



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0049143
(51)^{2020.01} C07K 16/28; C12N 15/13; A61K (13) B
39/395; A61P 35/00
-

- (21) 1-2022-00870 (22) 14/07/2020
(86) PCT/CN2020/101883 14/07/2020 (87) WO2021/008523 21/01/2021
(30) 201910634309.9 15/07/2019 CN
(45) 25/07/2025 448 (43) 27/06/2022 411A
(73) SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD. (CN)
Floor 13, Building 2, Nos. 36 and 58, Haiqu Road, Pilot Free Trade Zone, Shanghai
201210, China
(72) MENG, Qin (CN); YAO, Jian (CN); FENG, Hui (CN); YAO, Sheng (CN); WU, Hai
(CN).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

- (54) KHÁNG THỂ KHÁNG TIGIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-00870

(57) Sáng chế đề xuất các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể này và chế phẩm chứa chúng. Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, vector biểu hiện và tế bào chủ để biểu hiện các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và việc sử dụng các kháng thể này trong chẩn đoán và điều trị.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng TIGIT và sử dụng các kháng thể này và chế phẩm của chúng để điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể miễn dịch tế bào T có các vùng Ig và ITIM (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain, TIGIT) là thụ thể điều hòa miễn dịch bao gồm vùng globulin miễn dịch ngoại bào, vùng xuyên màng typ I và hai motif ITIM và được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào T được hoạt hóa và các tế bào NK (Stanietsky et al., PNAS, 2009, 106, 17858–17863). TIGIT nhận biết các phối tử thụ thể virus gây bệnh bại liệt (poliovirus receptor, PVR, CD155) và Nectin 2 (PVRL2/CD112), chúng được biểu hiện quá mức trên các loại tế bào khối u khác nhau. Đã có thông báo rằng TIGIT liên kết với phối tử PVR với ái lực cao. Sự liên kết của TIGIT với phối tử sẽ hoạt hóa các tín hiệu ức chế được trung gian bởi hai motif sau đây có mặt trong đuôi chất tế bào của TIGIT: motif giống tyrosin đuôi thụ thể miễn dịch (immunoreceptor tail tyrosin, ITT) và motif ức chế trên cơ sở tyrosin chiếm ưu thế miễn dịch (immunodominant tyrosin-based inhibitory motif, ITIM) (Liu et al., Cell death and differentiation 2013, 20, 456–464; Stanietsky et al., *European journal of immunology*, 2013, 43, 2138-2150). Phối tử bề mặt tế bào khối u, mà thông qua sự liên kết của nó với vùng ITIM của TIGIT trên bề mặt của các tế bào NK và các tế bào T, ức chế tính độc tế bào của các tế bào NK và hoạt tính của các tế bào T, và bằng cách đó trung gian cho cơ chế trốn tránh miễn dịch của các tế bào khối u. Đã được thông báo trong một số tài liệu sáng chế rằng các kháng thể kháng TIGIT mà phong bế sự liên kết của TIGIT với phối tử của nó có thể được sử dụng để điều trị các bệnh như khối u bằng cách ức chế sự ức chế miễn dịch trung gian bởi TIGIT (WO2004/024068, WO2009/126688, WO2015/009856, và WO2016/028656).

Có nhu cầu chưa được đáp ứng là tạo ra các hoạt chất được phẩm khác hiệu quả, đặc hiệu, an toàn và/hoặc ổn định hơn mà, một mình hoặc kết hợp với các hoạt chất được phẩm khác, có thể làm cho các tế bào của hệ miễn dịch tấn công các tế bào khối u bằng cách làm giảm hoạt tính ức chế của TIGIT của người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, khác biệt bởi có thành phần trình tự CDR khác thường và có thể liên kết với TIGIT với ái lực cao và tính đặc hiệu cao. Kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây có thể được sử dụng làm liệu pháp độc lập hoặc kết hợp với các liệu pháp khác và/hoặc các hoạt chất được phẩm kháng ung thư khác để điều trị, ví dụ, các bệnh ung thư.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TIGIT với tính đặc hiệu cao.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm 1 đến 3 vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nặng được chọn từ vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 1 và 11, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 2 và 12, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 3 và 13.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1,

HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm 1 đến 3 vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ được chọn từ vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó LCDR1 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 16, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc 17, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 hoặc 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16,

LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 và vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 và vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) này bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 4, 14, 21, 23, 25, 27 và 29.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) này bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 9, 19, 22, 24, 26, 28 và 30.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 4, 14, 21, 23, 25, 27, và 29; và trong đó VL bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ các SEQ ID NO: 9, 19, 22, 24, 26, 28 và 30.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 25, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 28.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 29, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 hoặc 32, và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 32 hoặc 34.

