dụng kit Cytometric Bead Array (CBA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng cytokin được suy ra từ đường cong được tổng hợp bởi tiêu chuẩn kit và được ghi lại dưới dạng pg/mL. Hàm lượng cytokin tối đa được tính toán sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính 4 thông số ở phần mềm Prism.

Kết quả phân tích để đánh giá khả năng của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20xCD3 REGN1979 (xem ở trên) để làm tế bào T của người không được kích thích thực hiện tiêu diệt tế bào đích biểu hiện CD20 và CD22 kết hợp với kháng thể CD22xCD28 hoặc kháng thể CD28 1 nhánh hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương được thử nghiệm.

REGN1979 hoạt hóa và định hướng tế bào T của người để làm suy yếu tế bào Raji không biểu hiện CD80 và CD86 theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Việc bổ sung nồng độ cố định kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 với REGN1979 làm tăng cường hiệu quả gây độc tế bào (EC_{50}) của REGN1979 lên 3,5-6,4 lần so với REGN1979 với kháng thể CD28 1 nhánh hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương (Bảng 17).

Quá trình ly giải tế bào đích được quan sát thấy qua trung gian REGN1979 có liên quan đến sự kích hoạt và tăng sinh tế bào T, được đo bằng cách điều hòa lên CD25 trên tế bào $CD8^+$ hoặc phân pha loãng thuốc tím CellTrace tương ứng. Việc bổ sung nồng độ cố định của các kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 vào REGN1979 đã tăng cường hiệu lực của REGN1979 gây hoạt hóa và tăng sinh tế bào T lần lượt là 2,1 đến 2,6 lần và 7,4-8,4 lần khi so sánh với REGN1979 với CD28 1 nhánh hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương (Bảng 17)

REGN1979 gây ra sự giải phóng cytokin của người. Cytokin được giải phóng được quan sát thấy với REGN1979 kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 được tăng cường khi có mặt nồng độ cố định của phân tử đồng kích thích CD22xCD28 với nồng độ cố định của CD28 1 nhánh hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương (Bảng 18).

Tóm lại, sự đồng kích thích làm tăng tiềm năng gây độc tế bào hướng đích. sự hoạt hóa tế bào T, giải phóng cytokin so với tiềm năng được quan sát thấy với CD20xCD3 kết hợp với kháng thể đối chứng.

Bảng 17: Giá trị EC_{50} đối với sự gây độc tế bào và hoạt hóa tế bào T (giá trị trung bình của 3 thí nghiệm)

Kháng thể	Tiêu diệt tế bào	Hoạt hóa tế bào T ($CD8^+/CD25^+$)	Phân chia tế bào T (CellTrace MFI của tế bào $CD8^+$)
-----------	------------------	---	---

	EC ₅₀ [M]	Số lần gấp EC ₅₀ so với IgG4s	EC ₅₀ [M]	Số lần gấp EC ₅₀ so với IgG4s	EC ₅₀ [M]	Số lần gấp EC ₅₀ so với IgG4s
REGN5837	1,48E-10	3,5	1,58E-11	2,1	4,81E-12	7,4
REGN5838	8,12E-11	6,4	1,28E-11	2,6	4,23E-12	8,4
CD28 nhánh	6,37E-10	0,8	3,46E-11	1,0	3,03E-11	1,2
IgG4s Iso	5,22E-10	1,0	3,32E-11	1,0	3,55E-11	1,0

Bảng 18: Giải phóng cytokin (pg/ml)

	REGN5837	REGN5838	CD28 nhánh	IgG4s Iso
IL-4	46	50	33	29
IL-6	907	810	248	283
IL-2	531	270	36	39
IL-10	1917	2555	739	375
TNFA	277	339	100	66
IFN γ	1847	1956	267	160
IL-17A	154	172	41	35

Ví dụ 9: Thử nghiệm sinh học đối với kháng thể đặc hiệu kép CD22

Việc hoạt hóa tế bào T đạt được bằng cách kích thích thụ thể của tế bào T (TCR) nhận diện peptit đặc hiệu trình diện bởi protein phức hệ tương hợp mô chính loại I hoặc II (MHCI hoặc MHCII) trên tế bào trình diện kháng nguyên (APC) (Goldrath *et al.* 1999). TCR được hoạt hóa, đến lượt, bắt đầu dòng thác sự kiện tín hiệu có thể được theo dõi bởi gen báo cáo được điều khiển bởi các yếu tố phiên mã khác nhau, chất hoạt hóa protein 1 (AP-1), yếu tố nhân của tế bào T được kích hoạt (NFAT) hoặc yếu tố nhân chất tăng cường chuỗi nhẹ kappa của tế bào B hoạt hóa (NF κ B). Phản ứng của tế bào T sau đó được tinh chỉnh thêm thông qua sự khớp của

các đồng thụ thể được biểu hiện thành phần hoặc cảm ứng trên tế bào T, chẳng hạn như CD28, CTLA-4 (Protein liên kết tế bào T gây độc tế bào 4), PD-1 (tế bào chết theo chương trình protein 1), LAG-3 (gen hoạt hóa tế bào lympho 3) hoặc các phân tử khác (Sharpe *et al.* 2002). Phân tử đồng kích thích, CD28, được hoạt hóa bởi phối tử nội sinh của nó, CD80 hoặc CD86 được biểu hiện trên APC. CD28 làm tăng tín hiệu tế bào như các đường được đối chứng bởi yếu tố phiên mã NF κ B sau quá trình hoạt hóa TCR. Đồng tín hiệu CD28 là rất quan trọng để hoạt hóa tế bào T một cách hiệu quả như biệt hóa, tăng sinh tế bào T, giải phóng cytokin và gây chết tế bào (Smeets *et al.* 2012).

Kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 được xác định đặc tính trong thử nghiệm sinh học chất báo cáo trên cơ sở luciferaza và thử nghiệm chức năng IL-2 sử dụng tế bào T CD4⁺ của người sơ cấp.

Thử nghiệm chất báo cáo trên cơ sở Luciferaza:

Thử nghiệm chất báo cáo trên cơ sở luciferaza tế bào T/APC (tế bào trình diện kháng nguyên) được phát triển để đánh giá tác động của sự hoạt hóa CD28 đối với hoạt tính NF κ B khi khớp với kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28 x kháng CD22.

Thiết kế tế bào T báo cáo:

Dòng tế bào T báo cáo đơn dòng được thiết kế bằng cách chuyển nạp tế bào T Jurkat bất tử (ATCC # TIB-152) với chất báo cáo lentivirut NF κ B-Luciferaza (NF κ B-Luc) (từ Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dòng báo cáo tách dòng (dòng Jurkat/NF κ B-Luc 1C11) được duy trì trong RPMI + 10% FBS + penixillin + streptomycin + glutamin được bổ sung với 1 μ g/mL puromycin.

Thiết kế APC:

Dòng tế bào HEK293 ổn định (ATCC, # CRL-1573) biểu hiện axit amin CD20 của người (axit amin M1 đến P297 có số đăng ký NP_068769.2) được tải nạp với CD22 của người (axit amin M1 đến A847 có số đăng ký NP_001762.2). Tế bào CD22 của người được phân lập bằng kỹ thuật phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) và tách dòng đơn. Dòng tế bào tách dòng thu được (HEK293/hCD20/hCD22 dòng E4) được duy trì trong DMEM + 10% + P/S/G + NEAA được bổ sung với 500 μ g/mL G418.

Tế bào B Raji B (ATCC # CCL-86), biểu hiện nội sinh CD20, CD22, Fc thụ thể gamma (Fc γ R), CD80 và CD86 trên bề mặt tế bào được biến đổi di truyền bằng cách loại bỏ CD80 và CD86 sử dụng kỹ thuật CRISPR. CD80 và CD86 là phối tử đã biết đối với CD28. Tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 được thiết kế được duy trì ở RPMI + 10% FBS + penicillin + streptomycin + glutamin được bổ sung với HEPES và natri pyruvat.

Kích thích tế bào T/APC:

Trong thí nghiệm này, tế bào T báo cáo được thiết kế được kích thích thông qua hai kháng thể đặc hiệu kép. Sự kích thích thứ nhất được tạo ra bởi kháng thể đặc hiệu kép REGN2281 hoạt hóa tế bào T, kháng thể kháng CD20 X kháng CD3 với một nhánh chuỗi nặng chứa SEQ ID NO: 39, một nhánh chuỗi nặng chứa SEQ ID NO: 40 và nhánh chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 41), phân tử hướng đích CD3 trên tế bào T báo cáo được thiết kế và CD20 trên tế bào HEK293 hoặc trên tế bào B âm tính Raji/CD80 và CD86. Sự kích thích đầu tiên bỏ qua nhu cầu hoạt hóa TCR bằng phối tử tự nhiên của chúng, là peptit cụ thể hiển thị trên phân tử MHC. Sự kích thích thứ hai là do kháng thể đặc hiệu kép CD28 (tức là, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28 x kháng CD22). Kháng thể này bắt chước sự hoạt hóa CD28 trên tế bào T bởi phối tử của nó, CD80/CD86, được biểu hiện trên APC. Tương tác của nó với CD28 trên tế bào T và CD22 trên tế bào HEK293 hoặc trên tế bào B âm tính Raji/CD80 và CD86 và gây ra sự hoạt hóa CD28 trên tế bào T báo cáo được thiết kế. Sự kích thích TCR và hoạt hóa CD28 dẫn đến làm tăng khả năng phiên mã của NF κ B, mà làm tăng khả năng lượng gen báo cáo, luciferaza.

Thiết lập thử nghiệm luciferaza:

RPMI1640 được bổ sung với 10% FBS và P/S/G được sử dụng làm môi trường thử nghiệm để điều chế huyền phù tế bào và phân pha loãng kháng thể để sàng lọc kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28.

Ngày trước khi sàng lọc, tế bào T báo cáo được thiết kế được nuôi cấy đến hàm lượng $0,5 \times 10^6$ tế bào/mL trong môi trường nuôi cấy tế bào. Kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28 x kháng CD22 được pha loãng liên tục theo tỷ lệ 1:3 và đối chứng được thử nghiệm khi có mặt lượng hằng định 200pM REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3, xem ở trên) hoặc REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương hIgG4 có cặp HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 45/46). Phân pha loãng 10 điểm nằm

trong khoảng từ 15 pM đến 100 nM với phân pha loãng cuối cùng không chứa kháng thể CD28.

Các chất phản ứng được thêm vào theo thứ tự sau: 1) Nồng độ cố định của 200pM REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3, xem ở trên) hoặc REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương hIgG4, xem ở trên) cuối cùng được thêm vào mỗi giếng trong đĩa đáy tròn trắng 96 giếng; 2) tế bào HEK293 được tái huyền phù đến 4×10^5 tế bào/mL (nồng độ tế bào cuối cùng 1×10^4 tế bào/giếng) hoặc tế bào B âm tính Raji/CD80 và CD86 đến 2×10^6 tế bào/mL (nồng độ tế bào cuối cùng 5×10^4 tế bào/giếng) được thêm vào đĩa tương ứng; 3) Kháng thể được pha loãng liên tục được thêm vào giếng tương ứng; 4) Tế bào T báo cáo được nuôi cấy qua đêm được tái huyền phù đến 2×10^6 /mL và được thêm vào đĩa với nồng độ cuối cùng 5×10^4 tế bào/giếng. Các đĩa được ủ trong 4-6 giờ ở 37°C/5% CO₂, trước khi thêm 100 µL chất phản ứng ONE-Glo™ (Promega) để ly giải tế bào và phát hiện hoạt tính của luciferaza. Ánh sáng phát ra được ghi lại theo đơn vị ánh sáng tương đối (RLU) trên đầu máy đọc đĩa nhiều nhãn Envision (PerkinElmer). Tất cả phân pha loại được thử nghiệm hai lần.

Giá trị EC₅₀ của kháng thể được xác định bằng cách khớp dữ liệu với phương trình logarit bốn thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm sử dụng phần mềm GraphPad Prism™. Số lần cảm ứng tăng lên được tính toán theo phương trình sau:

$$\text{Số lần cảm ứng} = \frac{\text{Giá trị RLU trung bình tối đa nằm trong khoảng liều được thử nghiệm}}{\text{Giá trị RLU trung bình cơ sở [0nM]}}$$

Thử nghiệm chức năng IL-2 sử dụng tế bào T CD4⁺ của người sơ cấp:

Thử nghiệm chức năng tế bào T CD4⁺/APC được phát triển để đánh giá sự hoạt hóa CD28 đối với sự sản xuất IL-2 khi khớp với kháng thể đặc hiệu kép kháng kháng CD22 xCD28.

Phân lập tế bào T CD4⁺ sơ cấp của người:

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC) được phân lập từ bao bạch cầu của vật cho khỏe mạnh. Phân lập PBMC được thực hiện bằng cách quay ly tâm gradien sử dụng ống SepMate™ 50 mL theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Tóm lại, 15 mL của FicollPaque PLUS được tạo lớp vào ống SepMate 50 mL, sau đó

thêm 30 mL bạch cầu được pha loãng theo tỷ lệ 1:2 với D-PBS+2% FBS. Bước tiếp theo được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất SepMate. Tế bào T CD4⁺ được phân lập từ PBMC sử dụng kit Microbead CD4 từ Miltenyi Biotec theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào T CD4⁺ được đông lạnh trong FBS chứa 10% DMSO ở nồng độ là 5×10^6 tế bào trên bình.

Giải phóng IL-2 từ tế bào T CD4⁺ được xử lý với kháng thể CD28:

Trong thử nghiệm này, tế bào T CD4⁺ sơ cấp được hoạt hóa thông qua liên kết chéo của CD3 trên bề mặt của chúng sử dụng kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 x kháng CD3 (REGN2281, xem ở trên) kết hợp với tế bào HEK293 được thiết kế để biểu hiện tế bào Raji biểu hiện CD20 của người hoặc với tế bào Raji biểu hiện CD20 nội sinh, trong đó CD80 và CD86 được làm im lặng sử dụng kỹ thuật CRISPR (tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86). Liên kết của nhánh CD20 của REGN2281 với tế bào biểu hiện CD20 gây ra sự kết cụm của thụ thể CD3, tạo ra tính hiệu thứ nhất cần cho việc kích thích tế bào T. Quan trọng là, trong một số trường hợp, sự đồng nuôi cấy của bạch cầu sơ cấp với tế bào khác biệt về di truyền dẫn đến sự không tương hợp của các quyết định alen và dẫn đến hoạt hóa tế bào T. Điều này có thể tạo ra kích thích sơ cấp đủ khi không thêm ngoại sinh kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 x kháng CD3. Bất kể có kích thích sơ cấp hay không, để phát hiện sự giải phóng IL-2 có thể xác định số lượng, mà có thể được tạo ra bằng phân tử CD28 liên kết chéo, là cần thiết. Ở đây, kháng thể CD28 đặc hiệu kép (tức là, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28 x kháng CD22) tương tác với CD28 trên tế bào T CD4⁺ và CD22 trên tế bào HEK293/hCD20 hoặc tế bào âm tính RAJI/CD80 và CD86 và gây ra sự hoạt hóa kết cụm của CD28. Sự khớp TCR và CD28 kết hợp dẫn đến tăng sản xuất IL-2 được giải phóng vào môi trường nuôi cấy tế bào. IL-2 được phát hiện và định lượng từ chất nổi bề mặt tế bào sử dụng kit AlphaLisa từ PerkinElmer đồng nhất, không rửa.

Tế bào T CD4⁺ được phân lập và làm đông lạnh trước đó được rã đông vào ngày thử nghiệm trong môi trường kích thích (môi trường nuôi cấy tế bào X-VIVO 15 được bổ sung với 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA, và 0,01 mM BME chứa 50 U/ml benzonaza nucleaza). Tế bào được ly tâm ở 1200 rpm trong 10 phút, được tái huyền phù trong môi trường kích thích và được để vào đĩa đáy tròn 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào HEK293 được thiết kế để biểu hiện CD20 của người

một mình hoặc kết hợp với CD22 của người, được xử lý với 15 $\mu\text{g/mL}$ Mitomycin C trong môi trường kích thích sơ cấp ở nồng độ 10×10^6 tế bào/mL. Tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 được xử lý với 20 $\mu\text{g/mL}$ Mitomycin C trong môi trường kích thích sơ cấp ở nồng độ 10×10^6 tế bào/mL. Sau khi ủ trong 1 giờ ở 37°C , 5% CO_2 , HEK293 và tế bào Raji được rửa ba lần với D-PBS chứa 2% FBS và được thêm vào giếng chứa tế bào T CD4+ ở nồng độ cuối cùng là 1×10^4 tế bào trên giếng tế bào HEK293 hoặc 5×10^4 tế bào trên giếng đối với tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86. Sau đó, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD28 x kháng CD22 hoặc kháng thể đối chứng, nằm trong khoảng từ 15pM đến 100nM, được thêm vào giếng khi có mặt 2nM REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3) hoặc REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương hIgG4 âm tính, xem ở trên). Điểm cuối của phản pha loãng 10 điểm là không có kháng thể CD28. Sau khi đã được ủ trong 72 giờ ở 37°C , 5% CO_2 chúng được ly tâm thành viên tế bào và 40 μL chất nổi bề mặt môi trường được thu thập. Từ đó, 5 μL được thử nghiệm trong phân tích AlphaLISA IL-2 của người theo quy trình của nhà sản xuất. Các phép đo được thu thập trên đầu đọc tấm nhiều nhãn Envision và giá trị RFU thô (đơn vị huỳnh quang tương đối) được vẽ biểu đồ. Tất cả phân pha loại được thử nghiệm hai lần.

Giá trị EC_{50} của kháng thể được xác định bằng cách khớp dữ liệu với phương trình logarit bốn thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm sử dụng phần mềm GraphPad PrismTM. Số lần cảm ứng tăng lên được tính toán phương trình sau:

$$\text{Số lần cảm ứng} = \frac{\text{Giá trị RFU trung bình tối đa nằm trong khoảng liều được thử thời kỳ nghiệm}}{\text{Giá trị RFU trung bình cơ sở [0nM]}}$$

Kết quả, tóm tắt và kết luận:

Thử nghiệm chất báo cáo trên cơ sở Luciferaza:

Khả năng của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28 tạo ra sự đồng kích thích thông qua CD28 trên tế bào T khi vắng mặt hoặc có mặt sự biểu hiện đích CD22 được đánh giá trong thử nghiệm sinh học trên cơ sở chất báo cáo sử dụng hoạt tính luciferaza làm kết quả đọc ra.

Đường cong hoạt hóa được thể hiện ở Fig. 2 (A và B), EC_{50} và giá trị số lần cảm ứng tăng lên được tóm tắt ở Bảng 19 và 20 đối với tế bào T báo cáo được thiết kế được đồng ủ với tế bào HEK293/hCD20 hoặc HEK293/hCD20/hCD22 được bổ

sung 200pM REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương hIgG4) hoặc REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3).

Khi tế bào T báo cáo và APC có nguồn gốc HEK293 được xử lý với 200pM REGN1945, không kháng thể nào trong số kháng thể đặc hiệu kép CD28 thể hiện sự tăng hoạt tính luciferaza khi vắng mặt sự kích thích TCR, bất kể có sử dụng dòng HEK293 trong thử nghiệm hay không. Sự hoạt hóa luciferaza tăng lên chỉ được quan sát thấy ở kháng thể CD28 mẹ (REGN5705) với tế bào HEK293/hCD20 (2,18x) và tế bào HEK293/hCD20/hCD22 (2,05x). Kháng thể CD28 một nhánh và đối chứng kiểu tương đương không làm tăng đáp ứng luciferaza ở thiết lập này (Bảng 19 và Fig. 2).

Khi tế bào T báo cáo và APC có nguồn gốc HEK293 được xử lý với 200pM REGN2281, cả hai kháng thể đặc hiệu kép kháng kháng CD22 x CD28 (REGN5837 và REGN5838) đều đem lại hoạt tính luciferaza mạnh với tế bào HEK293 biểu hiện CD22, được chỉ ra bởi sự tăng EC_{50} và giá trị số lần cảm ứng tăng lên. Kháng thể đối chứng CD28 một nhánh và kháng thể CD28 mẹ (REGN5705; xem HCVR/LCVR SEQ ID NO: 35/36) thể hiện hoạt tính tương tự trên dòng HEK293. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương không làm tăng đáp ứng luciferaza ở thiết lập này (Bảng 20 và Fig. 2).

Khi tế bào T báo cáo và tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 được xử lý với 200pM REGN1945, cả kháng thể đặc hiệu kép kháng kháng CD22 x CD28 (REGN5837 và REGN5838) và kháng thể CD28 mẹ gây ra hoạt tính luciferaza, trong khi kháng thể đối chứng CD28 một nhánh và đối chứng kiểu tương đương không thể hiện hoạt tính (Bảng 19 và Fig. 2).

Khi tế bào T báo cáo và tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 được xử lý với 200pM REGN2281, tất cả kháng thể đặc hiệu kép CD28 (REGN5837 và REGN5838) và kháng thể đối chứng CD28 một nhánh, bao gồm kháng thể CD28 mẹ, gây ra hoạt tính luciferaza. Giá trị EC_{50} chỉ có thể được xác định đối với kháng thể kháng CD22 x kháng CD28 và kháng thể CD28 mẹ nhưng không được xác định đối với đối chứng CD28 một nhánh do không đạt được hàm lượng bão hòa. Không sự hoạt hóa nào được phát hiện đối với đối chứng kiểu tương đương (Bảng 20 và Fig. 2).

Thử nghiệm chức năng IL-2 sử dụng tế bào T CD4⁺ của người sơ cấp:

Khả năng của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28 tạo ra sự đồng kích thích thông qua CD28 trên tế bào T khi vắng mặt hoặc có mặt sự biểu hiện đích CD22 được đánh giá trong thử nghiệm tế bào T CD4⁺ sơ cấp chức năng xác định sự sản xuất IL-2 cytokin.

Đường cong hoạt hóa được thể hiện ở Fig. 3 (A và B), EC₅₀ và giá trị số lần cảm ứng tăng lên được tóm tắt ở Bảng 21 đối với tế bào T CD4⁺ được đồng ủ với tế bào HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, hoặc tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 khi có mặt 2nM REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương hIgG4) hoặc REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3) không thay đổi.

Sự giải phóng IL-2 không xác định được được quan sát thấy ở giếng chứa tế bào HEK293/hCD20 hoặc HEK293/hCD20/CD22 với lượng REGN1945 không thay đổi, do không có đủ sự kích thích tế bào T dị sinh (Fig. 3). Tuy nhiên, sự giải phóng IL-2 được phát hiện ở giếng chứa tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 với lượng REGN1945 không thay đổi, do đáp ứng dị sinh đáng kể tạo ra đủ sự kích thích sơ cấp, thậm chí khi không có sự kết cụm CD3 qua trung gian kháng thể (Fig. 3 và Bảng 21).

Hàm lượng IL-2 có thể xác định được xác định ở mẫu chứa tế bào HEK293/hCD20 hoặc HEK293/hCD20/CD22 khi thêm 2nM nồng độ REGN2281 không thay đổi và CD28 mAb mẹ (REGN5705, xem ở trên). Trái ngược với CD28 mAb hóa trị hai, sự giải phóng IL2 không tăng mạnh khi thêm mAb đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28 vào giếng chứa tế bào HEK293/hCD20 và REGN2281. Chỉ khi có mặt tế bào HEK293/hCD20/CD22 và REGN2281 mà mAb đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28 làm tăng đáng kể sự giải phóng IL-2 (Fig. 3 và Bảng 22).

Các bảng 19-22 được nêu dưới đây.

Bảng 19 thể hiện giá trị EC₅₀ theo cột, giá trị tối đa và giá trị số lần cảm ứng tăng của hoạt tính luciferaza trong tế bào T được thiết kế được đồng ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 hoặc tế bào âm tính RAJI/CD80 và CD86 và 200pM REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương) không thay đổi.

Bảng 20 thể hiện giá trị EC₅₀ theo cột, giá trị tối đa và giá trị số lần cảm ứng tăng của hoạt tính luciferaza trong tế bào T được thiết kế được đồng ủ với

HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22 hoặc tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 và 200pM REGN2281 (kháng CD20 x kháng CD3) không thay đổi.

Bảng 21 thể hiện giá trị EC_{50} theo cột, giá trị tối đa và giá trị số lần cảm ứng tăng của sự giải phóng IL-2 trong tế bào T $CD4^+$ được đồng ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, hoặc tế bào âm tính RAJI/CD80 và CD86 và 2nM REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương) không thay đổi.

Bảng 22 thể hiện giá trị EC_{50} theo cột, giá trị tối đa và giá trị số lần cảm ứng tăng của sự giải phóng IL-2 trong tế bào T $CD4^+$ được thiết kế được đồng ủ với HEK293/hCD20, HEK293/hCD20/hCD22, hoặc tế bào âm tính Raji/CD80 và CD86 và 2nM REGN2281 ((kháng CD20 x kháng CD3) không thay đổi.

Bảng 19: Giá trị EC₅₀, tối xa và số lần cảm ứng tăng của hoạt tính luciferaza ở tế bào T báo cáo được thiết kế khi không có sự kích thích TCR với 200pM REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương):

Kháng thể	HEK293/hCD20				HEK293/hCD20/hCD22				Âm tính Raji/CD80 và CD86			
	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa
REGN5837	ND	1,01	11860	ND	1,11	13280	1,66E-09	1,29	16020	1,66E-09	1,29	16020
REGN5838	ND	1,04	11980	ND	1,05	12480	2,55E-09	2,06	26500	2,55E-09	2,06	26500
REGN5705	6,23E-09	2,18	24980	8,45E-09	2,05	25060	7,88E-09	2,57	33180	7,88E-09	2,57	33180
CD28 một nhánh	ND	1,00	11700	ND	1,05	12880	ND	1,05	13720	ND	1,05	13720
Đối chứng kiểu tương đương	ND	1,04	11180	ND	1,04	12160	ND	1,04	12540	ND	1,04	12540

Từ viết tắt: ND = không xác định

Bảng 20: Giá trị EC₅₀, tối đa và số lần cảm ứng tăng của hoạt tính luciferaza ở tế bào T báo cáo mặt thiết kế khi có sự kích thích TCR với 200pM REGN2281 (α CD20 x α CD3):

Kháng thể	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Âm tính Raji/CD80 và CD86		
	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RLU tối đa
REGN5837	NC	1,40	25014 0	6,44E-10	8,46	799220	1,43E-09	4,46	754820
REGN5838	NC	1,65	25638 0	1,89E-09	4,53	398720	1,33E-09	11,02	1725640
REGN5705	2,63E-10	3,55	40868 0	7,7E-11	2,06	171300	4,33E-10	4,15	568740
CD28 một nhánh	NC	3,56	45456 0	1,29E-08	2,82	228840	NC	4,46	642220
Đối chứng kiểu tương đương	ND	1,09	21258 0	ND	1,08	103940	ND	1,05	175540

Từ viết tắt: NC = không tính được (được biểu thị cho các đường cong trong đó liên đáp ứng không đạt được độ bão hòa);

ND = không xác định.

Bảng 21: Giá trị EC₅₀, tối đa và số lần cảm ứng tăng của sự giải phóng IL-2 từ tế bào T CD4⁺ khi có mặt 2nM REGN1945 (đối chứng kiểu tương đương).

Kháng thể	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Ấm tính Raji/CD80 và CD86		
	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RFU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RFU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RFU tối đa
REGN5837	ND	1,07	2,01E+03	ND	1,00	1,74E+03	6,31E-11	5,07	6,18E+04
REGN5838	ND	1,24	2,22E+03	ND	1,00	1,89E+03	4,23E-10	3,05	5,38E+04
REGN5705	ND	1,11	2,29E+03	ND	1,71	2,95E+03	1,11E-10	3,56	4,95E+04
CD28 một nhánh	ND	1,32	1,76E+03	ND	1,91	2,27E+03	NC	2,43	4,35E+04
Đối chứng kiểu tương đương	ND	1,19	2,29E+03	ND	1,47	1,87E+03	ND	1,00	1,51E+04

Từ viết tắt: NC = không tính được (được biểu thị cho các đường cong trong đó liên đáp ứng không đạt được độ bão hòa); ND = không xác định.

Bảng 22: Giá trị EC₅₀, tối đa và số lần cảm ứng tăng của sự giải phóng IL-2 từ tế bào T CD4⁺ khi có mặt 2nM REGN1945 (α CD20 x α CD3).

Kháng thể	HEK293/hCD20			HEK293/hCD20/hCD22			Ấm tính Raji/CD80 và CD86		
	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RFU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RFU tối đa	EC ₅₀ [M]	Số lần cảm ứng tăng	RFU tối đa
REGN5837	NC			2,35E-10			4,66E-11		
REGN5838	NC	4,68	1,21E+04	6,85E-10	55,61	1,01E+05	8,93E-11	5,11	2,40E+05
REGN5705	2,23E-09	6,82	1,31E+04	4,07E-09	53,73	9,63E+04	4,51E-11	6,32	2,54E+05
CD28 một nhánh	NC	30,80	6,89E+04	NC	32,24	5,74E+04	NC	6,15	2,49E+05
Đối chứng kiểu tương đương	ND	19,45	3,99E+04	ND	6,85	1,89E+04	ND	4,45	1,79E+05
		1,22	2,22E+03		1,00	3,20E+03		1,00	4,54E+04

Từ viết tắt: NC = không tính được (được biểu thị cho các đường cong trong đó liên đáp ứng không đạt được độ bão hòa); ND = không xác định.

Ví dụ 10: Ảnh hưởng của tổ hợp kháng thể kháng CD22 X kháng CD28 cộng với Cemiplimab đối với sự giải phóng IL-2 từ tế bào được thiết kế biểu hiện PD-L1

Nguyên liệu và phương pháp

Thiết kế APC:

Tế bào RAJI

RAJI là dòng tế bào lympho B được phân lập từ nam giới 11 tuổi trong (ATCC® CCL-86™). RAJI được duy trì trong RPMI + 10%FBS + P/S/G + NaPyr + HEPES.

Âm tính RAJI CD80 và CD86

Sự biểu hiện của CD80 và CD86 ở tế bào RAJI được loại bỏ sử dụng hệ CRISPR/Cas9.

Dòng NALM6 G5

Dòng NALM6 là dòng tế bào bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL) được phân lập từ nam giới 19 tuổi trong [dòng NALM6 G5 (ATCC, # CRL-3273)]. Tế bào NALM6 được duy trì trong RPMI + 10% FBS + P/S/G.

WSU-DLCL2

WSU-DLCL2 là dòng tế bào DLBCL được phân lập từ từ dịch tràn màng phổi của nam giới da trắng 41 tuổi (Leibnitz Institute-DSMZ, Cat. # ACC 575).

Dòng tế bào được thiết kế PD-L1

Dòng tế bào âm tính NALM-6, RAJI CD80 và CD86 (RAJI/CD80-CD86-), và WSU-DLCL2 được thiết kế di truyền để biểu hiện ổn định PD-L1 của người (axit amin M1-T290 có số đăng ký NP_054862.1). Dòng tế bào thu được NALM6/PD-L1, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1, và WSU-DLCL2/PD-L1 được duy trì trong môi trường tương ứng, được bổ sung với 0,5µg/mL puromycin cho tế bào RAJI/CD80-CD86-, và 1µg/mL puromycin cho tế bào NALM-6/PD-L1 và WSU-DLCL2/PD-L1.

Thử nghiệm hoạt hóa tế bào T đối với sự tăng sinh của tế bào T và sự giải phóng IL-2

Ảnh hưởng của REGN5837 đối với sự giải phóng IL-2 được đánh giá sử dụng tế bào T sơ cấp của người và dòng tế bào u lympho tế bào B của người dị sinh

[NALM-6, NALM-6/PD-L1, RAJI/CD80-CD86-, RAJI/CD80-CD86-/PD-L1, WSU-DLCL2, WSU-DLCL2/PD-L1]) khi có mặt nồng độ cố định của cemiplimab. Sự đồng nuôi cấy của bạch cầu sơ cấp với tế bào khác biệt về di truyền dẫn đến sự không tương hợp của các quyết định alen và có thể dẫn đến hoạt hóa tế bào T. Đối với các thử nghiệm sử dụng tế bào NALM-6 và RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1), thử nghiệm hoạt hóa tế bào T được thực hiện với tế bào T sơ cấp được làm giàu của người từ 4 người cho, đồng thời thử nghiệm dùng tế bào WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) sử dụng tế bào T từ 1 người cho.

Phân lập tế bào T được sử dụng trong thử nghiệm hoạt hóa tế bào T để thử nghiệm xử lý kết hợp REGN5837 + REGN2810.

Đối với các thí nghiệm dùng tế bào NALM-6 và RAJI/CD80-CD86, tế bào T CD3+ được phân lập từ PBMC của 3 người cho (555109, 555130, và 555131), trong khi PBMC của một người cho (555175) được sử dụng trong thử nghiệm với tế bào WSU-DLCL2. Đối với người cho 555109, PBMC của người đó được phân lập từ máu ngoại vi bằng cách ly tâm gradien mật độ. Tóm lại, 15ml Ficoll-Paque PLUS được thêm vào 50ml ống hình nón, và sau đó là 30ml máu được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với PBS chứa 2% FBS được phân lớp ở trên. Sau khi ly tâm 30 phút ở 400 x g, khi dừng, lớp tế bào đơn nhân được chuyển sang một ống mới, được pha loãng 5x với PBS có chứa 2% FBS và ly tâm trong 8 phút ở 300 x g. Đối với người cho 555130, 555131 và 555175, PBMC được phân lập từ máu ngoại vi từ người hiến khỏe mạnh bằng cách sử dụng kit phân lập PBMC của người trực tiếp EasySep (EasySep Direct Human PBMC Isolation Kit) từ Stem Cell Technologies và theo quy trình của nhà sản xuất. PBMC được phân lập được làm đông lạnh trong FBS chứa 10% DMSO. Đối với việc phân lập tế bào T CD3+, bình đông lạnh của PBMC được rã đông trong bể nước 37°C và pha loãng trong môi trường kích thích (môi trường nuôi cấy tế bào X-VIVO 15 được bổ sung với 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA, và 0,01 mM BME) chứa 50 U/ml benzonaza nucleaza. Tế bào được ly tâm ở 1200 rpm trong 10 phút, được tái huyền phù trong đệm EasySep và được phân lập sử dụng kit phân lập tế bào EasySep từ T StemCell Technologies, theo quy trình của nhà sản xuất.

Giải phóng IL-2 từ tế bào T CD3⁺ được xử lý với kháng thể CD28:

Thử nghiệm hoạt hóa tế bào T với tế bào OVCAR-3, PEO1, NALM-6, RAJI/CD80-CD86-, và WSU-DLCL2 của người (+/- PD-L1)

Tế bào T CD3+, được tái huyền phù trong môi trường kích thích (môi trường nuôi cấy tế bào X-VIVO 15 được bổ sung với 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA, và 0,01mM BME), được đưa vào đĩa đáy tròn 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào NALM-6, RAJI/CD80-CD86-, WSU-DLCL2 có hoặc không có PD-L1 (+/- PD-L1), được xử lý với 20 $\mu\text{g/mL}$ (RAJI) hoặc 15 $\mu\text{g/mL}$ (NALM-6 và WSU-DLCL2), mitomycin C để ngăn chặn sự tăng sinh. Sau khi ủ trong 1 giờ ở 37°C , 5% CO_2 , tế bào được xử lý mitomycin C được rửa 3 lần với D-PBS chứa 2% FBS, sau đó được tái huyền phù trong môi trường kích thích. Tế bào NALM-6, RAJI/CD80-CD86-, và tế bào WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) được thêm vào giếng chứa tế bào T CD3+ ở nồng độ cuối cùng là $2,5 \times 10^4$ tế bào/giếng đối với tế bào RAJI và WSU-DLCL2 và 5×10^4 đối với tế bào NALM-6. Nồng độ không đổi của cemiplimab hoặc đối chứng IgG4^P không liên kết (20nM) được thêm vào giếng. Trong thử nghiệm sử dụng tế bào WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) nồng độ không đổi của belatacept (hCTLA4.hIgG1) hoặc đối chứng IgG1 không liên kết (50nM) được thêm vào giếng. Sau đó, kháng thể REGN5837 hoặc kháng thể đối chứng không phải TAAxCD28 được chuẩn độ từ 3,1pM đến 200nM theo tỷ lệ pha loãng liên tục là 1:4 đối với tế bào NALM-6 (+/-PD-L1) và từ 0,6pM đến 1000nM theo tỷ lệ pha loãng là 1:6 đối với WSU-DLCL2 và giếng RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) và được thêm vào giếng. Điểm cuối của đường cong nồng độ 10 điểm không chứa REGN5837 hoặc kháng thể đối chứng không phải TAAxCD28. Sau khi ủ đĩa trong 72 giờ (WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)) hoặc 96 giờ (NALM-6 và RAJI/CD80-CD86- (+/-PD-L1)) ở 37°C , 5% CO_2 , 50 μL chất nổi bề mặt môi trường được thu thập để xác định sự giải phóng IL-2.

Đối với sự giải phóng IL-2, 5 μL chất nổi bề mặt được thử nghiệm bằng cách sử dụng kit AlphaLISA IL-2 của người theo quy trình của nhà sản xuất. Sự xác định IL-2 được thực hiện trên máy đọc đĩa nhiều nhãn Envision của Perkin Elmer. Đường cong chuẩn của nồng độ IL-2 đã biết được bao gồm và được sử dụng để suy ra giá trị pg/ml.

Tất cả các phân pha loãng liên tục được thử nghiệm ba lần đối với sự giải phóng IL-2. Giá trị EC50 đối với kháng thể được xác định từ phương trình logarit 4

thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm sử dụng phần mềm GraphPad Prism™. Mức giải phóng IL-2 tối đa được đưa ra dưới dạng đáp ứng tối đa trung bình nằm trong khoảng liều được thử nghiệm. Ngoài ra, dữ liệu được ghi nhận cho các thử nghiệm sử dụng tế bào WSU-DLCL2 bao gồm giá trị IL-2 được đưa ra khi có mặt hoặc không có mặt 1000nM kháng thể được chuẩn độ, để xác định sự giảm lượng IL-2 được quan sát thấy với nồng độ tăng của kháng thể không phải TAAxCD28.

Kết quả, tóm tắt và kết luận:

Thử nghiệm chức năng IL-2 sử dụng tế bào T CD3+ của người sơ cấp:

Khả năng của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD22 x kháng CD28 tạo ra sự đồng kích thích thông qua CD28 trên tế bào T khi có mặt dòng tế bào lympho B, biểu hiện nội sinh CD22, được đánh giá trong thử nghiệm tế bào T CD3+ sơ cấp chức năng xác định sự sản xuất IL-2 cytokin.

Đường cong hoạt hóa được thể hiện ở Fig. 5A và 5B đối với tế bào T được ủ với NALM-6 (+/- PD-L1) (Fig. 5A) hoặc RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) (Fig. 5B). Giá trị EC50 và Max IL-2 được tóm tắt ở Bảng 23A đối với tế bào T CD3+ được ủ với tế bào NALM-6 (+/- PD-L1) và Bảng 23B đối với tế bào T CD3+ được ủ với RAJI/CD80-CD86- (+/- PD-L1) khi có mặt lượng không đổi 20nM đối chứng kiểu tương đương hIgG4^P hoặc cemiplimab. Đối với tế bào T CD3+ được ủ với tế bào WSU-DLCL2 (+/- PD-L1), đường cong hoạt hóa được thể hiện ở Fig. 4. Giá trị EC50 và IL-2 (được ghi nhận đối với 0nM hoặc 1000nM REGN5837 hoặc kháng thể không phải TAAxCD28) được tóm tắt ở Bảng 24 đối với tế bào T được ủ với tế bào WSU-DLCL2 (+/- PD-L1) khi có mặt lượng không đổi 20nM đối chứng kiểu tương đương hIgG4^P hoặc cemiplimab và khi có mặt lượng không đổi 50nM đối chứng kiểu tương đương hIgG1 hoặc thụ thể CTLA-4, belatacept.

Khi có mặt tế bào T sơ cấp của người và dòng tế bào lympho tế bào B ngoại sinh RAJI/CD80-CD86- và NALM-6, REGN5837 sự giải phóng IL-2 làm tăng phụ thuộc vào nồng độ. Kháng thể đối chứng không phải TAAxCD28 làm tăng nhẹ IL-2 ở nồng độ kháng thể cao. Khi vắng mặt của PD-L1 trên tế bào RAJI/CD80-CD86- hoặc NALM-6, việc thêm 20nM cemiplimab không gây ảnh hưởng đến sự giải phóng IL-2. Khi có mặt tế bào RAJI/CD80-CD86- hoặc NALM-6 biểu hiện PD-L1, sự giải phóng IL-2d tối đa để đáp ứng với điều trị với một mình REGN5837 giảm

xuống, so với tế bào T được ủ với tế bào biểu hiện không phải PD-L1. Việc thêm cemiplimab làm tăng tối thiểu sự giải phóng IL-2 qua trung gian REGN5837 trong điều kiện với tế bào NALM-6/PD-L1, trong khi vẫn có sự tăng nhẹ sự giải phóng IL-2 khi có mặt tế bào RAJI/CD80-CD86-/PD-L1, so với hàm lượng được quan sát thấy ở điều kiện với tế bào RAJI/CD80-CD86, thiếu PD-L1.

Với sự hiện diện của tế bào T nguyên sinh ở người và dòng tế bào lympho B dị sinh WSU-DLCL2, không quan sát thấy sự gia tăng phóng thích IL-2 phụ thuộc vào nồng độ. Ngược lại, kháng thể đối chứng không phải TAAxCD28 được quan sát thấy làm giảm giải phóng IL-2 theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Không giống như tế bào NALM-6 và RAJI/CD80-CD86-, vốn biểu hiện rất ít hoặc không thể hiện các phối tử CD28, dòng tế bào WSU-DLCL2 được biết là biểu hiện các phối tử CD28. Vì nhánh liên kết CD28 của REGN5837, và do đó nhánh CD28 của kháng thể không phải TAAxCD28, được biết là cạnh tranh với các phối tử CD28 để liên kết với CD28, kháng thể đối chứng không phải TAAxCD28 chặn sự hoạt hóa CD28 bởi phối tử CD28 được biểu hiện trên WSU-DLCL2 tế bào, dẫn đến giảm giải phóng IL-2. Không giống như điều khiển không phải TAAxCD28, IL-2 không bị giảm bởi REGN5837, do khả năng neo vào các ô WSU-DLCL2 thông qua nhánh liên kết CD22 của nó cho phép nó hoạt động tương tự như phối tử CD28, về cơ bản thay thế chúng. Khi có mặt tế bào WSU-DLCL2/PD-L1, giải phóng IL-2 cơ bản giảm so với tế bào WSU-DLCL2 không biểu hiện PD-L1. Việc bổ sung REGN5837 một mình, trong trường hợp không có cemiplimab dẫn đến việc phóng thích IL-2 được tăng cường một chút. Khi bổ sung cemiplimab 20nM, hoạt tính cơ bản được tăng cường và có thể được tăng cường thêm một chút với chuẩn độ liều REGN5837, làm cho giải phóng IL-2 tối đa cao hơn đối với sự kết hợp của REGN5837 và cemiplimab, so với điều trị một mình. Như được quan sát với tế bào WSU-DLCL2, việc ủ tế bào WSU-DLCL2/PD-L1 khi có mặt không TAAxCD28 dẫn đến giảm mức IL-2, bất kể là cemiplimab hay đối chứng kiểu tương đương hIgG4P. Để khám phá thêm về tác động mà biểu hiện phối tử CD28 có trong việc che giấu tác động của REGN5837, belatacept thụ thể CTLA-4 hòa tan, hoặc đối chứng kiểu tương đương phù hợp với hIgG1, đã được thêm vào ở 50nM. Belatacept liên kết với ái lực cao với các phối tử CD28, CD80 và CD86, đồng thời ngăn chặn sự tương tác của chúng và do đó kích hoạt CD28. Khi có 50nM Belatacept, giải phóng IL-2 cơ bản bị

giảm đáng kể, do các phối tử CD28 không có khả năng liên kết CD28 và cung cấp tín hiệu kích thích. Trong những điều kiện này, REGN5837 vẫn có thể tham gia vào CD28 và cung cấp sự kích thích, được ghi nhận bởi sự tăng cường phóng thích IL-2 phụ thuộc vào liều. Trong khi việc bổ sung cemiplimab 20nM, bản thân nó, không tăng cường giải phóng IL-2 khi có mặt belatacept, sự kết hợp cemiplimab với liều tăng dần của REGN5837 làm tăng giải phóng IL-2 tối đa, so với REGN5837 một mình, khi có mặt tế bào được thiết kế để biểu hiện quá mức PD-L1.

Bảng 23A: : Sự kết hợp của REGN5837 với Cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 trên REGN5837 Điều trị một mình trong tế bào NALM-6 được thiết kế để thể hiện PD-L1

Tế bào T sơ cấp + NALM-6 (+/- PD-L1)				Tối đa [pg/ml]	EC ₅₀ [M]
Tế bào T người cho 555109	NALM-6	REGN5837	Cemiplimab	199,50	8,22E-10
			hlgG4 ^P	217,80	7,54E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	21,71	ND
			hlgG4 ^P	24,74	ND
	NALM-6/hPD-L1	REGN5837	Cemiplimab	68,34	7,42E-10
			hlgG4 ^P	40,26	6,70E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	10,07	ND
			hlgG4 ^P	11,80	ND
Tế bào T người cho 555130	NALM-6	REGN5837	Cemiplimab	281,00	8,31E-10
			hlgG4 ^P	261,30	7,18E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	27,51	ND
			hlgG4 ^P	25,18	ND
	NALM-6/hPD-L1	REGN5837	Cemiplimab	123,20	7,50E-10
			hlgG4 ^P	75,29	8,72E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	10,29	ND
			hlgG4 ^P	3,31	ND
Tế bào T người cho 555131	NALM-6	REGN5837	Cemiplimab	294,20	9,96E-10
			hlgG4 ^P	264,90	1,05E-09
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	21,13	ND
			hlgG4 ^P	25,45	ND
	NALM-6/hPD-L1	REGN5837	Cemiplimab	90,17	8,57E-10
			hlgG4 ^P	50,99	8,95E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	11,35	ND
			hlgG4 ^P	6,57	ND

ND: không xác định được vì không quan sát thấy phản ứng phụ thuộc vào nồng độ.

Bảng 23B: Sự kết hợp của REGN5837 với Cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 trên REGN5837 Điều trị một mình trong RAJI/CD80-CD86- Tế bào được thiết kế để thể hiện PD-L1

Tế bào T sơ cấp + RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ (+/- PD-L1)				Tối đa [pg/ml]	EC ₅₀ [M]
Tế bào T người cho 555109	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	Cemiplimab	1258,00	1,41E-10
			hlgG4 ^P	1149,00	1,28E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	503,70	NC
			hlgG4 ^P	454,90	9,49E-08
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	Cemiplimab	910,70	1,97E-10
			hlgG4 ^P	230,60	3,86E-11
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	518,80	NC
			hlgG4 ^P	84,41	8,20E-08
Tế bào T người cho 555130	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	Cemiplimab	791,90	9,31E-11
			hlgG4 ^P	711,60	5,04E-11
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	489,70	NC
			hlgG4 ^P	370,00	NC
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	Cemiplimab	664,30	6,15E-11
			hlgG4 ^P	182,10	5,24E-11
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	426,80	NC
			hlgG4 ^P	85,29	7,24E-08
Tế bào T người cho 555131	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	Cemiplimab	437,40	1,28E-10
			hlgG4 ^P	426,10	9,31E-11
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	162,20	5,97E-08
			hlgG4 ^P	156,60	7,92E-08
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	Cemiplimab	406,00	3,16E-10
			hlgG4 ^P	132,40	2,58E-10
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	94,94	NC
			hlgG4 ^P	37,24	NC

NC: không được tính toán vì dữ liệu không phù hợp với phương trình logistic 4 tham số.