Theo một số phương án, trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được mô tả ở đây được nêu trong SEQ ID NO: 31, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 32; hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 33, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 34.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có đặc tính liên kết chéo với với protein TIGIT của người và khỉ cynomolgus.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có đặc tính phong bế hoặc ức chế sự liên kết của TIGIT với các phối tử tự nhiên của nó là PVR hoặc/và PVRL2.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây phong bế hoặc ức chế hoạt tính sinh học trung gian bởi TIGIT.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây là kháng thể của chuột nhắt, kháng thể thể khảm, kháng thể được nhân tính hóa hoặc kháng thể đầy đủ của người.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây là kháng thể đầy đủ, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể Fab, kháng thể Fab', kháng thể (Fab')₂ hoặc kháng thể hai giá (đa giá).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây là thuộc loại IgG bất kỳ, như IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập, phân tử này mã hóa kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp hoặc biểu hiện, vector này bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit nucleic nêu trên, trong đó vector này là thích hợp để tạo ra theo cách tái tổ hợp kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế đề xuất tế bào chủ, tế bào này bao gồm một hoặc nhiều vector biểu hiện hoặc tái tổ hợp nêu trên hoặc các phân tử axit nucleic nêu trên, hoặc biểu hiện kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Sáng chế đề xuất dược phẩm, dược phẩm này bao gồm chế phẩm của kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chất mang hoặc tá dược được dụng.

Theo một số phương án, dược phẩm nêu trên còn bao gồm chất đối kháng trực PD-1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có ít nhất một trong số các đặc tính sau đây:

1) liên kết với TIGIT của người có K_D bằng ít nhất khoảng 5nM, ít nhất khoảng 1nM, ít nhất khoảng 0,1nM, ít nhất khoảng 0,01nM hoặc ít nhất khoảng 0,001nM;

2) phản ứng chéo với TIGIT của khí cynomolgus.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây. Phương pháp này bao gồm việc tạo ra phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây hoặc vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic này, cụ thể là vector để tạo ra theo cách tái tổ hợp kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây trong tế bào chủ.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector biểu hiện hoặc tái tổ hợp nêu trên và phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây, trong đó phương pháp này bao gồm: nuôi cấy tế bào chủ và tinh chế và phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phương pháp này bao gồm: nuôi cấy tế bào chủ nêu trên, và phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ dịch nuôi cấy.

Khía cạnh thứ tư của sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm chứa nó được mô tả ở đây.

Theo một phương án, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây để bào chế thuốc để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể nêu trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử axit nucleic, vector, tế bào chủ hoặc dược phẩm nêu trên để bào chế thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn trung gian bởi TIGIT, trong đó tốt hơn nếu, bệnh hoặc rối loạn này là bệnh ung thư.

Khía cạnh thứ năm của sáng chế còn đề cập đến việc đồng sử dụng một hoặc nhiều liệu pháp (ví dụ, cách điều trị và/hoặc các chất điều trị khác) cho đối tượng bị bệnh ung thư. Theo một số phương án, liệu pháp nêu trên bao gồm: cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm chứa nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây. Theo một số phương án, cách điều trị nêu trên bao gồm điều trị phẫu thuật và xạ trị. Theo một số phương án, các chất điều trị khác nêu trên được chọn từ các chất hóa điều trị, các chất đối kháng trực PD-1 và các chất điều trị hướng đích khối u khác, trong đó các chất đối kháng trực PD-1 là được ưu tiên.

Theo một số phương án, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng hỗn hợp của bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây và chất đối kháng trực PD-1 để bào chế thuốc để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng.

Theo một số phương án, chất đối kháng trực PD-1 được chọn từ kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng PD-L2.