Bảng 24: Sự kết hợp của REGN5837 với Cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 trên REGN5837 Điều trị một mình trong tế bào WSU-DLCL2 biểu hiện PD-L1

Tế bào T sơ cấp + WSU-DLCL2 (+/- PD-L1)				IL-2 ở 100nM [pg/ml]	IL-2 ở 0nM [pg/ml]	EC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]
Tế bào T người cho 555175	WSU-DLCL2	REGN5837	Cemiplimab	2276,35	3217,69		ND
			hlgG4 ^P	2284,28	2482,54		ND
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	609,01	3299,38		4,81E-09
			hlgG4 ^P	616,95	3552,86		8,54E-09
	WSU-DLCL2/PD-L1	REGN5837	Cemiplimab	723,06	642,64	NC	
			hlgG4 ^P	209,84	124,81	1,39E-12	
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	66,17	444,51		2,87E-09
			hlgG4 ^P	15,47	82,91		NC
Tế bào T người cho 555175 + 50nM Belatacept	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺	REGN5837	Cemiplimab	2061,29	112,64	6,95E-13	
			hlgG4 ^P	1809,89	71,65	1,45E-12	
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	502,33	164,55	NC	
			hlgG4 ^P	402,66	109,02	NC	
	RAJI/CD80 ⁺ CD86 ⁺ /PD-L1	REGN5837	Cemiplimab	792,06	22,40	1,59E-12	
			hlgG4 ^P	238,23	5,19	3,39E-12	
		Không TAA x CD28	Cemiplimab	128,69	24,44	NC	
			hlgG4 ^P	14,49	1,72	NC	

ND: không xác định được vì không quan sát thấy phản ứng phụ thuộc vào nồng độ..

NC: không được tính toán vì dữ liệu không phù hợp với phương trình logistic 4 tham số.

Ví dụ 11. Hiệu quả chống khối u của việc dùng REGN5837 khi có và vắng mặt REGN1979

Giới thiệu

REGN5837 là kháng thể đặc hiệu kép (bsAb) dựa trên IgG4 của người được thiết kế để hướng đích NHL của tế bào B (ví dụ, DLBCL) bằng cách bắc cầu CD22⁺ tế bào B với CD28⁺ tế bào T. “Tín hiệu 2” do REGN5837 cung cấp, kết hợp với các tác nhân khác cung cấp “tín hiệu 1” (ví dụ, cung cấp tín hiệu thông qua kích thích tế bào T sơ cấp thông qua phân cụm TCR hoặc CD3), như CD20xCD3 Ω có hiệu ứng kép (bsAb) REGN1979, có thể cung cấp T khuếch đại kích hoạt tế bào và giết chết NHL của tế bào B qua trung gian tế bào, làm tăng thêm phản ứng với CD20xCD3. Ngoài ra, REGN5837 có thể tăng hiệu quả ở những bệnh nhân không đáp ứng với liệu pháp trị liệu đơn CD20xCD3.

Các nghiên cứu được mô tả dưới đây đã đánh giá hiệu quả chống khối u của CD22xCD28 bsAb REGN5837, khi có hoặc không có liều gạn hiệu quả của CD20xCD3 bsAb (REGN1979), được sử dụng cho chuột NSG bị suy giảm miễn dịch mang thai 8 ngày, có khối u bạch cầu tế bào B.

Tóm lại, chuột (n = 6 đến 9 mỗi nhóm) được cấy vào trong màng bụng (IP) với tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMC) và được cấy vào tĩnh mạch (IV) 12 ngày sau đó với tế bào bạch cầu NALM-6 tế bào B ở người, được thiết kế để biểu hiện luciferaza để kích hoạt hình ảnh phát quang sinh học (NALM-6-luc). Hiệu quả chống khối u của REGN5837 ở mức 0,04, 0,4 và 4 mg/kg, kết hợp với liều cố định 0,04 mg/kg của REGN1979, được so sánh với liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 và REGN1979 và đối với bsAbs đối chứng IgG4P-PVA không bắc cầu. Chuột nhận được liều kháng thể bằng cách tiêm vào màng bụng (IP) 8, 15 và 22 ngày sau khi cấy tế bào NALM-6-luc. Khối lượng khối u được đánh giá hai lần một tuần trong suốt thời gian thử nghiệm.

Nguyên liệu và phương pháp

Dòng tế bào có nguồn gốc từ người

NALM-6-luc: Dòng tế bào NALM-6 là dòng tế bào bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính được phân lập từ một bệnh nhân nam 19 tuổi (DSMZ, cat # ACC 128); dòng này đã được sửa đổi với EF1a-Luciferaza-2A-GFP-Puro lentivirus (GenTarget) để tạo điều kiện cho hình ảnh phát triển tế bào khối u *in vivo*.

PBMC: PBMC của người được lấy từ ReachBio, Cat. # 0500-401, nhà cung cấp # 0180905 (thí nghiệm phát triển khối u) và 0180621 (thí nghiệm kháng thể huyết thanh)

Thiết kế thí nghiệm

Hệ thống thử nghiệm

Chuột NSG cái (8-9 tuần tuổi) được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm. Tất cả các con chuột đều được cấy IP bằng PBMC của người, và sau đó được cấy IV với tế bào bạch cầu tế bào B NALM-6-luc 12 ngày sau khi tiêm. Thiết kế thí nghiệm được trình bày chi tiết trong Bảng 25. Sự phát triển của khối u được theo dõi bằng hình ảnh phát quang sinh học hai lần một tuần trong suốt thời gian nghiên cứu. Đối với tất cả các thí nghiệm, chuột được nuôi trong cơ sở động vật Regeneron

trong điều kiện tiêu chuẩn. Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện theo hướng dẫn của Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật có tổ chức tại Regeneron.

Sự tham gia của chuột NSG

Chuột NSG thiếu hụt miễn dịch cái được cấy IP với PBMC 4×10^7 của người. Mức độ tế bào T được kiểm tra 11 ngày sau khi thu thập máu bằng cách lấy máu theo quỹ đạo ngược và đánh giá phần trăm tế bào $CD45^+$ của người trong tất cả tế bào sống trong máu toàn phần bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy; mức độ tham gia dao động từ 0,16 đến 16% tế bào $hCD45^+$. Chuột NSG cấy PBMC sau đó đã được cấy tế bào NALM-6-luc.

Điều kiện nuôi cấy NALM-6-Luc và cấy ghép khối u

Dòng tế bào NALM-6 đã được sửa đổi với EF1a-Luciferaza-2A-GFP-Puro lentivirus (GenTarget) để tạo điều kiện cho hình ảnh về sự phát triển của tế bào khối u *in vivo*. Dòng tế bào được duy trì trong RPMI với 10% FBS được bổ sung với PSG (penicillin, streptomycin, và glutamin) và dưới sự lựa chọn puromycin.

Tế bào NALM-6-luc được thu thập bằng cách ly tâm và tái định chỉ trong PBS ở $2,5 \times 10^7$ tế bào/mL. Chuột NSG đã được tiêm IV với 200 μ l (5×10^6 tế bào) tế bào NALM-6-luc vào ngày 12 sau phẫu thuật với PBMC.

Liều lượng kháng thể để đo khối u

Trước khi dùng thuốc với các vật phẩm thử nghiệm hoặc đối chứng, chuột được phân thành các nhóm, phân tầng theo gánh nặng khối u và mức độ kết hợp tế bào T. Các kháng thể (REGN5837, REGN1979, REGN5671 [Không TAAxCD28 bsAb đối chứng không bắt cầu], hoặc H4sH17664D [bsAb đối chứng không cầu nối không TAAxCD3]) được sử dụng dưới dạng liều pháp trị liệu đơn hoặc kết hợp bằng cách tiêm IP vào ngày 8, 15 và 22 sau - tái tạo (để có hiệu quả *in vivo*) với liều lượng nêu trong Bảng 25.

Bảng 25: Thiết kế thử nghiệm để đánh giá sự phát triển của khối u

Các nhóm	N trên nhóm	Liều của REGN5837 hoặc không phải TAAxCD28	Liều của REGN1979 hoặc không phải TAAxCD3	Phác đồ liều Ab (tiêm IP)	Ngày xác định thể tích khối u
REGN5837 + REGN1979	8	4 mg/kg	0,04 mg/kg	Ngày 8, 15, và 22 sau khi cấy tế bào NALM- 6-luc	Ngày 6, 10, 14, 17, 20, và 23 sau khi cấy
REGN5837 + REGN1979	8 ^a	0,4 mg/kg			
REGN5837 + REGN1979	9	0,04 mg/kg			
REGN5837 + không TAAxCD3	8 ^a	4 mg/kg			
Không TAAxCD28 ⁺ REGN1979	8	4 mg/kg			
Không TAAxCD28 ⁺ không TAAxCD3	9 ^a	4 mg/kg			

^a Một con chuột từ nhóm này đã chết sớm trong quá trình thử nghiệm và bị loại trừ. Cái chết này không phải do khối u và không có khả năng liên quan đến liều lượng với các thử nghiệm vì một con chuột chết trong nhóm đối chứng.

Đo khối u và điểm cuối được chỉ định

Chuột được cấy ghép khối u NALM-6-luc được chụp ảnh hai lần một tuần bằng thiết bị IVIS Spectrum và dữ liệu được phân tích khi sử dụng phần mềm

Living Image. Trước khi tạo hình, chuột được tiêm IP với chất nền luciferin. Sau mười phút, chuột được gây mê bằng isofluran và định lượng sự phát quang sinh học (tổng thông lượng, biểu thị bằng photon trên giây [p/s]). Thí nghiệm kết thúc khi chuột bắt đầu có dấu hiệu của bệnh ghép so với vật chủ (GVHD) (được đánh giá là giảm trọng lượng $\geq 20\%$) theo tiêu chuẩn IACUC.

Phân tích thống kê về sự phát triển của khối u

Kết quả về thể tích khối u theo thời gian được phân tích sử dụng phân tích phương sai 2 chiều (ANOVA), theo sau là thử nghiệm bài học của Tukey để so sánh nhiều lần. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism (Phiên bản 8).

Kết quả

Hiệu quả chống khối u của việc quản lý REGN5837 khi có mặt và không có mặt của REGN1979

Chuột NSG bị suy giảm miễn dịch mang khối u NALM-6-luc được tiêm IP của các đối chứng kháng điện trở hoặc không bắc cầu như mô tả ở trên.

Ở chuột mang khối u, điều trị với 0,04, 0,4 và 4 mg/kg REGN5837 khi có mặt 0,04 mg/kg REGN1979 dẫn đến việc ức chế có ý nghĩa thống kê sự phát triển của khối u so với bsAbs đối chứng không bắc cầu (không TAAxCD28 và không TAAxCD3 bsAbs) ở ngày thứ 23 sau khi cấy ($p < 0,05$, $p < 0,01$, và $p < 0,001$, tương ứng) (Fig. 6). Vào ngày thứ 20 sau khi cấy, sự ức chế đáng kể sự phát triển của khối u đã được quan sát thấy ở nhóm 0,4 và 4 mg/kg ($p < 0,05$ cho cả hai nhóm). Liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 (4 mg/kg) và REGN1979 (0,04 mg/kg) đều không làm giảm đáng kể sự phát triển của khối u so với bsAbs đối chứng không bắc cầu. Không có sự khác biệt giữa bất kỳ liều kết hợp REGN5837 + REGN1979 và hoặc liệu pháp trị liệu đơn bsAb đạt ý nghĩa thống kê. Sự phát triển khối u nhanh chóng được quan sát khi dùng thuốc với bsAbs đối chứng không bắc cầu trong suốt thời gian dùng thuốc, và tất cả các con chuột đã chết vào ngày thứ 23. Trong tất cả các nhóm, GVHD được quan sát thấy ở ít nhất một con chuột vào cuối thí nghiệm (được đánh giá là ≥ 20 giảm% khối lượng).

Trong một thí nghiệm độc lập sử dụng một nhóm chuột khác, máu được thu thập tại các thời điểm sau để xác định nồng độ kháng thể trong huyết thanh: liều sau 1 giờ và 4 giờ vào ngày thứ 7, trước liều 1 giờ và sau khi uống liều 4 giờ. Ngày 14 và 21, và một lần vào ngày 29. Nồng độ triệt để của Ω thể trong huyết thanh trong thời gian dùng thuốc được xác định 1 giờ trước khi dùng thuốc vào ngày 14 và 21. Sử dụng REGN5837 liều 0,04, 0,4 và 4 mg/kg khi có mặt 0,04 mg/kg REGN1979 liên quan đến nồng độ dưới của REGN5837 trong huyết thanh, từ dưới giới hạn định lượng (BLQ) đến 0,1, 1,6 đến 2,3, và 16,5 đến 21,1 $\mu\text{g/mL}$, tương ứng. Nồng độ triệt để của REGN1979 trong huyết thanh là BLQ trong mọi trường hợp (Dữ liệu không được thể hiện).

Kết luận

Liều 0,04, 0,4 và 4 mg/kg REGN5837 khi có mặt 0,04 mg/kg REGN1979 có hiệu quả ngăn chặn sự phát triển của tế bào B NALM-6 bệnh bạch cầu ở chuột. Không có sự ức chế khối u đáng kể nào được ghi nhận với liều pháp trị liệu đơn 4 mg/kg REGN5837 hoặc 0,04 mg/kg REGN1979 so với đối chứng.

Ví dụ 12: Độc tính tế bào dựa trên FACS trên tế bào CD22^+ PBMC ở người +/- CD22xCD28 cảm kháng cảm biến thể đặc hiệu kép (CD22xCD28 cố định, CD20xCD3 chuẩn độ)

Nguyên liệu và phương pháp

CD22xCD28 tăng cường tiêu diệt mục tiêu CD20xCD3 được đánh giá trong thử nghiệm gây độc tế bào kéo dài 96 giờ hướng đích tế bào Nalm6 hoặc WSU-DLCL2. Tóm lại, PBMC của người được để trong môi trường RPMI huyền phù ở 1×10^6 tế bào/mL và ủ qua đêm ở 37°C để làm giàu tế bào bạch huyết bằng cách suy yếu đại thực bào và một số tế bào bạch cầu khác đơn nhân. Ngày tiếp theo, tế bào Nalm6 hoặc WSU-DLCL2 được gắn nhãn 1 μM của thuốc nhuộm theo dõi huỳnh quang CFDA-SE và PBMC chưa kết dính tế bào được gắn nhãn với 1 μM của thuốc nhuộm theo dõi huỳnh quang CellTrace Violet. Các tế bào đích được gắn nhãn và PBMC (tỷ lệ chất tác động/tế bào đích 4: 1 cho Nalm6, 5: 1 cho WSU-DLCL2) được đồng ủ với dung dịch pha loãng nối tiếp CD20xCD3 Ω thể hiện đặc hiệu kép REGN1979 (khoảng độ: 5 nM đến 0,64pM) có hoặc không có CD22xCD28

REGN5837 ở 2,5ug/ml (16,7nM). Trong thử nghiệm hướng đích tế bào Nalm6, một lượng không đổi của CD22xCD28 REGN5838, CD28 đối chứng 1 nhánh kép (REGN5678) hoặc IgG4s đối với đối chứng tương đương (H4sH10154P3) ở 2,5ug/ml (16,7nM) đã được thêm vào. Sau khi ủ 96 giờ ở 37°C, tế bào được thu hoạch từ các đĩa và được FACS phân tích trên máy FACS BD LSRIIFortessa-X20. Đối với FACS phân tích, tế bào được khai thác với thuốc hoạt động Fixable Live/Dead Far Red (Invitrogen). 20.000 đầu đếm được thêm vào mỗi cảnh báo trước FACS phân tích và 10.000 đầu được thu lại đối với mỗi mẫu.

Để đánh giá tính đặc hiệu của việc tiêu diệt, tế bào được giám sát trên các quần thể được đánh dấu CFDA-SE còn sống. Phần trăm hoặc số lượng tế bào đích sống được ghi lại và sử dụng để tính toán khả năng sống sót.

Sự hoạt động của tế bào T được đánh giá bằng cách bảo quản tế bào có thể được liên kết trực tiếp với CD2, CD4, CD8 và CD25. Phần trăm tế bào CD8⁺ CD25 biểu hiện được ghi nhận để xác định hoạt động tế bào T. Ngoài ra, khi tế bào T tăng sinh, CellTraceViolet được pha loãng, hướng dẫn đến MFI giảm như được xác định bởi FACS. Do đó, sự tăng sinh tế bào T được báo cáo là sự giảm MFI của CellTraceViolet trên CD8⁺ tế bào T, hoặc phần trăm tế bào CD8⁺ đã giảm CellTraceViolet MFI.

Bề mặt chất lượng từ thử nghiệm này được thu lại để phân tích cytokin hàm lượng. Nồng độ của IL 17a, IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 và IL-2 được phân tích sử dụng kit Cytometric Bead Array (CBA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cytokin hàm lượng được suy ra từ đường cong được tổng hợp theo bộ tiêu chuẩn và được ghi lại dưới dạng pg/mL. Các giá trị EC50 về tiêu diệt tế bào đích, kích hoạt tế bào T, tăng sinh, và mức độ cytokin và mức cytokin tối đa được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính 4 tham số trong phần mềm Prism.

Kết quả, tóm tắt và kết luận:

CD20xCD3 REGN1979 đặc biệt kháng hiệu ứng đã được thử nghiệm về khả năng gây ra tế bào T con người gây thương để tiêu diệt tế bào đích biểu hiện của người CD20 và CD22 kết hợp với kháng thể CD22xCD28 vũ trụ hoặc CD28 1 cánh tay hoặc tương tác chúng chỉ kháng cự được.

REGN1979 kích hoạt và chỉ đạo tế bào T của người tiêu diệt tế bào Nalm6 (Fig. 7) hoặc WSU-DLCL2 (Fig. 8) theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Việc bổ sung nồng độ cố định của kháng thể đặc hiệu CD22xCD28 vào REGN1979 đã tăng cường hiệu quả gây độc tế bào (EC50) của REGN1979 chống lại tế bào Nalm6 4,7-5,2 lần khi so sánh với REGN1979 với CD28, CD28 một nhánh hoặc đối chứng tương đương (Bảng 26) hoặc 17,5 lần so với các ô WSU-DLCL2 khi so sánh riêng với REGN1979 (Bảng 27).

Sự ly giải tế bào đích được quan sát qua trung gian của REGN1979 liên quan đến sự kích hoạt và tăng sinh tế bào T, như được xác định bởi sự điều chỉnh CD25 trên tế bào CD8⁺ hoặc sự pha loãng CellTrace Violet tương ứng (Fig. 7, Fig. 8). Việc bổ sung nồng độ cố định của Kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 vào REGN1979 nâng cao hiệu lực của REGN1979 kích hoạt và tăng sinh tế bào T khi có mặt tế bào Nalm6 2,3-2,6 lần và 5,4-7,1 lần tương ứng khi so sánh với REGN1979 với kháng thể CD28 1 nhánh hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương (Bảng 26), hoặc 8,2 và 16,1 lần khi có mặt tế bào WSU-DLCL2 khi so sánh với REGN1979 một mình (Bảng 27).

Trong các thử nghiệm với tế bào PBMC và WSU-DLCL2 của người, REGN1979 gây ra sự giải phóng các cytokin của người. Sự giải phóng cytokin được quan sát với REGN1979 được tăng cường khi có nồng độ cố định của CD22xCD28 so với sự giải phóng cytokin do REGN1979 gây ra (Bảng 28, Fig. 9).

Tóm lại, đồng kích thích làm tăng hiệu lực gây độc tế bào mục tiêu, kích hoạt tế bào T và giải phóng cytokin khi so sánh với những gì quan sát được với CD20xCD3 kết hợp với cảm biến đối chứng được hoặc đơn độc.

Tóm tắt dữ liệu được lập bảng:

Bảng 26: Giá trị EC50 cho độc tính tế bào và kích hoạt tế bào T với mục tiêu Nalm6 (1 thử nghiệm)

	Tiêu diệt tế bào		Hoạt hóa tế bào T (CD8 ⁺ /CD25 ⁺)		Sự tăng sinh tế bào T (CellTrace MFI của tế bào CD8 ⁺)	
	EC50 [M]	Số lần tăng EC50 so với	EC50 [M]	Số lần tăng EC50 so với	EC50 [M]	Số lần tăng EC50 so với IgG4s
Ab						

		IgG4s		IgG4s		
REGN5837	3,89E-11	4,7	4,05E-11	2,3	3,83E-11	5,4
REGN5838	3,57E-11	5,2	3,60E-11	2,6	2,87E-11	7,1
CD28 nhánh	1,88E-10	1,0	9,20E-11	1,0	1,97E-10	1,0
IgG4s Iso	1,84E-10	1,0	9,28E-11	1,0	2,05E-10	1,0

Bảng 27: Giá trị EC50 đối với độc tính tế bào và kích hoạt tế bào T với đích WSU-DLCL2 (Trung bình của 2 thí nghiệm)

Ab	Tiêu diệt tế bào		Hoạt hóa tế bào T (CD8 ⁺ /CD25 ⁺)		Sự tăng sinh tế bào T (% phân chia của CD8)	
	EC50 [M]	Số lần tăng EC50 chỉ so với REGN1979	EC50 [M]	Số lần tăng EC50 chỉ so với REGN1979	EC50 [M]	Số lần tăng EC50 chỉ so với REGN1979
REGN5837	1,39E-13	17,5	1,28E-12	8,2	7,10E-13	16,1
No Ab	2,33E-12	1,0	1,22E-11	1,0	1,23E-11	1,0

Bảng 28: Giải phóng cytokin từ thử nghiệm gây độc tế bào WSU-DLCL2 (Trung bình của 2 thí nghiệm)

		REGN5837	No Ab
IL-2	EC50	1,82E-11	5,85E-10
	Tối đa (pg/ml)	3022	564

	Số lần tăng (tối đa)	6,4	1,0
IL-4	EC50	1,24E-11	8,69E-11
	Tối đa (pg/ml)	65,035	34,855
	Số lần tăng (tối đa)	1,9	1,0
IL-6	EC50	2,31E-11	8,66E-11
	Max (pg/ml)	194,36	116,085
	Số lần tăng (tối đa)	1,8	1,0
IL-10	EC50	1,35E-10	1,30E-10
	Tối đa (pg/ml)	686,15	520,7
	Số lần tăng (tối đa)	1,3	1,0
TNFa	EC50	3,84E-11	2,09E-10
	Tối đa (pg/ml)	327,85	84,55
	Số lần tăng (tối đa)	4,1	1,0
IFNg	EC50	1,06E-10	2,78E-10
	Tối đa (pg/ml)	470,7	195,5
	Số lần tăng (tối đa)	2,4	1,0
IL-17a	EC50	2,56E-10	2,74E-10
	Tối đa (pg/ml)	19,775	15,091
	Số lần tăng (tối đa)	1,4	1,0

Ví dụ 13.: Độc tính tế bào dựa trên FACS trên các kích thích NHL + PBMC +/- CD22xCD28 của người (CD22xCD28 cố định, CD20xCD3 đã được chuẩn độ)

Quy trình thí nghiệm

CD22xCD28 tăng cường tiêu diệt mục tiêu CD20xCD3 được đánh giá trong thử nghiệm gây độc tế bào 96 giờ hướng đích tế bào NHL được phân tích từ sinh thiết bệnh nhân NHL chính với PBMC tự thân khi có tế bào mô đệm của người (HS-5). Tóm lại, tế bào HS-5 được cấy 5000 tế bào trên một tấm 96 giếng đáy phẳng và được ủ qua đêm. Ngày tiếp theo, PBMC từ bệnh nhân NHL được dán nhãn 1uM của thuốc nhuộm theo dõi huỳnh quang CellTrace Violet. Tủy xương và được dán nhãn PBMC (tỷ lệ chất báo cáo/tế bào đích 10: 1) được cấy trong tế bào

mô đệm và được đồng ủ với dung dịch pha loãng nối tiếp CD20xCD3 Ω biểu hiện đặc hiệu kép REGN1979 (khoảng nồng độ: 6,7 nM đến 10,7 pM) và cố định nồng độ của phân tử đồng kích thích CD22xCD28 REGN5837 hoặc điều khiển kháng thể đặc hiệu kép CD28 1nhansh (REGN5678) ở 2,5ug/ml (16,7nM) trong 96 giờ ở 37°C. Tế bào được thu hoạch từ các đĩa và được FACS phân tích trên máy FACS BD LSRFortessa-X20. Đối với phân tích FACS, tế bào được nhuộm bằng hỗn hợp kháng thể (CD45, CD19, CD4, CD8, CD25) và thuốc nhuộm phản ứng có thể sống/chết gần IR (Invitrogen). 20.000 đầu đếm được thêm vào mỗi giếng ngay trước khi phân tích FACS và 10.000 đầu được thu lại đối với mỗi mẫu. Để đánh giá tính đặc hiệu của việc tiêu diệt, tế bào đích được đánh giá trên quần thể CD45⁺ CD19⁺ âm tính với màu tím còn sống. Tỷ lệ sống sót được tính toán dựa trên số lượng tế bào đích trong điều trị tốt được bình thường hóa so với số lượng tế bào đích trong giếng không được điều trị.

Tế bào T được đánh giá là quần thể CD45⁺ màu tím sống được đánh dấu CD4⁺ hoặc CD8⁺. Tỷ lệ phần trăm tế bào CD8⁺ và CD4⁺ biểu hiện CD25 được báo cáo là thước đo kích hoạt tế bào T. Ngoài ra, khi tế bào T tăng sinh, CellTraceViolet được pha loãng, dẫn đến MFI giảm thiểu như được xác định bởi FACS. Do đó, sự tăng sinh tế bào T được báo cáo là làm giảm MFI của

CellTraceViolet trên CD8⁺ và tế bào T CD4⁺.

Các giá trị EC50 để tiêu diệt mục tiêu và kích hoạt và tăng sinh tế bào T được tính toán bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính 4 tham số trong phần mềm Prism.

Kết quả, tóm tắt và kết luận:

Kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20xCD3 REGN1979 đã được thử nghiệm về khả năng tạo ra tế bào T tự thân chưa từng có để tiêu diệt tế bào NHL từ tủy xương của bệnh nhân kết hợp với kháng thể kích thích CD22xCD28 hoặc kháng thể đối chứng CD28 1 nhánh.

REGN1979 đã kích hoạt và hướng tế bào T của người làm suy yếu NHL theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Việc bổ sung một nồng độ cố định của các kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 vào REGN1979 đã nâng cao hiệu quả gây độc tế bào (EC50) của REGN1979 2,3 và 3,5 lần khi so sánh với REGN1979 với kháng thể đối chứng CD28 1 nhánh hoặc không đối chứng costim (Bảng 29).

Quá trình ly giải tế bào đích được quan sát qua trung gian REGN1979 có liên quan đến sự kích hoạt và tăng sinh tế bào T, được đo bằng sự điều chỉnh CD25 trên tế bào CD8⁺ và CD4⁺ hoặc pha loãng thuốc tím CellTrace tương ứng. Việc bổ sung một nồng độ cố định của các kháng thể đặc hiệu kép CD22xCD28 vào REGN1979 đã tăng cường hiệu lực của REGN1979 gây ra kích hoạt và tăng sinh tế bào T lần lượt là 2,8 đến 4,2 lần và 2,8-4,8 lần khi so sánh với REGN1979 với CD28 1 nhánh hoặc không có đối chứng costim (Bảng 29 và Fig. 10).

Tóm lại, việc đồng kích thích làm tăng hiệu lực gây độc tế bào mục tiêu và kích hoạt tế bào T khi so sánh với những gì quan sát được với CD20xCD3 kết hợp với kháng thể đối chứng.

Tóm tắt dữ liệu được lập bảng:

Bảng 29: Giá trị EC50 đối với độc tế bào và kích hoạt tế bào T

Ab	Tiêu diệt tế bào EC50 [M]	Hoạt hóa tế bào T (CD25 ⁺) EC50 [M]		Hoạt hóa tế bào T (CellTrace MFI của tế bào T) EC50 [M]	
		tế bào T CD8	tế bào T CD4	tế bào T CD8	tế bào T CD4
REGN5837	7,81E-12	1,35E-11	6,96E-12	1,52E-11	8,54E-12
CD28 nhánh	1,80E-11	4,01E-11	2,95E-11	4,71E-11	4,13E-11
không costim	2,72E-11	3,77E-11	2,74E-11	4,27E-11	3,93E-11

Ví dụ 14. Đặc tính *In vitro* và Đánh giá *In vivo* về Hiệu quả Chống Khối u của REGN5837 một mình và kết hợp với REGN1979 trong một mô hình của u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL)

Vật liệu và phương pháp-giới thiệu nghiên cứu và tóm tắt kết quả

Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* đã được thực hiện để đánh giá:

(1) khả năng của REGN5837 để tăng cường hoạt hóa tế bào T sơ cấp bằng cách bắc cầu tế bào T CD28⁺ với tế bào đích CD22⁺. Sự hoạt hóa tế bào T được đánh giá bằng cách sử dụng độc tính tế bào chống lại tế bào đích, sự biểu hiện của các dấu hiệu trên bề mặt tế bào của sự hoạt hóa tế bào T, sự tăng sinh tế bào T và

mức độ giải phóng cytokin dưới dạng chỉ số các thí nghiệm được thực hiện khi có hoặc không có REGN1979, CD20xCD3 bsAb làm cầu nối giữa các phân tử CD3 trên tế bào T và tế bào đích CD20 + và dẫn đến kích hoạt tế bào T.

(2) hiệu quả chống khối u của CD22xCD28 bsAb REGN5837, khi có hoặc không có 0,4 hoặc 4 mg/kg REGN1979, được sử dụng cho chuột NSG thiếu miễn dịch mang khối u DLBCL.

REGN5837 và REGN1979 đã được thử nghiệm kết hợp ở một loạt các nồng độ để đánh giá tác động của REGN5837 đối với độc tính tế bào T qua trung gian REGN1979 đối với một dòng tế bào DLBCL của người (WSU-DLCL2), điều hòa một dấu hiệu của tế bào T muện kích hoạt (CD25), tăng sinh tế bào T và giải phóng cytokin từ tế bào T chính của người. REGN5837 tăng cường hiệu lực của REGN1979 để làm trung gian gây độc tế bào T, biểu hiện bề mặt tế bào CD25 trên tế bào T CD4⁺ và CD8⁺, và tăng sinh tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Tương tự, REGN5837 tăng cường hiệu lực của REGN1979 để làm trung gian giải phóng cytokin theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Ở nồng độ từ 77,2pM đến 100nM, REGN5837 làm tăng hiệu lực gây độc tế bào qua trung gian của REGN1979 đối với tế bào đích; ở nồng độ từ 77,2pM đến 2,78nM, REGN5837 làm tăng hiệu lực hoạt hóa và tăng sinh tế bào T qua trung gian REGN1979, nhưng nồng độ cao hơn của REGN5837 không làm tăng thêm hiệu lực của REGN1979 (Bảng 30). Lượng tối đa giết chết tế bào đích qua trung gian REGN1979 và tăng sinh tế bào T không tăng đáng kể khi bổ sung REGN5837, trong khi REGN5837 tăng cường mức tối đa của giải phóng IL-2, IL-4, IL-6, IL- qua trung gian REGN1979. 10, TNF- α , IFN- γ và IL-17 α theo cách phụ thuộc vào nồng độ.

Chuột NSG thiếu miễn dịch (n = 6 đến 7 mỗi nhóm) được cấy dưới da (SC) với tỷ lệ 1: 1 của tế bào WSU-DLCL2 và PBMC của người. Hiệu quả chống khối u của REGN5837 ở liều 1 mg/kg, kết hợp với liều 0,4 hoặc 4 mg/kg của REGN1979, được so sánh với các liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 và REGN1979 và với bsAbs đối chứng IgG4P-PVA không bắc cầu. Chuột nhận được các liều kháng thể bằng cách tiêm vào màng bụng (IP) 1, 8 và 15 ngày sau khi cấy tế bào WSU-DLCL2. Điều trị với 1 mg/kg REGN5837 khi có mặt 0,4 hoặc 4 mg/kg REGN1979 dẫn đến sự ngăn chặn có ý nghĩa thống kê sự phát triển của khối u WSU-DLCL2 so với các

liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 hoặc REGN1979 và bsAbs đối chứng không bắc cầu vào ngày 28 sau cấy ghép. Liệu pháp trị liệu đơn REGN1979 dẫn đến sự ức chế khiêm tốn sự phát triển của khối u, trong khi liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 không có tác dụng liên quan đến đối chứng không bắc cầu.

Tóm lại, khi REGN5837 và REGN1979 được thử nghiệm kết hợp ở một loạt các nồng độ trong ống nghiệm, REGN5837 đã tăng cường hiệu lực của REGN1979 để làm trung gian kích hoạt tế bào T ở người khi có tế bào CD22⁺ WSU-DLCL2. Mức độ tối đa của giải phóng cytokin qua trung gian REGN1979, nhưng không gây độc tế bào, kích hoạt hoặc tăng sinh tế bào T, đã tăng lên khi có mặt REGN5837. *In vivo*, 1 mg/kg REGN5837 với sự có mặt của 0,4 hoặc 4 mg/kg REGN1979 có hiệu quả trong việc ngăn chặn sự phát triển khối u lymphoma tế bào B WSU-DLCL2 ở chuột so với liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 hoặc REGN1979.

Bảng 30: Tóm tắt về ảnh hưởng của REGN5837 đối với sự kích hoạt tế bào T qua trung gian REGN1979 (Được đo bằng độc tính tế bào chống lại tế bào đích, Biểu hiện CD25 và Tăng sinh tế bào T) Sử dụng PBMC ở người

		Nồng độ cố định của REGN5837					
		1,00x10 ⁻⁷	1,67x10 ⁻⁸	2,78x10 ⁻⁹	4,63x10 ⁻¹⁰	7,72x10 ⁻¹¹	0
WSU-DLCL2 Tiêu diệt tế bào	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	8,53x10 ⁻¹⁴	1,85x10 ⁻¹³	3,98x10 ⁻¹³	3,46x10 ⁻¹³	8,37x10 ⁻¹³	2,89x10 ⁻¹²
	Tính gây độc % tối đa	81,5	79,8	80,6	87,5	82,1	83,2
	Số lần thay đổi (EC ₅₀) ^b	33,9	15,7	7,3	8,3	3,5	1,0
Hoạt hóa tế	REGN1979 EC ₅₀ (M)	1,16x10 ⁻¹³	8,70x10 ⁻¹⁴	7,11x10 ⁻¹⁴	1,46x10 ⁻¹³	2,08x10 ⁻¹³	9,17x10 ⁻¹³

		Nồng độ cố định của REGN5837						
bào T CD4 ⁺ (% CD25 ⁺)	Tế bào CD25 ⁺ % tối đa	94,1	95,6	94,2	91,9	91,7	92,4	
	Số lần thay đổi (EC ₅₀)	7,9		10,5	12,9	6,3	4,4	1,0
Hoạt hóa tế bào T CD8 ⁺ (% CD25 ⁺)	REGN197 9 EC ₅₀ (M)	6,32x10 ⁻¹³		5,88x 10 ⁻¹³	2,68x 10 ⁻¹³	9,01x 10 ⁻¹³	1,64x 10 ⁻¹²	3,38x 10 ⁻¹²
	Tế bào CD25 ⁺ % tối đa	89		90,9	89,7	86,2	88,4	87,1
	Số lần thay đổi (EC ₅₀)	5,3		5,7	12,6	3,8	2,1	1,0
Tăng sinh tế bào T CD4 ⁺	REGN197 9 EC ₅₀ (M)	8,42x10 ⁻¹³		9,31x 10 ⁻¹³	4,25x 10 ⁻¹³	1,25x 10 ⁻¹²	2,36x 10 ⁻¹²	1,63x 10 ⁻¹¹
	Tăng sinh % tối đa	54,72		54,09	54,79	52,06	44,73	38,67
	Số lần thay đổi (EC ₅₀) ^a	19,3		17,5	38,3	13,1	6,9	1,0
Tăng sinh tế bào T CD8 ⁺	REGN197 9 EC ₅₀ (M)	1,55x10 ⁻¹²		8,31x 10 ⁻¹³	7,09x 10 ⁻¹³	3,43x 10 ⁻¹²	8,36x 10 ⁻¹²	1,97x 10 ⁻¹¹
	Tăng sinh % tối đa	59,1		58,9	60,2	56,4	53,2	51,1
	Số lần thay đổi	12,7		23,7	27,8	5,7	2,4	1,0

Nồng độ cố định của REGN5837						
(EC ₅₀) ^a						

^a REGN1979 được thử nghiệm ở khoảng nồng độ là 4,8fM đến 10nM

^b Số lần thay đổi của EC₅₀ được tính theo EC₅₀(không REGN5837)/EC₅₀([M] REGN5837)

Ví dụ 15: Đánh giá ảnh hưởng của REGN5837 đối với sự hoạt hóa tế bào T qua trung gian REGN1979 và thử nghiệm TRA5837 và REGN1979 kết hợp ở các khoảng nồng độ khi có mặt tế bào WSU-DLCL2.

Cả hai nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* đều được thực hiện để đánh giá hiệu quả chống khối u của CD22xCD28 bsAb REGN5837 của người, khi có hoặc không có liều gạn hiệu quả của CD20xCD3 bsAb ở người (REGN1979), ở chuột NSG sau cấy với tế bào PBMC và WSU-DLCL2 của người bằng cách đo các thông số sau: a) Tính gây độc tế bào của tế bào T đối với tế bào đích CD22⁺;

b) điều hòa CD25 trên bề mặt tế bào của tế bào T CD4⁺ và CD8⁺, dấu hiệu kích hoạt tế bào T; c) Tăng sinh tế bào T; d) giải phóng cytokin (IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ và IL-17A).

Nguyên liệu và phương pháp

Dòng tế bào

WSU-DLCL2: WSU-DLCL2 là dòng tế bào DLBCL được phân lập từ từ dịch tràn màng phổi của nam giới da trắng 41 tuổi (Leibnitz Institute-DSMZ, Cat. # ACC 575).

PBMC của người

Đối với nghiệm thức gây độc tế bào, kích hoạt tế bào T, tăng sinh tế bào T và giải phóng cytokin của bạch cầu người hiến được lấy từ Trung tâm máu New York (nhà cung cấp # 1500A).

Đối với các thí nghiệm trên chuột *in vivo* PBMC của người được lấy từ ReachBio (Cat. # 0500-401).

Thiết kế thí nghiệm

REGN5837 và REGN1979 đã được thử nghiệm kết hợp ở một loạt các nồng độ để đánh giá ảnh hưởng của REGN5837 đối với độc tế bào T qua trung gian REGN1979 đối với tế bào WSU-DLCL2, sự tăng sinh của tế bào T, biểu hiện bề mặt tế bào của chỉ thị của việc hoạt hóa tế bào T muộn (CD25), và giải phóng cytokin từ tế bào T của người. Phần trăm tiêu diệt tế bào đích, kích hoạt tế bào T và tăng sinh tế bào T được xác định như mô tả ở đây.

Hiệu quả chống khối u của riêng REGN5837 và kết hợp với REGN1979 trong mô hình DLBCL sử dụng tế bào WSU-DLCL2 và PBMC được đánh giá như mô tả ở đây. Xem Bảng 31.

Đánh giá *in vitro* về ảnh hưởng của REGN5837 đối với hiệu lực của REGN1979 để điều hòa kích hoạt tế bào T

Phân lập tế bào T sơ cấp của người

Tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMC) được phân lập từ bao bạch cầu của người hiến tặng khỏe mạnh thông qua ly tâm gradien mật độ bằng cách sử dụng các ống SepMate™ 50 mL theo quy trình khuyến nghị của nhà sản xuất. Tóm lại, 15 mL FicollPaque PLUS được chia thành từng ống 50 mL SepMate, sau đó thêm 30 mL máu toàn phần đã được pha loãng 1: 2 với D-PBS. Các ống được ly tâm ở nhiệt độ phòng 1200 x g trong 10 phút có đập tắt. Lớp trên cùng, chứa huyết tương và PBMC được gạn vào một ống mới. Các bước tiếp theo được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất SepMate. PBMC phân lập được đông lạnh trong FBS chứa 10% DMSO ở nồng độ 250×10^6 tế bào/mL trong 5 mL đông lạnh. PBMC được rã đông trong bể nước 37°C và tiếp tục lại trong môi trường kích thích (môi trường nuôi cấy tế bào X-VIVO 15 được bổ sung 10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA và 0,01mM BME) chứa 50 U/mL benzonaza nucleaza ở 10mL mỗi 100 triệu PBMC và ly tâm ở 300 xg trong 10 phút. Tế bào T CD3⁺ được phân lập từ PBMC được tạo thành viên bằng cách sử dụng kit tế bào EasySep™ Human CD3⁺ T của StemCell Technologies theo hướng dẫn được khuyến nghị của nhà sản xuất.

Xét nghiệm kích hoạt tế bào T dựa trên phương pháp đo lưu lượng tế bào bằng cách sử dụng PBMC

Khả năng của REGN5837 để tăng cường hoạt hóa tế bào T qua trung gian kích thích sơ cấp toàn thể, hoặc với “tín hiệu 1” do REGN1979 cung cấp, được đánh giá bằng cách sử dụng tế bào đích WSU-DLCL2 và PBMC của người làm tế

bào hiệu ứng. PBMC được làm giàu cho tế bào lympho như được mô tả ở đây. Tế bào đích và tế bào tác động được ủ với vật phẩm thử nghiệm và kháng thể đối chứng như được mô tả ở đây. Phép đo dòng chảy được thực hiện để đánh giá độc tính tế bào T, sự tăng sinh và điều hòa các dấu hiệu hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây. Ngoài ra, ảnh hưởng của REGN5837 đối với sự giải phóng cytokin qua trung gian REGN1979 được đánh giá như được mô tả ở đây. bsAb không phải TAAxCD28 (chứa nhánh liên kết CD28 giống với REGN5837 và một nhánh không liên kết) đã được thử nghiệm đối chứng không bắt cầu cho REGN5837.

Làm giàu tế bào lympho của PBMC

PBMC của người được cấy trong môi trường hoàn chỉnh (môi trường nuôi cấy tế bào RPMI bổ sung 10% FBS, penicillin-streptomycin-glutamin) ở 1×10^6 tế bào/mL và ủ qua đêm ở 37°C để làm giàu tế bào lympho bằng cách làm suy yếu tế bào kết dính như đại thực bào, tế bào đuôi gai và một số bạch cầu đơn nhân.

Ủ PBMC và tế bào đích với vật thử nghiệm

PBMC làm giàu tế bào bạch huyết được thu hoạch và đánh dấu bằng thuốc nhuộm theo dõi huỳnh quang Violet Cell Tracker $1\mu\text{M}$. Các tế bào đích WSU-DLCL2 được đánh dấu $1\mu\text{M}$ của thuốc nhuộm huỳnh quang Vybrant CFDA-SE.

Sau đó, PBMC đánh dấu thuốc nhuộm được cấy trong đĩa 96 giếng đáy tròn với tế bào đích được đánh dấu thuốc nhuộm với tỷ lệ 5: 1 (WSU-DLCL2 ở 5×10^3 tế bào đích/giếng).

PBMC được cấy và tế bào đích được ủ trong 72 giờ ở 37°C với các vật phẩm thử nghiệm hoặc đối chứng tương ứng của chúng ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 12,9pM đến 100nM (REGN5837 hoặc không phải TAAxCD28) và 4,8fM đến 10nM (REGN1979 hoặc không TAAxCD3).

Phân tích tế bào theo dòng chảy

Sau khi ủ với vật phẩm thử nghiệm và đối chứng, tế bào được đánh dấu bằng thuốc nhuộm được nhuộm bằng nhuộm LIVE/DEAD và với một hỗn hợp các kháng thể được đánh dấu huỳnh quang đối với CD2, CD4, CD8 và CD25. Các đầu đếm (20 μL mỗi giếng) được thêm vào ngay trước khi phân tích mẫu trên máy đo tế bào dòng BD Celesta. Dữ liệu đo lưu lượng tế bào được sử dụng để xác định sự sống sót của tế bào đích, sự tăng sinh của tế bào T và sự điều chỉnh của các dấu hiệu

kích hoạt tế bào T. Giá trị EC50 được xác định từ phương trình logistic bốn tham số trên đường cong đáp ứng liều 9 điểm bằng phần mềm GraphPad Prism. Đáp ứng tối đa đối với độc tính tế bào, kích hoạt tế bào T (điều hòa CD25), và tăng sinh được xác định là mức đáp ứng tối đa được tạo ra bởi sự phù hợp của đường cong Prism. Thay đổi tương đối trong EC50 so với đối chứng được tính là $EC50_{No\ REGN5837}/EC50_{[M]\ REGN5837}$, và thay đổi tương đối trong giải phóng cytokin tối đa được tính là $Tối\ đa_{[M]\ REGN5837}/Tối\ đa_{No\ REGN5837}$.

Tỷ lệ sống sót của tế bào đích

Tỷ lệ phần trăm tế bào đích còn sống trong mỗi điều kiện thử nghiệm được tính bằng số lượng tế bào đích còn sống, được đánh dấu CFDA-SE/được chuẩn hóa tốt với số lượng hạt được thu thập/giếng. Tỷ lệ sống sót của tế bào đích được xác định bằng tỷ lệ giữa số lượng tế bào đích sống sót trong bất kỳ điều kiện thử nghiệm nào so với số lượng tế bào đích sống sót trong điều kiện không có kháng thể đối chứng (tế bào đích chỉ có mặt PBMC).

Phần trăm độc tính tế bào chống lại tế bào đích trong mỗi điều kiện thử nghiệm, nơi được báo cáo theo cách này, được xác định bằng 100 trừ đi phần trăm sống sót (được tính như mô tả ở trên).

Sự biểu hiện CD25 trên tế bào T CD4⁺ và CD8⁺

Sự gia tăng của CD25 (một dấu hiệu của tế bào T được kích hoạt muộn) được đánh giá bằng cách kiểm tra tế bào sống, CD2⁺ và CD4⁺ hoặc CD8⁺. Phần trăm tế bào T được kích hoạt biểu hiện CD25 trong tổng số tế bào T biểu hiện CD4 hoặc CD8 đã được báo cáo.