Khía cạnh thứ sáu của sáng chế còn đề cập đến phương pháp phát hiện TIGIT trong mẫu, phương pháp này bao gồm: a) cho mẫu này tiếp xúc với bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh của nó được mô tả ở đây; và b) phát hiện sự tạo ra phức chất của kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh của nó với TIGIT. Theo một phương án, kháng thể kháng TIGIT được đánh dấu phát hiện được.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kit hoặc sản phẩm bao gồm bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh của nó được mô tả ở đây. Theo một số phương án, kit hoặc sản phẩm này bao gồm kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh của nó được mô tả ở đây, tùy ý tá dược được dùng, và tùy ý một hoặc nhiều chất điều trị khác (ví dụ, chất hóa trị liệu, chất đối kháng trực PD-1 hoặc chất điều trị hướng đích khối u).

Sáng chế còn bao gồm tổ hợp bất kỳ của các phương án được mô tả ở đây. Phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả ở đây hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng là có thể áp dụng cho bất kỳ và tất cả các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh của nó, các phương pháp, và việc sử dụng được mô tả ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa tác dụng của các kháng thể tế bào lai đối với hoạt tính của các tế bào T được phát hiện bằng thử nghiệm luxiferaza.

Fig.2 minh họa sự liên kết của kháng thể thể khảm với TIGIT được phát hiện bằng ELISA.

Fig.3 minh họa tác dụng của các kháng thể thể khảm đối với hoạt tính của các tế bào T được phát hiện bằng thử nghiệm luxiferaza.

Fig.4 minh họa sự liên kết của các kháng thể được nhân tính hóa với TIGIT được phát hiện bằng ELISA.

Fig.5 minh họa tác dụng của các kháng thể được nhân tính hóa đối với hoạt tính của các tế bào T được phát hiện bằng thử nghiệm luxiferaza.

Fig.6 minh họa tác dụng của các kháng thể được nhân tính hóa trong việc phong bế sự liên kết của TIGIT với phối tử PVR được phát hiện bằng FACS.

Fig.7 minh họa việc nghiên cứu hiệu quả của các kháng thể TIGIT được nhân tính hóa và tổ hợp của chúng với kháng thể kháng PD-1 ở chuột chuyển gen TIGIT mang khối u MC38.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, khác biệt bởi có thành phần trình tự CDR khác thường và có thể liên kết với TIGIT với ái lực cao và tính đặc hiệu cao. Kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây có thể được sử dụng làm liệu pháp độc lập hoặc kết hợp với các

liệu pháp khác và/hoặc các hoạt chất kháng ung thư khác để điều trị, ví dụ, các bệnh ung thư.

Các định nghĩa

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, các phương án của sáng chế sẽ sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường (bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp), vi sinh học, tế bào học, hóa sinh học và miễn dịch học, các kỹ thuật này đều thuộc hiểu biết trong lĩnh vực này.

Để tạo thuận lợi cho việc hiểu được sáng chế, một số thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được định nghĩa cụ thể như sau. Nếu không được định nghĩa cụ thể theo cách khác ở đây, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Đối với các định nghĩa và thuật ngữ trong lĩnh vực này, người có hiểu biết có thể tham khảo cụ thể tài liệu Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel). Các ký hiệu viết tắt của các gốc axit amin là các ký hiệu 3 chữ cái và/hoặc 1 chữ cái chuẩn được sử dụng trong lĩnh vực này để chỉ một trong số 20 L-axit amin thường được sử dụng. Các dạng số ít được sử dụng ở đây (bao gồm các yêu cầu bảo hộ) bao gồm các dạng số nhiều của chúng, nếu không được chỉ rõ theo cách khác trong ngữ cảnh.