Sự tăng sinh của tế bào T CD4⁺ và CD8⁺

Sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ sơ cấp được đánh giá bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy bằng cách tính toán tỷ lệ phần trăm tế bào đã phân chia trong tổng số tế bào T CD4⁺ và CD8⁺. Cường độ huỳnh quang của tế bào nhuộm Violet Cell Tracker được sử dụng như một dấu hiệu của quá trình phân chia tế bào, vì cường độ huỳnh quang của mỗi tế bào giảm đi một hệ số 2 với mỗi vòng phân chia

Phân tích giải phóng cytokin

Hàm lượng của các cytokin (IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ và IL-17A) trong các chất nổi nuôi cấy tế bào được định lượng bằng cách sử dụng mảng hạt đo tế bào BD kit Cytokin của người Th1/Th2/Th17 theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Mô hình *In vivo* của DLBCL sử dụng ghép ngoại lai tế bào WSU-DLCL2

Chuột NSG cái đã được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm. Tất cả các con chuột được cấy SC với tế bào u lympho tế bào B WSU-DLCL2 và IP đã được định lượng với kháng thể. Sự phát triển của khối u được đo bằng thước cặp vài lần mỗi tuần trong suốt thời gian nghiên cứu. Đối với tất cả các thí nghiệm, chuột được nuôi trong cơ sở động vật Regeneron trong điều kiện tiêu chuẩn. Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức chăm sóc và sử dụng động vật (IACUC) tại Regeneron.

Điều kiện nuôi cấy tế bào WSU-DLCL2 và cấy ghép khối u

Dòng tế bào WSU-DLCL2 được lấy từ Viện Leibnitz-DSMZ và được duy trì trong môi trường RPMI-1640 với 10% FBS được bổ sung với penicillin, streptomycin, glutamin và 1mM HEPES.

Các tế bào WSU-DLCL2 (3×10^6 ô) được thu thập và trộn với 5×10^5 PBMC và được tiếp tục lại trong hỗn hợp 1:1 của PBS và GFR Matrigel. Chuột NSG cái được tiêm SC với 100 μ L hỗn hợp tế bào ở sườn bên phải.

Định liều kháng thể để xác định khối u

Trước khi dùng thuốc thử nghiệm hoặc đối chứng, chuột được phân thành các nhóm, phân tầng theo gánh nặng khối u.

Các kháng thể (REGN5837, REGN1979, REGN5671 [Không TAAxCD28 bsAb đối chứng không bắt cầu], hoặc H4sH17664D [Không TAAxCD3 bsAb đối chứng không bắt cầu]) được sử dụng dưới dạng liệu pháp trị liệu đơn hoặc kết hợp bằng cách tiêm IP vào các ngày 1, 8, và 15 sau khi cấy với liều lượng nêu trong Bảng 31.

Bảng 31: Thiết kế thử nghiệm để đánh giá sự phát triển và sự sống còn của khối u

Các nhóm	N trên nhóm	Liều của REGN5837 hoặc không TAAxCD28	Liều của REGN1979 hoặc không TAAxCD3	Phác đồ liều BsAb (tiêm IP)	Ngày xác định thể tích khối u
REGN5837 + REGN1979	7	1 mg/kg	0,4 mg/kg	Ngày 1, 8, và 15 sau khi cấy tế bào WSU-DLCL2	Ngày 7, 10, 14, 16, 28, 31, 35, 38, 43, 46, 49, 53, 57, và 63 sau khi cấy
REGN5837 + REGN1979	7		4 mg/kg		
REGN5837 + không TAAxCD3	7		4 mg/kg		
Không TAAxCD28 ⁺ REGN1979	6		0,4 mg/kg		
Không TAAxCD28 ⁺ REGN1979	6 ^a		4 mg/kg		
Không TAAxCD28 ⁺ không TAAxCD3	7		4 mg/kg		

^a Một con chuột đã chết trong quá trình thử nghiệm và đã bị loại trừ.

Đo khối u và điểm cuối được chỉ định

Sự phát triển của khối u được theo dõi theo thời gian bằng cách sử dụng thước cặp đo đường kính X và Y của khối u (các phép đo vuông góc của chiều dài và chiều rộng). Thể tích khối u đã được tính toán ($X * Y * [X/2]$, trong đó X là đường kính ngắn hơn). Chuột bị chết khi khối u đạt đến điểm kết thúc khối u được chỉ định (đường kính khối u > 20 mm hoặc khối u bị loét). Điểm cuối này phù hợp với tiêu chuẩn IACUC

Phân tích thống kê về sự phát triển và tỷ lệ sống sót của khối u

Kết quả về thể tích khối u theo thời gian được phân tích bằng cách sử dụng phân tích phương sai 2 chiều (ANOVA), sau đó là thử nghiệm post-hoc Tukey để so sánh nhiều lần. Kết quả về khả năng sống sót theo thời gian được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm Mantel-Cox trên tất cả các nhóm và các thử nghiệm Mantel-Cox tiếp theo được thực hiện để so sánh theo từng nhóm riêng lẻ. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

Kết quả

Ảnh hưởng của REGN5837 đối với khả năng của REGN1979 để điều hòa hoạt tính gây độc tế bào T chống lại tế bào đích WSU-DLCL2 và sự giải phóng cytokin từ PBMC của người

REGN5837 và REGN1979 đã được thử nghiệm kết hợp ở một loạt các nồng độ để đánh giá tác động của REGN5837 đối với độc tế bào qua trung gian REGN1979 chống lại tế bào WSU-DLCL2, kích hoạt tế bào T, tăng sinh tế bào T và giải phóng cytokin từ tế bào T của người PBMC như đã mô tả trước đây. Bảng 30 cho thấy tác dụng của REGN5837 đối với độc tế bào qua trung gian REGN1979 chống lại tế bào WSU-DLCL2, kích hoạt tế bào T và tăng sinh tế bào T. Kết quả số lượng từ 2 người hiến tặng người chứng minh ảnh hưởng của REGN5837 đối với sự giải phóng cytokin được tóm tắt trong Bảng 32.

Ảnh hưởng của REGN5837 đối với độc tính tế bào qua trung gian REGN1979 và tăng sinh tế bào T ở người

Tác động của việc tăng nồng độ của REGN5837 đối với hiệu lực (EC50) và hiệu quả (đáp ứng tối đa) của REGN1979 được đánh giá bằng cách đánh giá độc tính tế bào qua trung gian REGN1979 đối với tế bào đích WSU-DLCL2, kích hoạt tế bào T qua trung gian REGN1979 và REGN1979- sự tăng sinh qua trung gian của tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ của người từ PBMC của người. REGN5837 tăng cường hiệu lực của REGN1979 để làm trung gian gây độc tế bào chống lại tế bào WSU-DLCL2, kích hoạt tế bào T (được đo bằng biểu hiện CD25 trên tế bào T CD4⁺ và CD8⁺), và sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Ở nồng độ từ 77,2pM đến 100nM, REGN5837 làm tăng hiệu lực gây độc tế bào qua trung gian của REGN1979 đối với tế bào đích; ở nồng độ từ 77,2pM đến 2,78nM, REGN5837 làm tăng hiệu lực kích hoạt và tăng sinh tế bào T qua trung gian REGN1979, nhưng nồng độ cao hơn của REGN5837 không làm tăng thêm hiệu lực của REGN1979. Các dữ liệu này được biểu diễn bằng đồ thị trong Fig. 11 và trong Bảng 30.

Giải phóng Cytokin qua trung gian REGN1979 từ PBMC của người khi có mặt REGN5837

Tác động của việc tăng nồng độ của REGN5837 đối với hiệu lực (EC50) và hiệu quả (đáp ứng tối đa) của REGN1979 được đánh giá bằng cách đánh giá độc tính tế bào qua trung gian REGN1979 đối với tế bào đích WSU-DLCL2, kích hoạt tế bào T qua trung gian REGN1979 và REGN1979- sự tăng sinh qua trung gian của tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ của người từ PBMC của người. REGN5837 tăng cường hiệu lực của REGN1979 để làm trung gian gây độc tế bào chống lại tế bào WSU-DLCL2, kích hoạt tế bào T (được đo bằng biểu hiện CD25 trên tế bào T CD4⁺ và CD8⁺), và sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Ở nồng độ từ 77,2pM đến 100nM, REGN5837 làm tăng hiệu lực gây độc tế bào qua trung gian của REGN1979 đối với tế bào đích; ở nồng độ từ 77,2pM đến 2,78nM, REGN5837 làm tăng hiệu lực kích hoạt và tăng sinh tế bào T qua trung gian REGN1979, nhưng nồng độ cao hơn của REGN5837 không làm tăng thêm hiệu lực của REGN1979. Các dữ liệu này được biểu diễn bằng đồ thị trong Fig. 11 và trong Bảng 30.

Bảng 32

		Nồng độ cố định của REGN5387					
		1,0 X10 ⁻⁷	1,67 X 10 ⁻⁸	2,78 X 10 ⁻⁹	4,63 X 10 ⁻¹⁰	7,72 X 10 ⁻¹¹	0
IL-4	REGN1979 EC ₅₀ (M) ^a	1,66 X 10 ⁻¹¹	1,53 X 10 ⁻¹¹	1,28 X 10 ⁻¹¹	1,89 X 10 ⁻¹¹	3,77 X 10 ⁻¹⁰	9,99 X 10 ⁻¹⁰
	Tối đa CKR (pg/mL) ^b	2,637	2,793	2,705	1,560	935	775
	Số lần thay đổi (CKR) ^c	3,4	3,6	3,5	2,0	1,2	1,0
IL-2	REGN1979 EC ₅₀ (M)	2,81 X 10 ⁻¹¹	1,96 X 10 ⁻¹¹	5,18 X 10 ⁻¹²	5,36 X 10 ⁻¹¹	3,89 X 10 ⁻⁸	1,25 X 10 ⁻¹⁰
	Tối đa CKR (pg/mL)	79,3	75,4	63,2	70,3	116	36,2
	Số lần thay đổi (CKR)	2,2	2,1	1,7	1,9	3,2	1,0
IL-6	REGN1979 EC ₅₀ (M)	5,13 X 10 ⁻¹¹	7,89 X 10 ⁻¹²	2,68 X 10 ⁻¹¹	1,45 X 10 ⁻¹²	1,61 X 10 ⁻¹⁰	7,42 X 10 ⁻¹¹
	Tối đa CKR (pg/mL)	366	304	367	246	210	190
	Số lần thay đổi (CKR)	1,9	1,6	1,9	1,3	1,1	1,0
IL-10	REGN1979 EC ₅₀ (M)	3,54 X 10 ⁻¹¹	1,04 X 10 ⁻¹⁰	2,43 X 10 ⁻¹⁰	5,29 X 10 ⁻¹¹	3,34 X 10 ⁻¹¹	9,95 X 10 ⁻¹¹
	Tối đa CKR (pg/mL)	528	683	835	633	450	512
	Số lần thay đổi (CKR)	1,0	1,3	1,6	1,2	0,9	1,0
TNF	REGN1979 EC ₅₀ (M)	5,03 X 10 ⁻¹²	8,69 X 10 ⁻¹³	3,45 X 10 ⁻¹²	2,08 X 10 ⁻⁰³	1,62 X 10 ⁻¹⁰	2,43 X 10 ⁻¹⁰

alpha	Tối đa CKR (pg/mL)	236	129	170	NC	35,4	29,6
	Số lần thay đổi (CKR)	8,0	4,4	5,8	NC	1,2	1,0
IFN- gamma	REGN1979 EC₅₀ (M)	1,17 X 10 ⁻¹⁰	5,34 X 10 ⁻¹¹	2,00 X 10 ⁻¹⁰	6,72 X 10 ⁻¹¹	6,57 X 10 ⁻¹¹	1,82 X 10 ⁻¹⁰
	Tối đa CKR (pg/mL)	525	537	693	348	167	2,06
	Số lần thay đổi (CKR)	2,6	2,6	3,4	1,7	0,8	1,0
	REGN1979 EC₅₀ (M)	3,22 X 10 ⁻¹⁰	1,11 X 10 ⁻¹⁰	7,60 X 10 ⁻¹¹	4,63 X 10 ⁻¹⁰	1,86 X 10 ⁻¹⁰	2,50 X 10 ⁻¹⁰
IL-17A	Tối đa CKR (pg/mL)	26,6	25,2	20,6	33,3	21,9	20,5
	Số lần thay đổi (CKR)	1,3	1,2	1,0	1,6	1,1	1,0

^a REGN1979 đã được thử nghiệm ở nồng độ thay đổi từ 4,8fM đến 10nM.

^b CKR tối đa được ghi nhận là vùng tối đa được xác định bởi sự phù hợp của đường cong PRISM.

^c Số lần thay đổi về mức cytokin tối đa trong huyết thanh được tính là CKR tối đa ([M] REGN5837) / MAX CKR (không REGN5837)

Viết tắt: CKR, giải phóng cytokin; NC, không được tính toán vì mức giải phóng cytokin không đạt đến độ bão hòa ở phạm vi nồng độ REGN1979 được thử nghiệm, hoặc không thể trang bị đường cong đáp ứng liều

Hiệu quả chống khối u của việc quản lý REGN5837 khi có và không có các liều lượng dưới hiệu quả của REGN1979

Chuột NSG thiếu miễn dịch mang khối u WSU-DLCL2 đã được tiêm IP kháng thể hoặc đối chứng không bắc cầu như được mô tả trước đây trong tài liệu này.

Ở chuột mang khối u, điều trị với 1 mg/kg REGN5837 khi có mặt 0,4 hoặc 4 mg/kg REGN1979 dẫn đến ức chế có ý nghĩa thống kê sự phát triển của khối u so với bsAbs đối chứng không bắc cầu (không TAAxCD28 và không TAAxCD3 bsAbs) vào ngày 28 (6 ngày sau liều kháng thể cuối cùng (Fig. 13A và 13B). Sự kết hợp 1 mg/kg REGN5837 và 0,4 mg/kg REGN1979 dẫn đến giảm đáng kể thể tích khối u so với liệu pháp trị liệu đơn REGN1979 vào ngày 46 .

Cả liệu pháp trị liệu đơn 0,4 và 4 mg/kg REGN1979 dẫn đến ức chế khối u khiếm tốn so với đối chứng không bắc cầu vào ngày 28, trong khi liệu pháp trị liệu đơn REGN5837 không có tác dụng. Sự phát triển nhanh chóng của khối u được quan sát khi dùng thuốc với bsAbs đối chứng không bắc cầu trong suốt thời gian dùng thuốc, và tất cả chuột đã chết vào ngày thứ 125.

Thử nghiệm Mantel-Cox phát hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ sống sót giữa tất cả các nhóm ($p = 0,0001$) và thử nghiệm Mantel-Cox bổ sung được thực hiện để so sánh theo nhóm. Sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ sống sót đã được quan sát thấy đối với chuột được dùng liều 1 mg/kg REGN5837 kết hợp với 0,4 hoặc 4 mg/kg REGN1979 (85% và 70% tỷ lệ sống sót, tương ứng) so với chuột được cho dùng kháng thể đối chứng không bắc cầu (không sống sót) (Fig. 14).

Hơn nữa, sự gia tăng đáng kể tỷ lệ sống sót đã được quan sát thấy ở chuột được dùng liều 1 mg/kg REGN5837 kết hợp với 0,4 hoặc 4 mg/kg REGN1979 so với chuột được dùng liều REGN5837 hoặc REGN1979 liệu pháp trị liệu đơn.

Sáng chế không bị giới hạn trong phạm vi của các phương án thực hiện cụ thể được mô tả ở đây. Thực vậy, các cải biến khác nhau theo sáng chế cùng với các sửa đổi được mô tả ở đây có thể trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ bản mô tả đã nêu và các hình vẽ kèm theo. Các cải biến này có mục đích nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được phân lập chứa:

miền liên kết kháng nguyên thứ nhất (D1) liên kết với CD28 của người và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (Heavy Chain Variable Region: HCVR) chứa ba vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (Heavy Chain Complementarity Determining Region: HCDR) là HCDR1, HCDR2, HCDR3 chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, 30, 32, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Light Chain Variable Region: LCVR) chứa ba vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nhẹ (Light Chain Complementarity Determining Region: LCDR) là LCDR1, LCDR2, LCDR3 chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, 14, 16; và

miền liên kết kháng nguyên thứ hai (D2) liên kết đặc hiệu với CD22 của người trên tế bào khối u đích và chứa các CDR của HCVR chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, 6, 8, và các CDR của LCVR chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, 14, 16.

2. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được phân lập theo điểm 1, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai (D2) liên kết với epitop trên CD22 của người chứa một hoặc nhiều axit amin của SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, và/hoặc SEQ ID NO:59.

3. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được phân lập theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép này có tính chất được chọn trong số nhóm gồm có:

(a) liên kết với CD22 của người với K_D là nhỏ hơn khoảng 15 nM khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C;

(b) liên kết với CD22 của *Macaca fascicularis* (khỉ đuôi dài) với K_D nhỏ hơn khoảng 60 μ M khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C;

(c) liên kết với CD28 của người với K_D nhỏ hơn khoảng 45 μ M khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C;

(d) liên kết với bề mặt của tế bào biểu hiện CD28 của người với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M khi được xác định bằng thử nghiệm liên kết phân loại tế bào

hoạt hóa huỳnh quang (Fluorescence-activated Cell Sorting: FACS) *in vitro*;

(e) liên kết với bề mặt của tế bào biểu hiện CD22 của người với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} M khi được xác định bằng thử nghiệm liên kết FACS *in vitro*; và

(f) thể hiện hiệu quả đồng kích thích khi được sử dụng liên hợp với kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20xCD3.

4. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được phân lập theo điểm 1, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất chứa cặp HCVR/LCVR chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 26/10.

5. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được phân lập theo điểm 1, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai chứa cặp HCVR/LCVR chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 2/10.

6. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được phân lập theo điểm 1 chứa:

miền liên kết kháng nguyên thứ nhất chứa cặp HCVR/ LCVR chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO:26/10; và

miền liên kết kháng nguyên thứ hai chứa cặp HCVR/ LCVR chứa các trình tự axit amin SEQ ID NO: 2/10.

7. Dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

8. Phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa phân tử kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1.

9. Vector biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 8.

10. Tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 9.

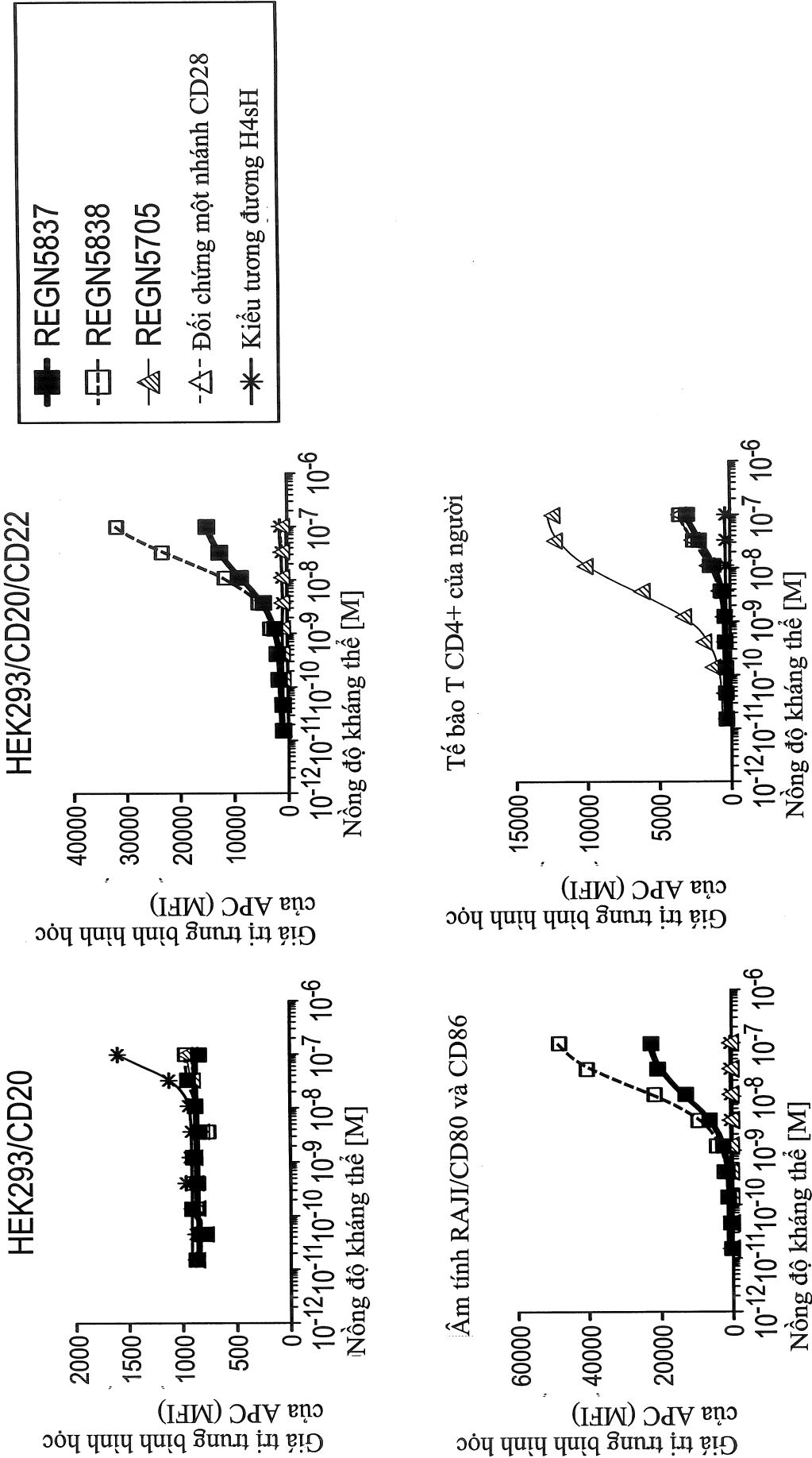


FIG. 1

Kháng thể đặc hiệu kép CD28 làm tăng sự sản xuất Luciferaza khi có sự kích thích tế bào T sơ cấp và sự biểu hiện đích CD22

FIG. 2A

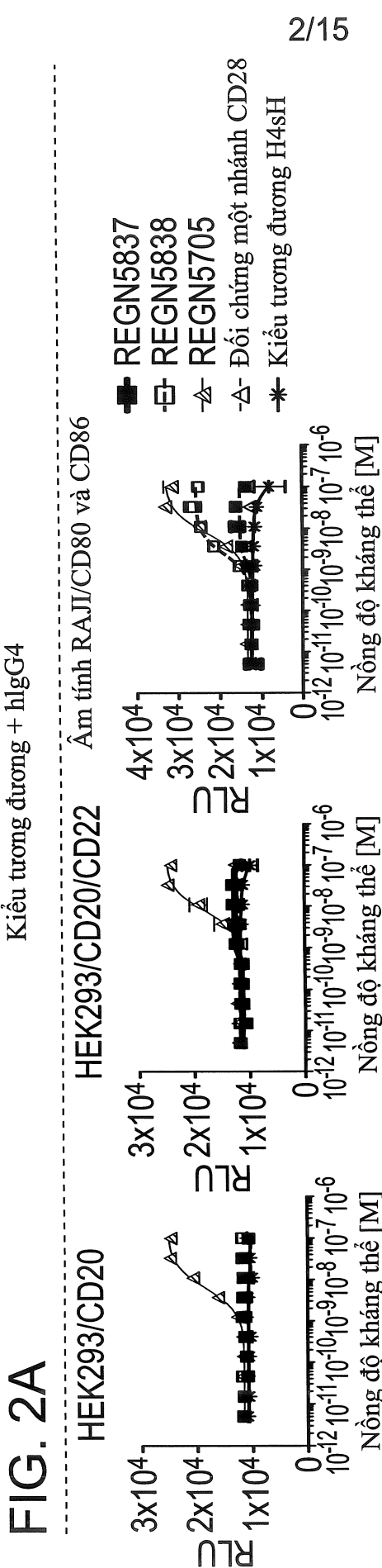
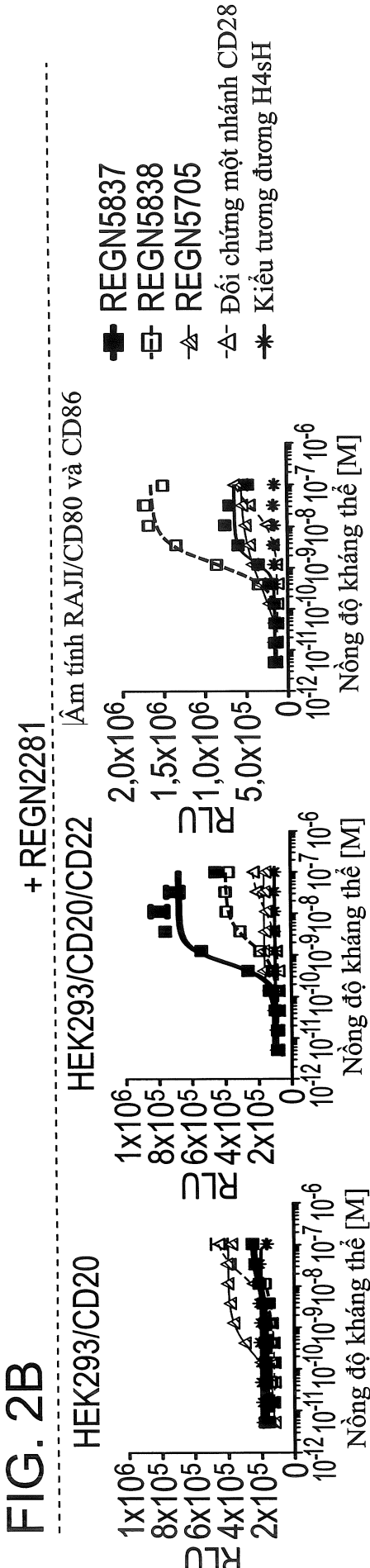


FIG. 2B



Kháng thể đặc hiệu kép CD28 làm tăng sự sản xuất IL-2 khi có sự kích thích tế bào T sơ cấp và sự biểu hiện đích CD22

FIG. 3A

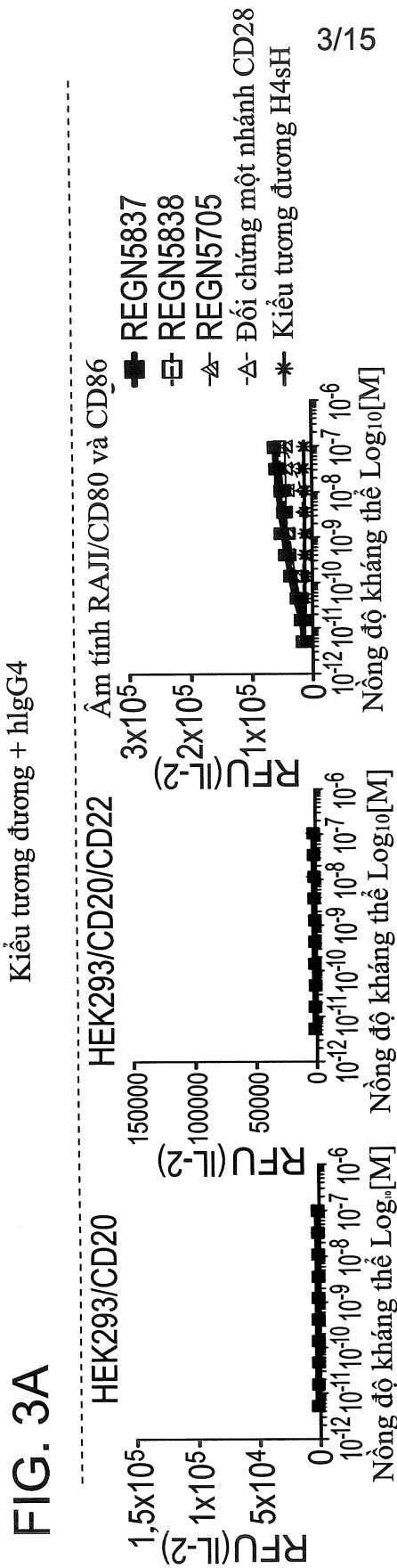
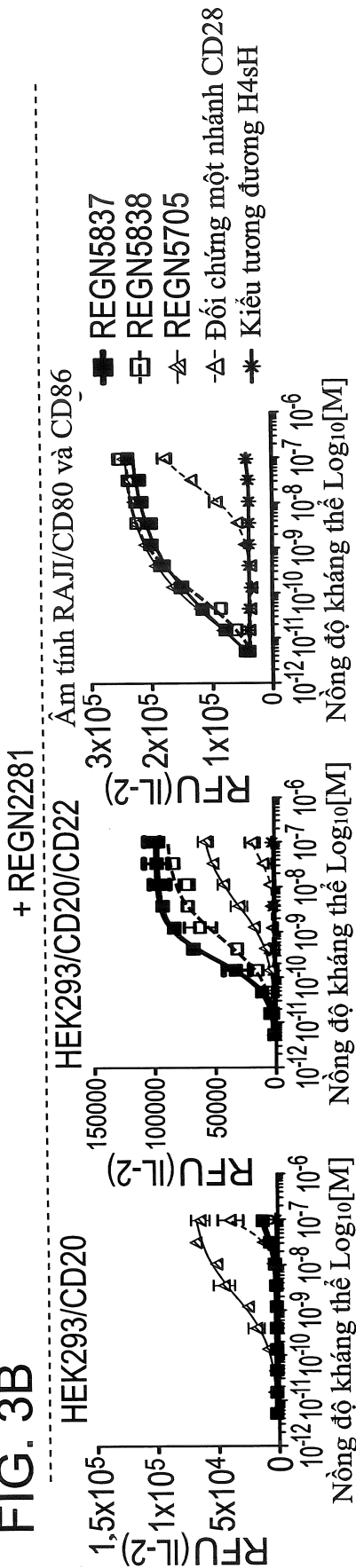
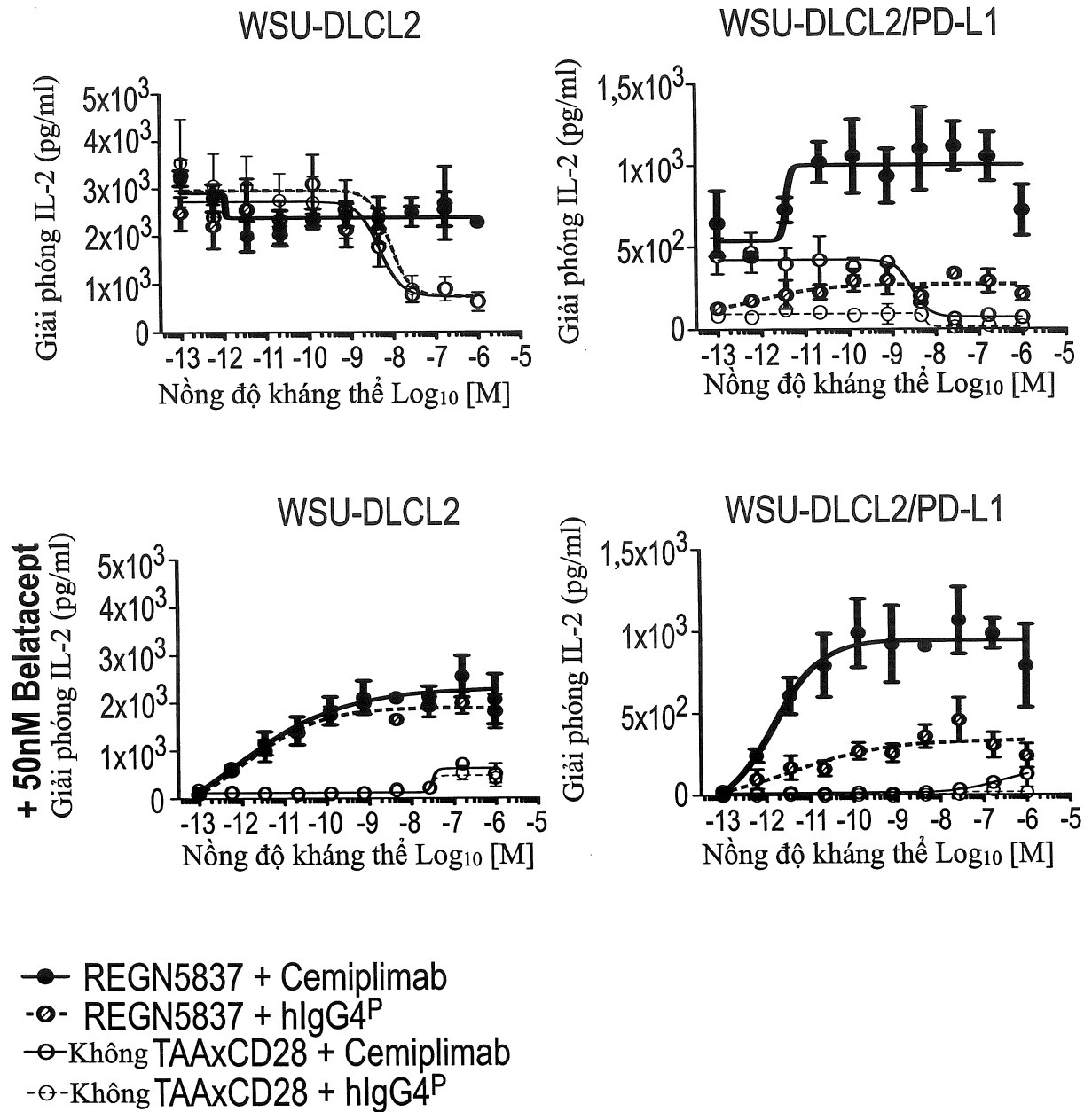


FIG. 3B



4/15

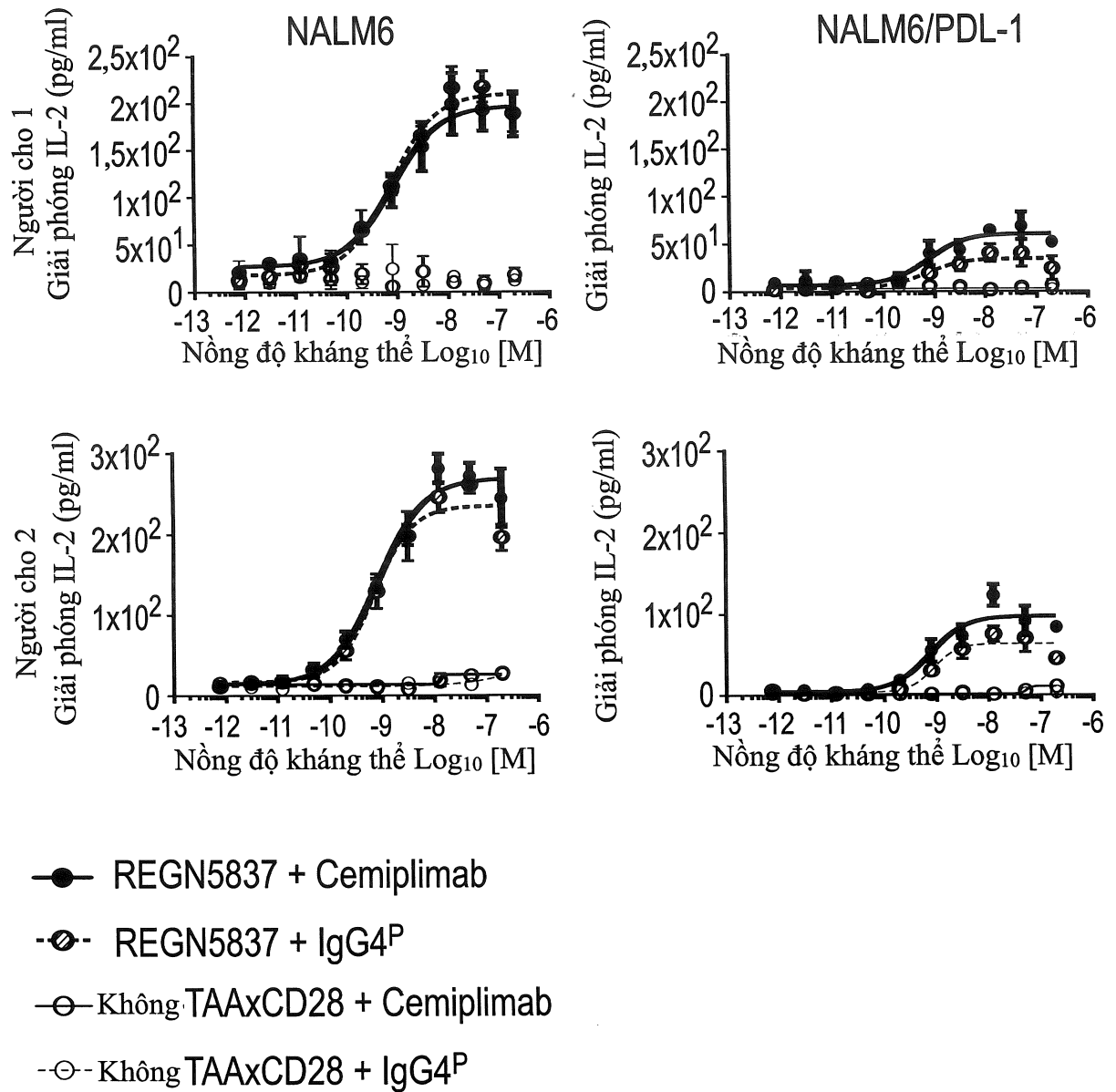


Kết hợp của REGN5837 + Cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 tối đa khi có mặt tế bào WSU-DLCL2 giải phóng PD-L1, đáng kể nhất là khi có mặt Belatacept

FIG. 4

5/15

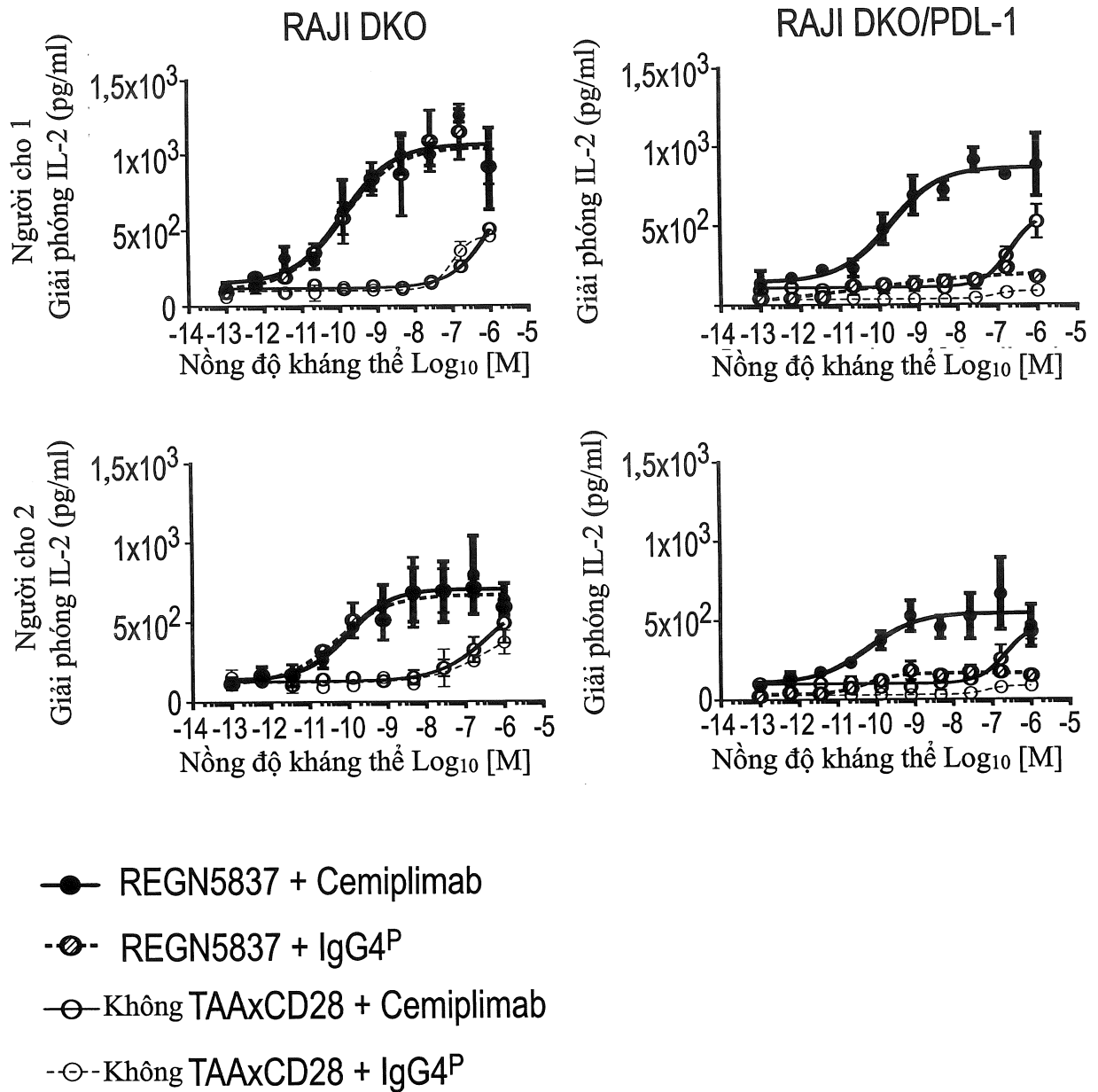
Giải phóng IL-2



Kết hợp của REGN5837 + Cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 so với chỉ điều trị với REGN5837 ở tế bào NALM6 được thiết kế để biểu hiện PD-L1

FIG. 5A

6/15



Kết hợp của REGN5837 + Cemiplimab tăng cường giải phóng IL-2 so với chỉ điều trị với REGN5837 ở tế bào RAJI được thiết kế để biểu hiện PD-L1

FIG. 5B

Điều trị chuột NSG mang khối u NALM-6 với REGN5837 khi có mặt REGN1979 liên quan đến sự suy yếu khối u đáng kể