Thuật ngữ "khoảng" được sử dụng kết hợp với giá trị bằng số được dự định bao gồm các giá trị bằng số trong khoảng từ giới hạn dưới nhỏ hơn 5% giá trị bằng số đã chỉ ra đến giới hạn trên lớn hơn 5% giá trị bằng số đã chỉ ra.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "TIGIT", tên đầy đủ của nó là thụ thể miễn dịch tế bào T có các vùng Ig và ITIM, để chỉ TIGIT tự nhiên bất kỳ của động vật có xương sống bất kỳ (bao gồm các động vật có vú, như các động vật linh trưởng (ví dụ, người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột)), nếu không được chỉ rõ theo cách khác. Thuật ngữ này bao gồm TIGIT có "chiều dài đầy đủ" không được xử lý và TIGIT ở dạng bất kỳ thu được từ quá trình xử lý trong tế bào hoặc mảnh bất kỳ của nó. Thuật ngữ này cũng bao

gồm các biến thể của TIGIT có trong tự nhiên, ví dụ, các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. Theo một phương án, TIGIT để chỉ TIGIT có chiều dài đầy đủ của người và khỉ cynomolgus hoặc các mảnh của nó (như các mảnh trưởng thành của nó không có peptit tín hiệu). Theo một phương án, TIGIT của người để chỉ TIGIT trưởng thành giống với trình tự gồm các gốc axit amin 22–244 (mã số lưu giữ trong Genbank số NP_776160.2) (SEQ ID NO: 31) (các gốc axit amin 1–21 là các peptit dẫn đầu). Theo một phương án, TIGIT của người để chỉ vùng ngoại bào TIGIT giống với trình tự gồm các gốc axit amin 22–141 (mã số lưu giữ trong Genbank số NP_776160.2). Theo một phương án, TIGIT của khỉ cynomolgus (*Wacaca fascicularis*) để chỉ TIGIT trưởng thành giống với trình tự gồm các gốc axit amin 22–245 (mã số lưu giữ trong Genbank số XP_005548158.1).

"Mức độ giống trình tự axit amin theo tỷ lệ phần trăm (%)" được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự ứng viên giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu sau khi dóng thẳng hàng các trình tự này (với các khoảng trống được đưa vào nếu cần) để đạt được mức độ giống trình tự theo tỷ lệ phần trăm cao nhất mà không coi sự thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của mức độ giống trình tự. Các phương pháp khác nhau trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để thực hiện việc dóng thẳng hàng trình tự để xác định mức độ giống trình tự axit amin theo tỷ lệ phần trăm, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình phần mềm máy tính có sẵn, như chương trình phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, hoặc MEGALIGN (DNASTAR). Người có hiểu biết trong lĩnh vực này có thể xác định các thông số thích hợp để xác định sự dóng thẳng hàng, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để thu được sự dóng thẳng hàng lớn nhất đối với chiều dài đầy đủ của các trình tự được dóng thẳng hàng.

Thuật ngữ "phản ứng miễn dịch" để chỉ tác dụng của, ví dụ, các lympho bào, các tế bào trình diện kháng nguyên, các thực bào, các bạch cầu hạt, và các đại phân tử tan được tạo ra bởi các tế bào nêu trên hoặc gan (bao gồm các kháng thể, các xytokin và các bổ thể) mà dẫn đến tổn thương chọn lọc đối với, gây phá hủy, hoặc loại bỏ khỏi cơ thể người các

thể gây bệnh xâm nhập, tế bào hoặc mô nhiễm thể gây bệnh, các tế bào ung thư, hoặc, trong các trường hợp tự miễn hoặc viêm bệnh lý, các tế bào hoặc mô bình thường của người.

Thuật ngữ "con đường truyền tín hiệu" hoặc "hoạt tính truyền tín hiệu" để chỉ mối quan hệ nhân quả sinh hóa thường được khơi mào bởi tương tác protein-protein (như sự liên kết của yếu tố sinh trưởng với thụ thể) và dẫn đến sự truyền tín hiệu từ một phần của tế bào tới phần khác của tế bào này. Nói chung, việc truyền này bao gồm phosphoryl hóa đặc hiệu một hoặc nhiều gốc tyrosin, serin hoặc threonin trên một hoặc nhiều protein trong dãy các phản ứng gây ra sự truyền tín hiệu. Quá trình áp chót này thường bao gồm sự kiện nhân, dẫn đến làm thay đổi sự biểu hiện gen.