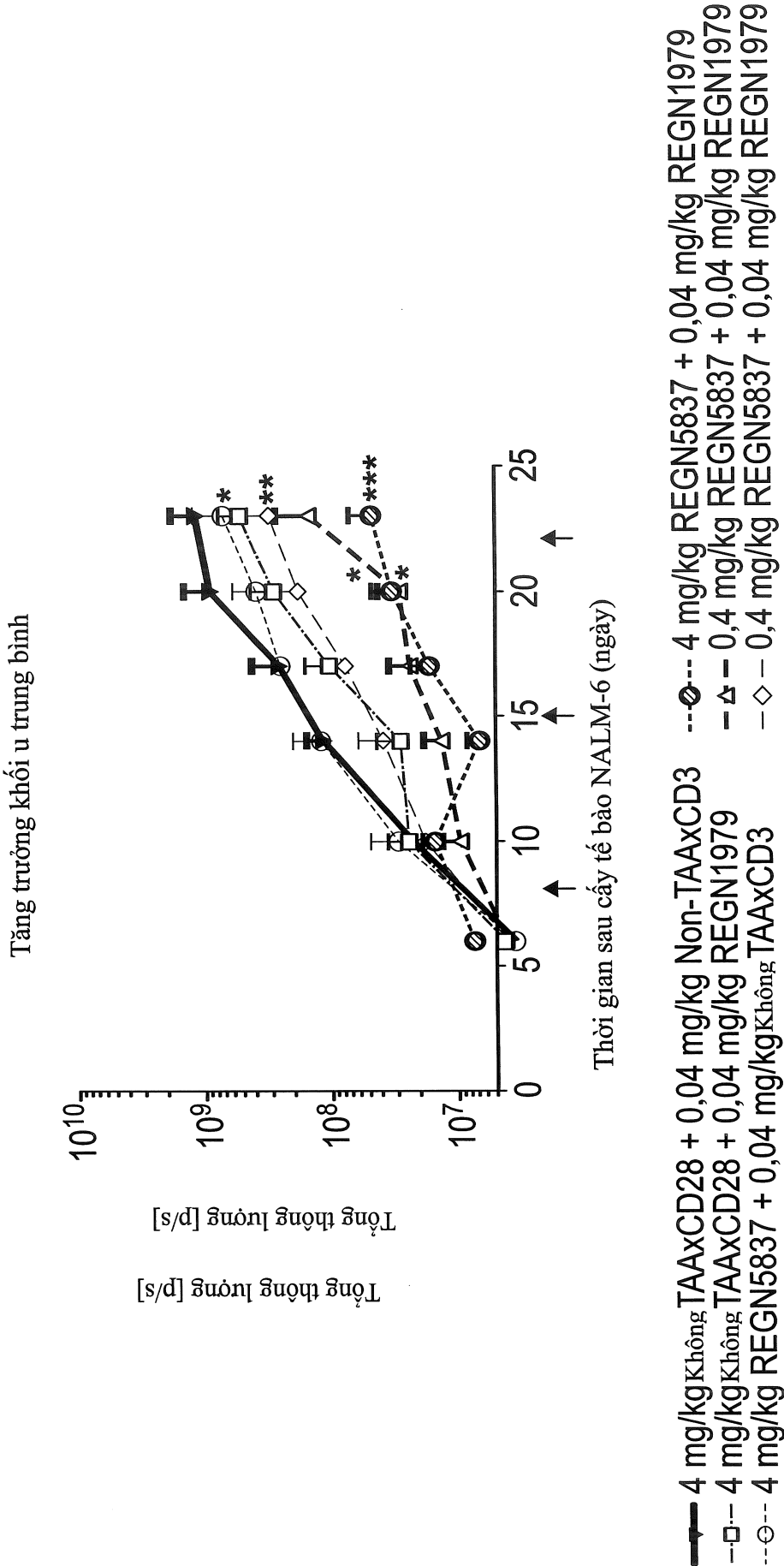


FIG. 6

FIG. 7A

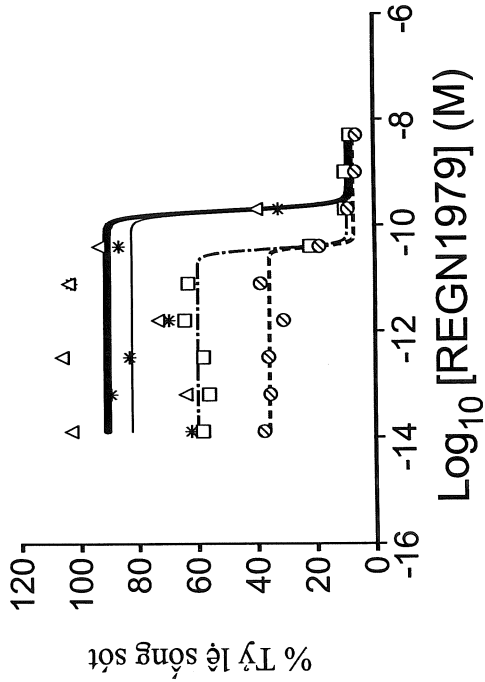


FIG. 7B

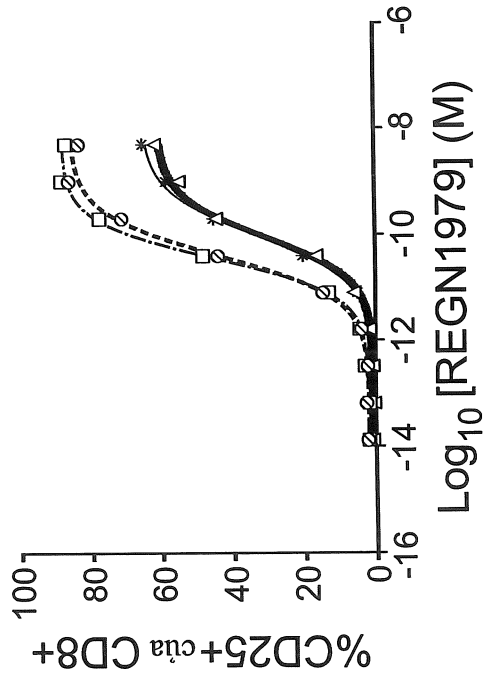
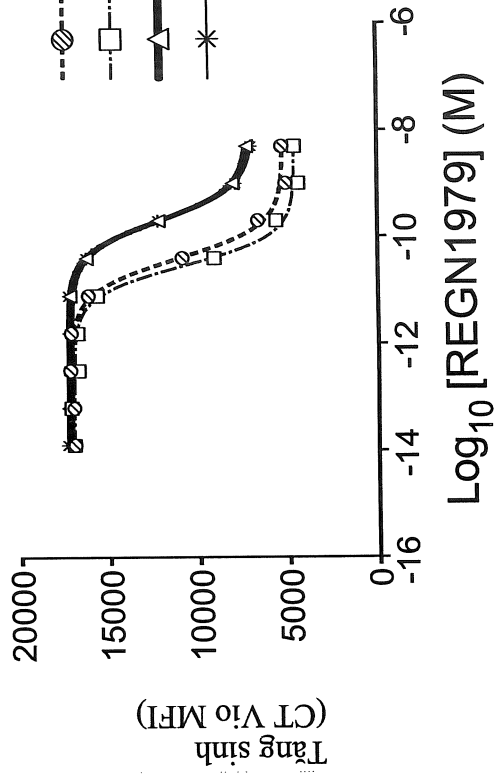
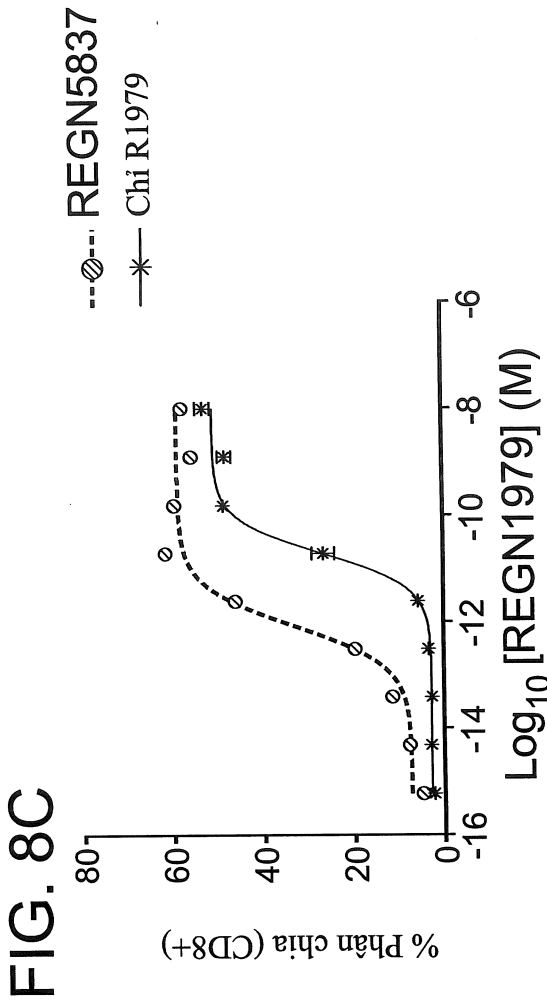
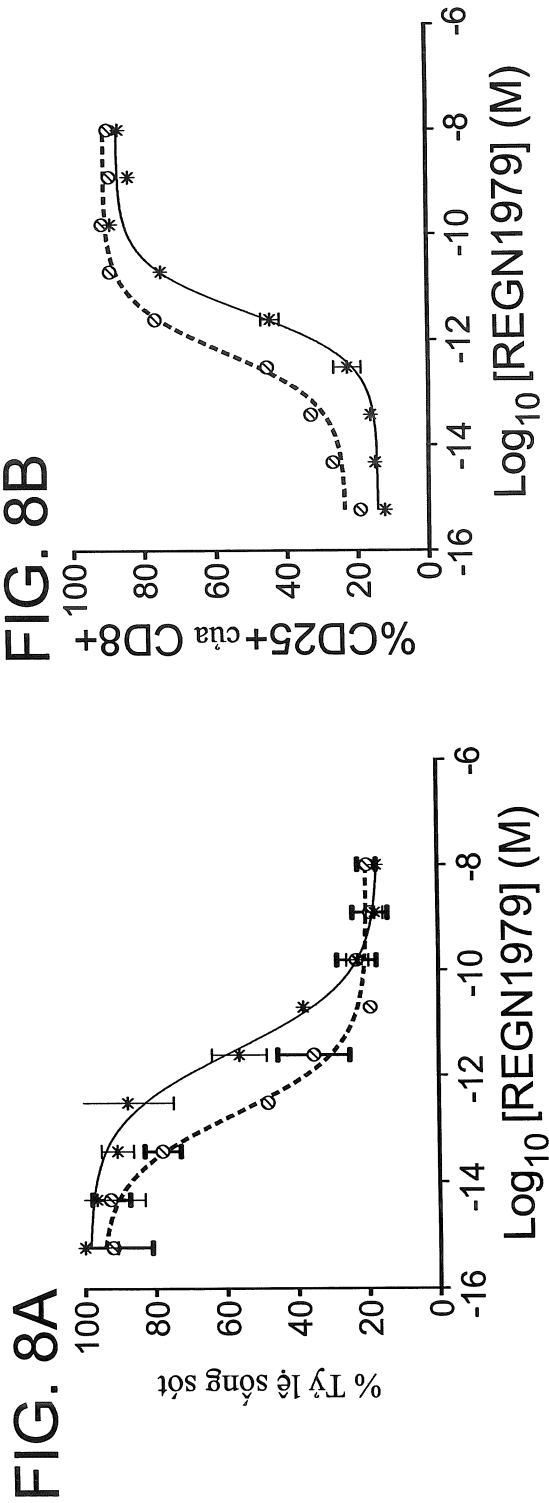


FIG. 7C

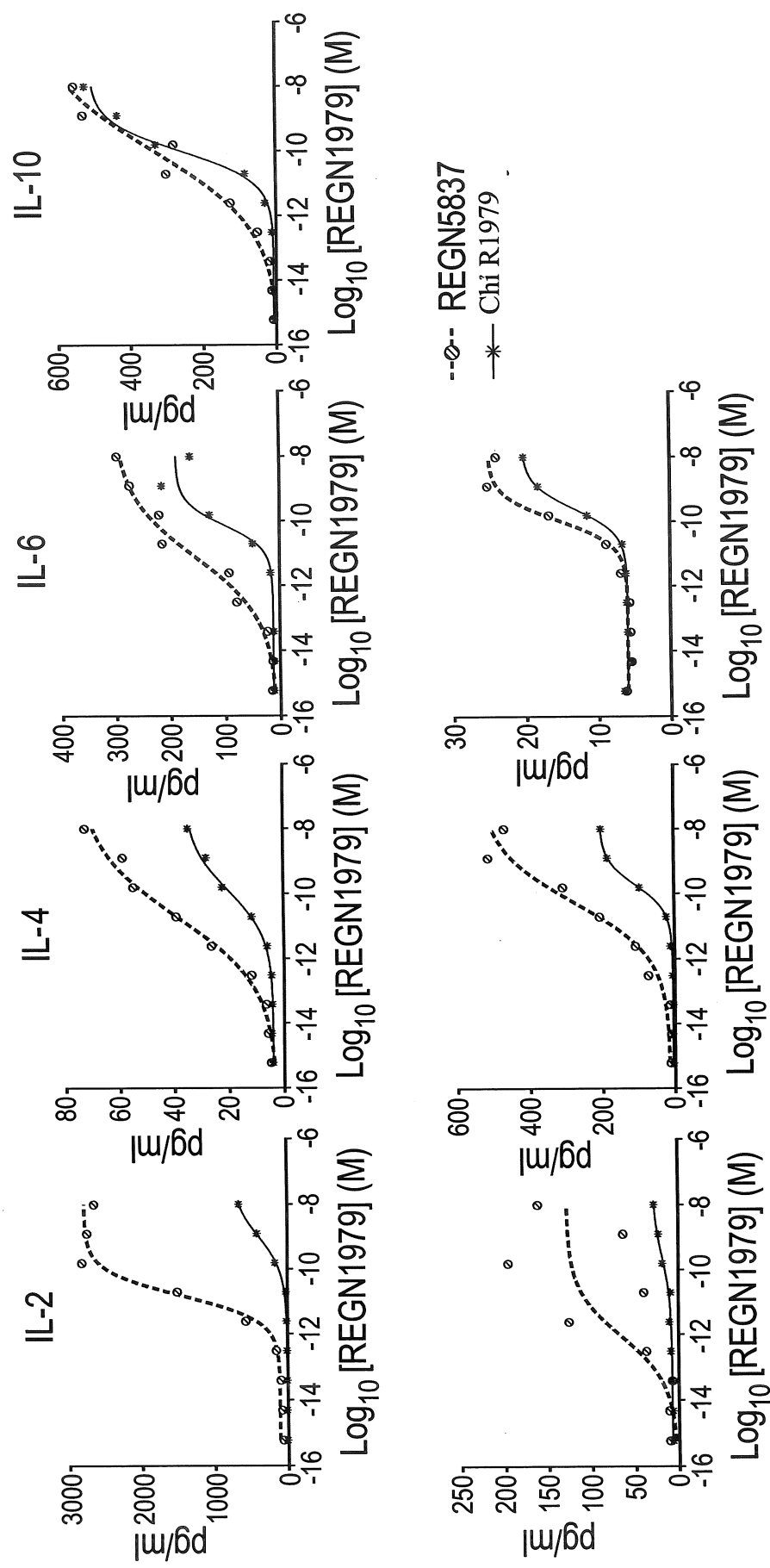


Tính gây độc tế bào và hoạt hóa tế bào T - đích Nalm6



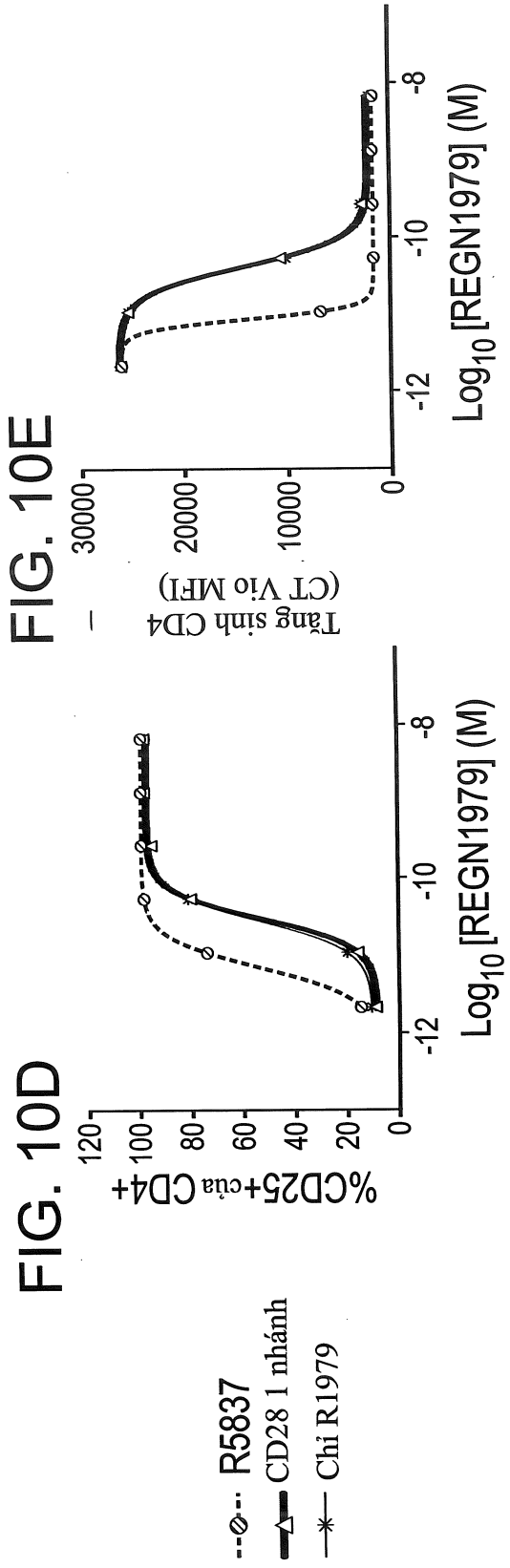
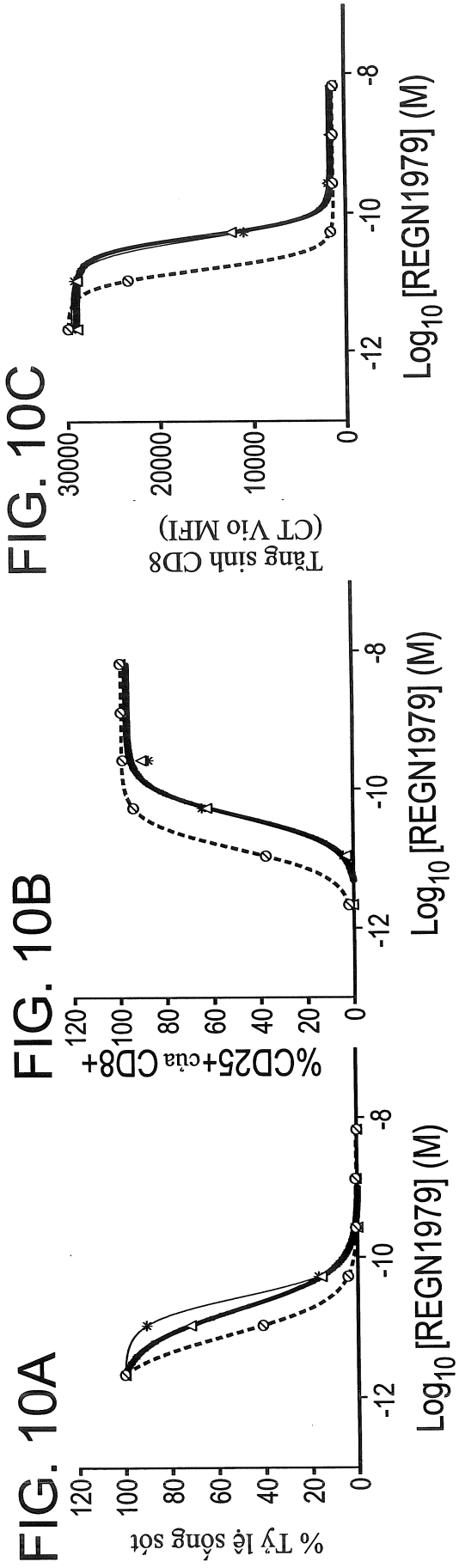
Tính gây độc tế bào và hoạt hóa tế bào T - đích WSU-DLCL2 (thể hiện 2 thí nghiệm)

10/15



Giải phóng cytokin từ thử nghiệm gây độc tế bào WSU-DLCL2 (thể hiện 2 thí nghiệm)

FIG. 9



Tính gây độc tế bào, hoạt hóa và tăng sinh tế bào T

REGN5837 tăng cường khả năng gây độc tế bào qua trung gian REGN1979, sự biểu hiện CD25 trên bề mặt tế bào và sự tăng sinh tế bào T theo cách phụ thuộc vào nồng độ

FIG. 11A

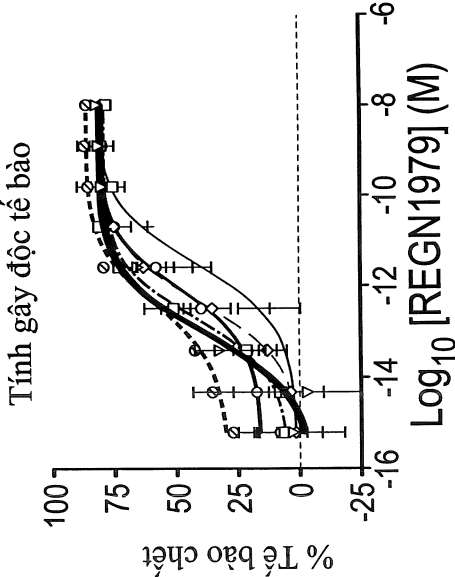


FIG. 11B

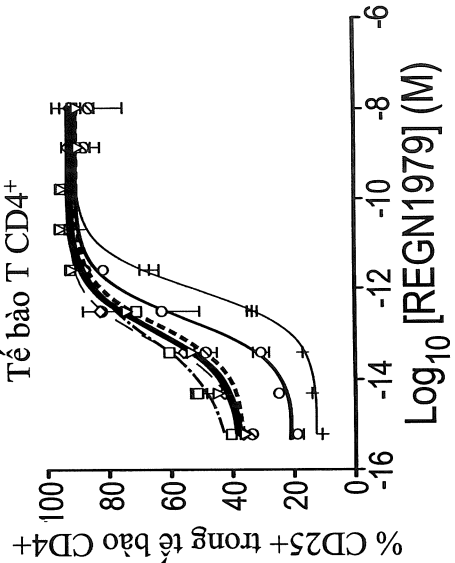


FIG. 11C

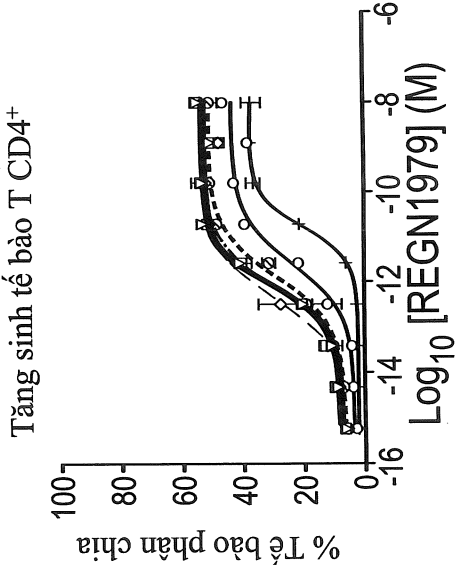


FIG. 11D

Sự biểu hiện CD25 trên tế bào T CD8⁺

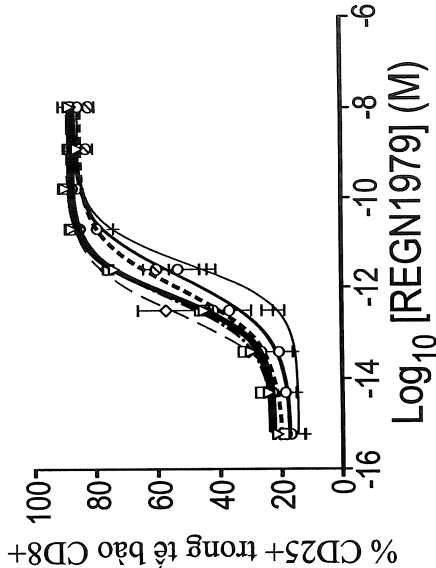
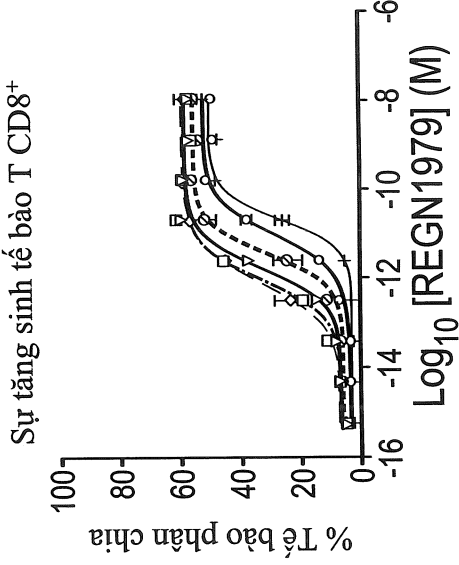


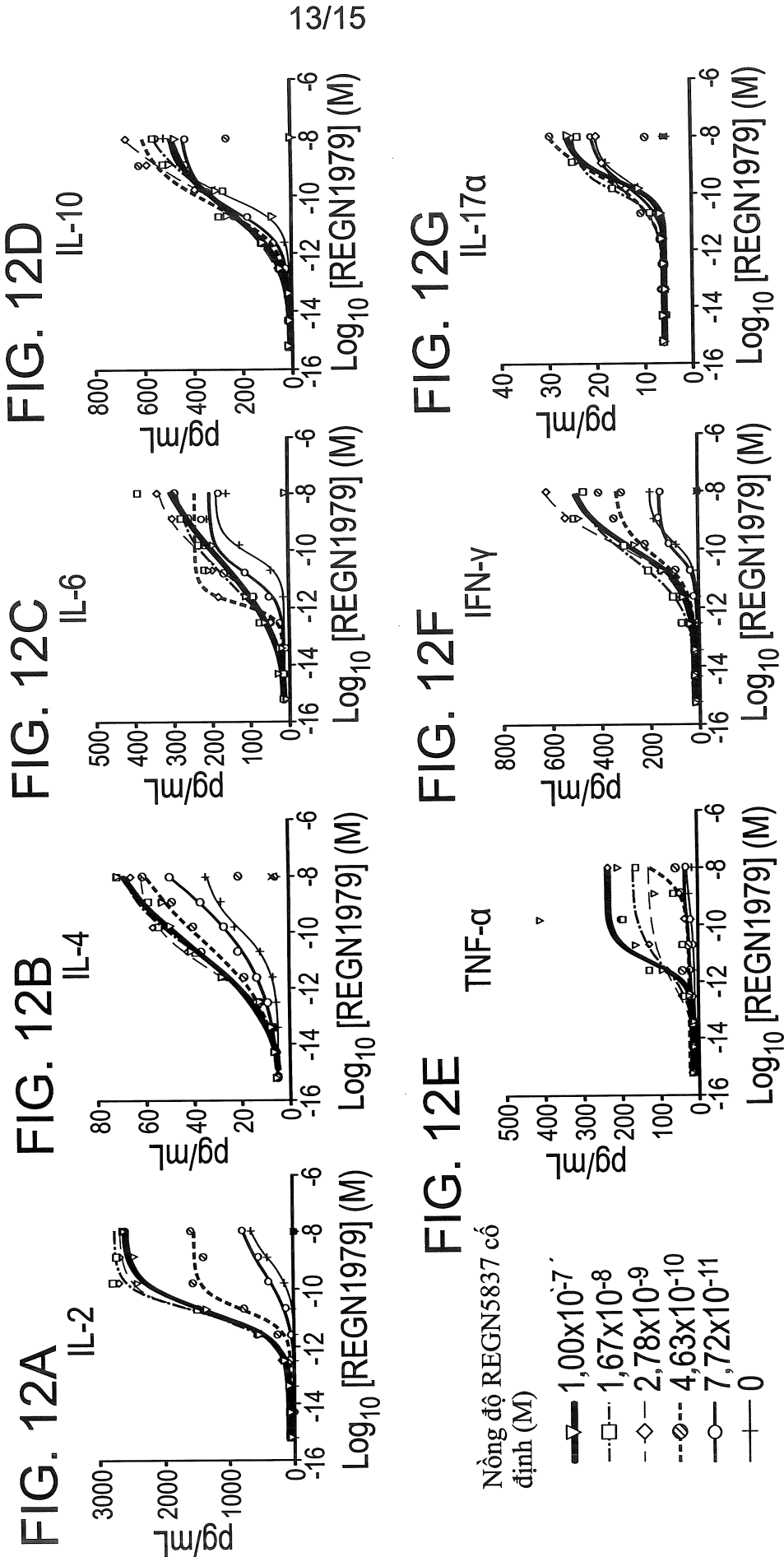
FIG. 11E



Nồng độ REGN5837 cố định (M)

- 1,00x10⁻⁷
- 1,67x10⁻⁸
- 2,78x10⁻⁹
- 4,63x10⁻¹⁰
- 7,72x10⁻¹¹
- 0

REGN5837 tăng cường khả năng và mức tối đa của sự giải phóng cytokin qua trung gian REGN1979 từ tế bào T của người theo cách phụ thuộc vào nồng độ khi có mặt tế bào u lympho tế bào B WSU-DLCL2



14/15

Điều trị cho chuột NSG mang khối u WSU-DLCL2 với REGN5837 khi có mặt liều gần hiệu quả của REGN1979 liên quan đến sự suy yếu khối u đáng kể

FIG. 13A

Sự tăng trưởng khối u trung bình
0,4 mg/kg REGN1979

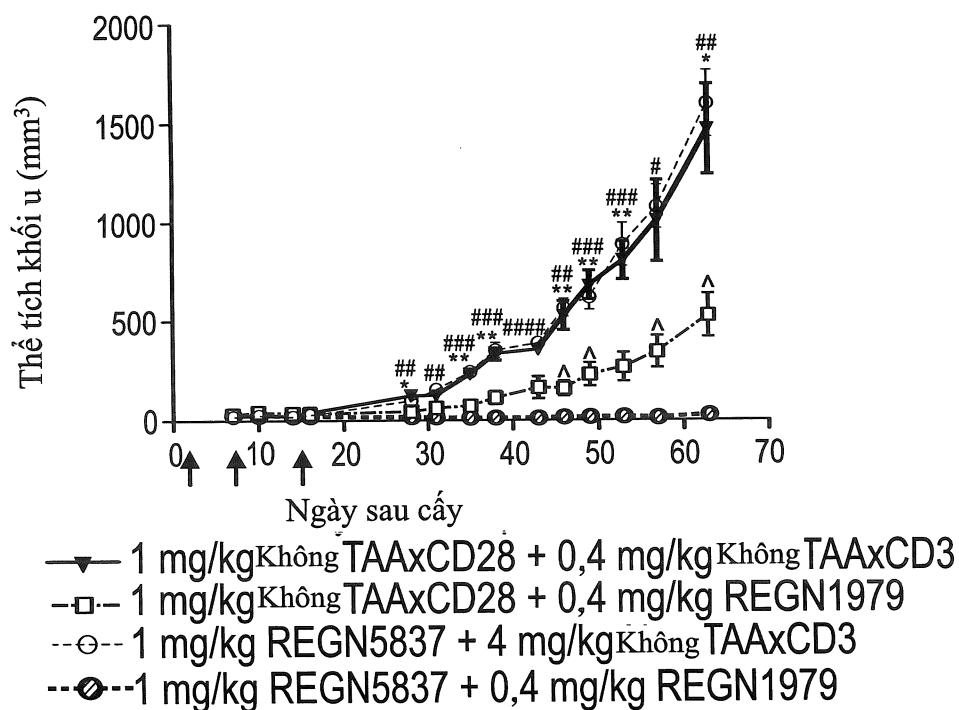
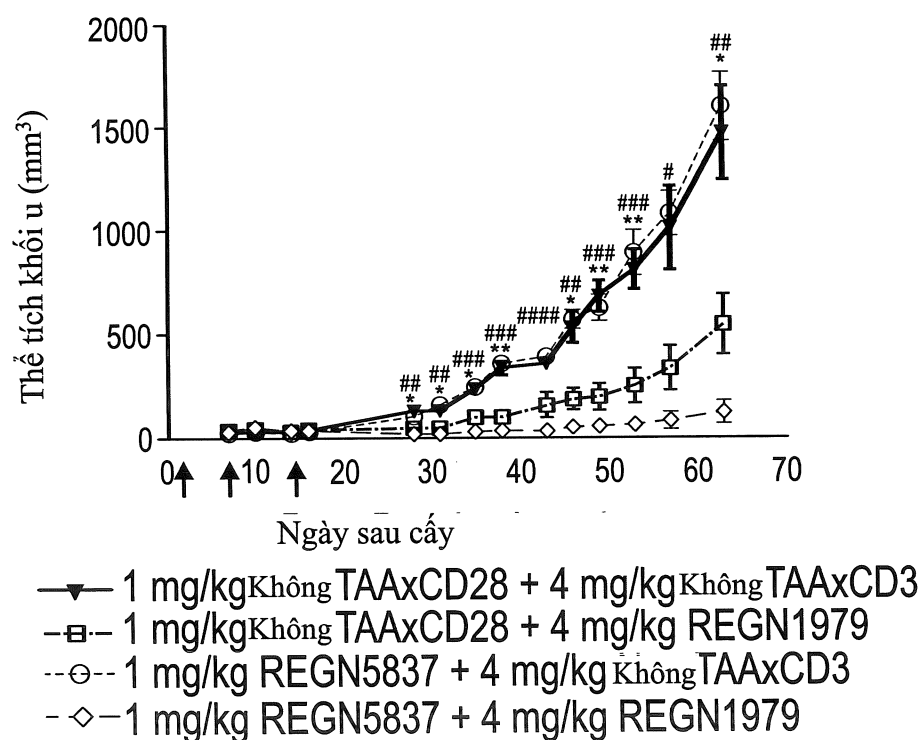


FIG. 13B

Tăng trưởng khối u trung bình
4 mg/kg REGN1979



Điều trị chuột NSG mang khối u WSU-DLCL2 với REGN5834 khi có mặt liều gần hiệu quả của REGN1979 liên quan đến tỷ lệ sống sót đáng kể hơn liều pháp đơn REGN5737 hoặc REGN1979

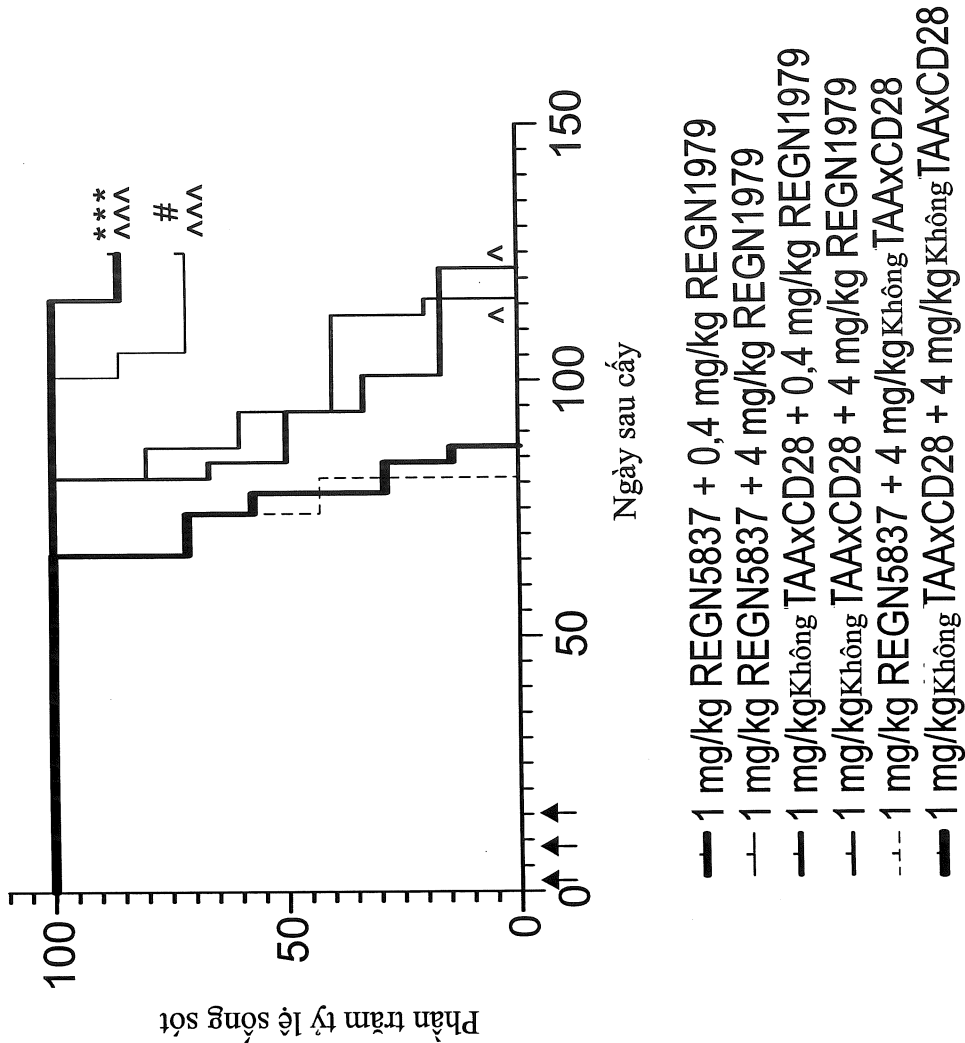


FIG. 14

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> PHÂN TỬ KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP ĐƯỢC PHÂN LẬP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ KHÁNG THỂ NÀY

<130> 118003-49220

<140>

<141>

<150> 62/781,689

<151> 2018-12-19

<160> 74

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 1

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg gttctggata caactttgcc acgtactgga ttgcctgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagtt gatgggaatc atctatcctg gtgactctga gaccacatac	180
aacccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag taacgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attattgtgc gagagtagga	300
ggatattgta gtggtaccag ttgccacaac tggttcgacc cctggggcct gggaaccctg	360
gtcaccgtct cctca	375

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

"

<400> 2

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

<400> 4
Gly Tyr Asn Phe Ala Thr Tyr Trp
1 5

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 5
 atctatcctg gtgactctga gacc

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 6
 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Glu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 7
 gcgagagtag gaggatattg tagtggtacc agttgccaca actggttcga cccc

54

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 8

Ala Arg Val Gly Gly Tyr Cys Ser Gly Thr Ser Cys His Asn Trp Phe
1 5 10 15

Asp Pro

<210> 9

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 9

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc	300
caagggacca aggtggaaat caaa	324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 11

cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 12

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 13

ggtgcatcc

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 14
 Gly Ala Ser
 1

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 15
 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 16
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 17
 gaggtgcagc tggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgaaactc
 tcctgtgcag cctctgggtt caccttcagt ggctctgata tgcactgggt cgcagggt

60

120

tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaaacc aacctaatag ttacgcgaca 180
 gcatatgctg cgctcggtgaa aggcagggttc accatctcca gagatgattc aaagaacacg 240
 gcgcatttgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtattt ttgtactaga 300
 caaaagcagg tcgtttataa ttaccatcac tactacggta tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtca ccgtctcctc a 381

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<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 Gly Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Asn Gln Pro Asn Ser Tyr Ala Thr Ala 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 His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Phe Cys Thr Arg Gln Lys Gln Val Val Tyr Asn Tyr His His Tyr Tyr
 100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 19

gggttcacct tcagtggctc tgat

24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Asp

1

5

<210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 21

attagaaacc aacctaataag ttacgcgaca

30

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 22

Ile Arg Asn Gln Pro Asn Ser Tyr Ala Thr

1

5

10

<210> 23

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 23

actagacaaa agcaggtcgt ttataattac catcactact acggtatgga cgtc

54

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 24

Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Val	Val	Tyr	Asn	Tyr	His	His	Tyr	Tyr	Gly	Met
1				5				10						15	

Asp Val

<210> 25

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: CD28-HCVR-NA tổng hợp"

<400> 25

caggtgcagc	tgaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagt	agttactact	ggagctggat	ccggcagccc	120
ccagggaagg	gactggagtg	gattgggtat	atctattaca	gtgggatcac	ccactacaac	180
ccctccctca	agagtcgagt	caccatatca	gtagacacgt	ccaagatcca	gttctccctg	240
aagctgagtt	ctgtgaccgc	tgcgacacg	gccgtgtatt	actgtgcgag	atgggggggtt	300
cggaggggact	actactacta	cggtatggac	gtctggggcc	aagggaccac	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

<210> 26

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: CD28-HCVR-AA tổng hợp"

<400> 26

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:CD28-HCDR1-NA tổng hợp"

<400> 27

ggtggctcca tcagtagtta ctac

24

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: CD28-HCDR1-AA tổng hợp"

<400> 28
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:CD28-HCDR2-NA tổng hợp"

<400> 29
 atctattaca gtgggatcac c

21

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: CD28-HCDR2-AA tổng hợp"

<400> 30
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: CD28- HCDR3-NA tổng hợp"

<400> 31
 cgagatgggg gggttcggagg gactactact actacggtat ggacgtc

47

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: CD28- HCDR3-AA tổng hợp"

<400> 32

Ala Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 33

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 10369N_VH(mouse).mIgG1 tổng hợp"

<400> 33

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Ile Asn Phe Gly Ser Asn Tyr Asp Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala			
	195	200	205
Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys			
	210	215	220
Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe			
	225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val			
	245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe			
	260	265	270
Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro			
	275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro			
	290	295	300
Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val			
	305	310	315
Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr			
	325	330	335
Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys			
	340	345	350
Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp			
	355	360	365
Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro			

370

375

380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

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

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 10369N_VK(mouse).mkappa tổng hợp"

<400> 34

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

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

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

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

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 35
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: tàng hình/sao
 14226P2_VH(người).hIgG4 tổng hợp"

<400> 35
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 3-20 GL VK.hKappa tổng hợp"

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 210

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: tàng hình 10154P_VH(người).hIgG4 tổng hợp"

<400> 37

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Tyr Arg Ala Ala Asn Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Gln Asp Arg Val Ile Ile Lys Asp Tyr Tyr Val Met Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 1-39 GL (PP) VK.hKappa tổng hợp"

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 39
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: VAC3B9_VH(người).hIgG4 tổng hợp"
 <400> 39
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205

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

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

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

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

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

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

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 40

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: sao FAAR9F07_VH(người).hIgG4 tổng hợp"

<400> 40

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 41

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: FAAR9F07_VK(người).hKappa tổng hợp"

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 42
 <211> 453

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo; tàng hình VAC3B9_VH(người).hIgG4 tổng hợp"

<400> 42

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

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

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

Ser Val Ile Ser Trp Asn Ser Asp Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Asn His Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gln Tyr
 100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 195 200 205

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

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 43

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: tàng hình/sao
FAAR9F07_VH(người).hIgG4 tổng hợp"

<400> 43

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Asn Ser Gly Tyr Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ala Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

Lys

<210> 44

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: FAAR9F07_VK(người).hKappa tổng hợp"

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ile Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 45

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 1238N_VH(người).hIgG4 tổng hợp"

<400> 45

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg His Arg Val Thr Arg Thr Ala Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 1238N VK(người).hKappa tổng hợp"

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 47

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: tàng hình 11838P2_VH(người).hIgG4 (PSMA) tổng hợp"

<400> 47

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

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

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

Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp His Gly Val Phe Asp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 48

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: tàng hình/sao
 14226P2_VH(người).hIgG4 (CD28) tổng hợp"

<400> 48

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Trp Gly Val Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 49

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: 3-20 GL VK.hKappa tổng hợp"

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 50

<211> 696

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:REGN5140 hCD22 ecto (D20-R687).mmH tổng hợp"

<400> 50

Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp
1 5 10 15

Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn
 35 40 45

Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly
 50 55 60

Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn
 65 70 75 80

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

Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg
 100 105 110

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

Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu
 130 135 140

Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu
 145 150 155 160

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

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser
 180 185 190

His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys
 195 200 205

Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys
 210 215 220

Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp
 225 230 235 240

Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr
 245 250 255

Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
 260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr
 275 280 285

Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val
 290 295 300

Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu
 305 310 315 320

His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser
 325 330 335

Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys
 340 345 350

Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu
 355 360 365

Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly
 370 375 380

Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro
 385 390 395 400

Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
 405 410 415

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val
 420 425 430

Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu
 435 440 445

Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala
 450 455 460

Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu
 465 470 475 480

Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro
 485 490 495

Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe
 500 505 510

Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly
 515 520 525

Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro
 530 535 540

Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln
 545 550 555 560

Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg
 565 570 575

Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser
 580 585 590

Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr
 595 600 605

Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys
 610 615 620

Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys
 625 630 635 640

Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
 645 650 655

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys Leu
 660 665 670

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 675 680 685

Asp Leu His His His His His His
 690 695

<210> 51
 <211> 697
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: REGN5280 mfCD22 ecto (D18-R686).mmH tổng hợp"

<400> 51
 Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile Tyr Ala Trp
 1 5 10 15

Glu Gly Ala Cys Val Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg Val Leu Asp Gly
 20 25 30

Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Gln Asn
 35 40 45

Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly
 50 55 60

Lys Val Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile
 65 70 75 80

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

Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu
 100 105 110

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

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

Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu
 145 150 155 160

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

Thr Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
 180 185 190

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly
 195 200 205

Lys Val Leu Ser Glu Asp Met Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro
 210 215 220

Lys Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Ile Val Arg Lys Gly
 225 230 235 240

Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn Pro Glu Tyr
 245 250 255

Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Ile Leu Leu Lys Glu Gln Asn
 260 265 270

Thr Leu Met Leu Thr Leu His Lys Val Thr Lys Ser Gln Ser Gly Arg
 275 280 285

Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Ala Thr Ser Glu Lys
 290 295 300

Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile
 305 310 315 320

Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile
 325 330 335

Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly
 340 345 350

Lys Glu Val Gln Gly Arg Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile
 355 360 365

Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu
 370 375 380

Gly Ile Gly Glu Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro
 385 390 395 400

Pro Lys Lys Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu
405 410 415

Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile
420 425 430

Val Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser
435 440 445

Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala Val
450 455 460

Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Thr
465 470 475 480

Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg Lys Ile Lys
485 490 495

Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp
500 505 510

Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn
515 520 525

Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser
530 535 540

Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly
545 550 555 560

Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg
565 570 575

Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys
580 585 590

Thr Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser
595 600 605

Tyr Ala Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg
610 615 620

Met Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp
625 630 635 640

Cys Gln Gly Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr
645 650 655

Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Gln Thr Ile Gly Arg Arg Glu Gln Lys
660 665 670

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
675 680 685

Glu Asp Leu His His His His His His
690 695

<210> 52

<211> 696

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: REGN5281 mfCD22 ecto (D20-R687).mmH tổng hợp"

<400> 52

Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile Tyr Ala Trp
1 5 10 15

Glu Gly Ala Cys Val Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg Val Leu Asp Gly
20 25 30

Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Gln Asn
35 40 45

Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Asn Thr Lys Asp Gly
50 55 60

Lys Leu Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile
65 70 75 80

Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Val Asn Asp Ser Gly
85 90 95

Gln Leu Gly Leu Arg Met Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg

100	105	110
Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln Leu		
115	120	125
Pro Pro Lys Leu Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu		
130	135	140
Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu		
145	150	155 160
Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Ser Thr		
	165	170 175
Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser		
	180	185 190
His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly Lys		
	195	200 205
Val Leu Ser Glu Asp Met Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys		
	210	215 220
Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Thr Val Arg Lys Gly Asp		
	225	230 235 240
Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr		
	245	250 255
Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Ile Pro Leu Lys Glu Gln Asn Thr		
	260	265 270
Leu Met Leu Thr Leu His Lys Val Thr Lys Ser Gln Ser Gly Arg Tyr		
	275	280 285
Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val		
	290	295 300
Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Ser Ser Arg Val Gln Ile Ser		
	305	310 315 320
Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser		

325	330	335
Pro Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys		
340	345	350
Glu Val Gln Gly Arg Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu		
355	360	365
Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Glu Ala Gly Asn Ile Leu Gly		
370	375	380
Ile Gly Glu Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro		
385	390	400
Lys Lys Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly		
405	410	415
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val		
420	425	430
Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu		
435	440	445
Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala Val Ala		
450	455	460
Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Thr Leu		
465	470	480
Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro		
485	490	495
Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe		
500	505	510
Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly		
515	520	525
Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro		
530	535	540
Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln		

Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys
 35 40 45

Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
 50 55 60

Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
 85 90 95

Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
 100 105 110

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 115 120 125

Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
 130 135 140

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 145 150 155 160

Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser
 165 170 175

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 180 185 190

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 195 200 205

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 210 215 220

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 225 230 235 240

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
 245 250 255

Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro
260 265 270

Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
275 280 285

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
290 295 300

Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser
305 310 315 320

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
325 330 335

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
340 345 350

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
355 360 365

<210> 54

<211> 162

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: REGN2011 hCD28 ecto (N19-P152).mmH tổng hợp"

<400> 54

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn
1 5 10 15

Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
20 25 30

Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys
35 40 45

Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
50 55 60

Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
85 90 95

Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
100 105 110

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
115 120 125

Pro Gly Pro Ser Lys Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
130 135 140

Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
145 150 155 160

His His

<210> 55

<211> 159

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: REGN3595 mCD28 ecto (N20-L150).mmH tổng hợp"

<400> 55

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Leu Leu Val Val Asp Ser Asn
1 5 10 15

Glu Val Ser Leu Ser Cys Arg Tyr Ser Tyr Asn Leu Leu Ala Lys Glu
20 25 30

Phe Arg Ala Ser Leu Tyr Lys Gly Val Asn Ser Asp Val Glu Val Cys
35 40 45

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

Glu Phe Asn Cys Asp Gly Asp Phe Asp Asn Glu Thr Val Thr Phe Arg
65 70 75 80

Leu Trp Asn Leu His Val Asn His Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
85 90 95

Glu Phe Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Arg Ser Asn Gly
100 105 110

Thr Ile Ile His Ile Lys Glu Lys His Leu Cys His Thr Gln Ser Ser
115 120 125

Pro Lys Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu
130 135 140

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
145 150 155

<210> 56

<211> 847

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự axit amin CD22 của người
tổng hợp: Số đăng ký CAA42006"

<400> 56

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
50 55 60

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

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

85	90	95
Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn		
100	105	110
Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp		
115	120	125
Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His		
130	135	140
Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr		
145	150	155
Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp		
165	170	175
Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser		
180	185	190
Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro		
195	200	205
Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala		
210	215	220
Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His		
225	230	235
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg		
245	250	255
Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro		
260	265	270
Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys		
275	280	285
Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser		
290	295	300
Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser		

305		310		315		320
Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val						
		325		330		335
Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu						
		340		345		350
Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His						
		355		360		365
Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro						
		370		375		380
Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn						
		385		390		395
						400
Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln						
		405		410		415
Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile						
		420		425		430
Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn						
		435		440		445
Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu						
		450		455		460
Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr						
		465		470		475
						480
Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro						
		485		490		495
Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys						
		500		505		510
Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln						
		515		520		525
Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu						

530		535		540
Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser				
545		550		555 560
Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser				
	565		570	575
Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala				
	580		585	590
Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu				
	595		600	605
Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val				
	610		615	620
Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His				
625		630		635 640
Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala				
	645		650	655
Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu				
	660		665	670
Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val				
	675		680	685
Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys				
	690		695	700
Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly				
705		710		715 720
Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys				
	725		730	735
Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr				
	740		745	750
Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro				

755

760

765

Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
 770 775 780

Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
 785 790 795 800

Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
 805 810 815

Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
 820 825 830

Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
 835 840 845

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Quyết định kháng nguyên tổng hợp của CD22 được liên kết bởi REGN5837 (mAb33037P2)"

<400> 57

Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser
 20 25

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: quyết định kháng nguyên tổng hợp của CD22 được liên kết bởi REGN5837 (mAb33037P2)"

<400> 58

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn
 1 5 10 15

Phe

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: quyết định kháng nguyên tổng hợp của CD22 được liên kết bởi REGN5838 (mAb33041P2)"

<400> 59

Cys	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro	Glu	Tyr	Thr	Thr	Val	Ser	Trp	Leu
1				5					10					15	

Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Lys	Gln	Asn	Thr	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu
			20					25					30		

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: đuôi 6xHis tổng hợp"

<400> 60

His	His	His	His	His	His
1				5	

<210> 61

<400> 61

000

<210> 62

<400> 62

000

<210> 63

<400> 63

000

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<400> 65
000

<210> 66

<400> 66
000

<210> 67

<400> 67
000

<210> 68

<400> 68
000

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<400> 70
000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72

<400> 72
000

<210> 73

<400> 73
000

<210> 74
<211> 220
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<400> 74
Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
85 90 95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220