Thuật ngữ "hoạt tính" hoặc "hoạt tính sinh học", hoặc thuật ngữ "đặc tính sinh học" hoặc "đặc trưng sinh học" có thể được sử dụng thay đổi lẫn nhau ở đây và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ái lực và tính đặc hiệu epitop/kháng nguyên, khả năng trung hòa hoặc đối kháng hoạt tính TIGIT *in vivo* hoặc *in vitro*, IC₅₀, tính ổn định *in vivo* của kháng thể, và các đặc tính sinh miễn dịch của kháng thể. Các đặc tính hoặc các đặc trưng sinh học có thể xác định khác của kháng thể đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, ví dụ, khả năng phản ứng chéo (tức là, khả năng phản ứng chéo với các thể tương đồng không phải của người của peptit mục tiêu, hoặc với các protein hoặc mô khác nói chung), và khả năng duy trì mức biểu hiện cao của protein này trong các tế bào động vật có vú. Các đặc tính hoặc các đặc trưng nêu trên được quan sát, xác định hoặc đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở ELISA, FACS hoặc phân tích cộng hưởng plasma BIACORE, các thử nghiệm trung hòa không bị giới hạn *in vitro* hoặc *in vivo*, liên kết với thụ thể, sản sinh và/hoặc tiết xytokin hoặc yếu tố sinh trưởng, sự truyền tín hiệu, và hóa mô miễn dịch các lát cắt mô có nguồn gốc khác nhau (bao gồm người, động vật linh trưởng hoặc nguồn gốc bất kỳ khác).

"Kháng thể" để chỉ dạng bất kỳ của kháng thể có hoạt tính sinh học mong muốn. Do đó, nó được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và cụ thể là bao gồm, nhưng không bị giới hạn

ở, các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa giá (ví dụ, các kháng thể hai giá), các kháng thể được nhân tính hóa, các kháng thể đầy đủ của người, kháng thể thể khảm, và các kháng thể đơn vùng được làm tương thích với lạc đà.

"Kháng thể được phân lập" để chỉ trạng thái tinh khiết của hợp chất liên kết, và, trong trường hợp này, có nghĩa là phân tử này gần như không chứa các phân tử sinh học khác, như các axit nucleic, các protein, các lipit, các đường, hoặc các chất khác như mảnh tế bào và môi trường sinh trưởng. Thuật ngữ "(được) phân lập" không có nghĩa là hoàn toàn không có mặt các chất này hoặc không có mặt nước, chất đệm hoặc muối, trừ khi chúng có mặt với lượng sẽ gây cản trở đáng kể việc sử dụng trong thử nghiệm hoặc điều trị của các hợp chất liên kết được mô tả ở đây.

"Kháng thể đơn dòng" để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gần như đồng nhất của các kháng thể, tức là, các kháng thể bao gồm quần thể này là giống nhau chỉ khác là các đột biến có thể xuất hiện tự nhiên có thể có mặt với các lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao và hướng đích epitop kháng nguyên đơn. Ngược lại, các chế phẩm kháng thể (đa dòng) thông thường thường bao gồm một số lượng lớn các kháng thể hướng đích (hoặc đặc hiệu đối với) các epitop khác nhau. Từ bỏ nghĩa "đơn dòng" để chỉ đặc tính của kháng thể thu được từ quần thể gần như đồng nhất của các kháng thể, và không được hiểu là tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ.

"Kháng thể có chiều dài đầy đủ" để chỉ phân tử globulin miễn dịch bao gồm bốn mạch peptit khi có mặt tự nhiên, bao gồm hai chuỗi nặng (H) (chiều dài đầy đủ khoảng 50–70 kDa) và hai chuỗi nhẹ (L) (chiều dài đầy đủ khoảng 25 kDa) được liên kết với nhau bằng các liên kết disulua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là VH) và vùng hằng định chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là CH). Vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm 3 vùng CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi

nhẹ bao gồm một vùng CL. Các vùng VH và VL có thể được chia tiếp thành các vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region, CDR) có tính biến đổi cao và các vùng bảo toàn hơn được gọi là các vùng khung (framework region, FR) cách nhau bởi các CDR. Mỗi vùng VH hoặc VL bao gồm 3 CDR và 4 FR được sắp xếp theo thứ tự sau đây từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa các vùng liên kết tương tác với các kháng nguyên. Các vùng hằng định của kháng thể có thể trung gian cho sự liên kết của các globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm sự liên kết của các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào thực hiện) với thành phần thứ nhất (Clq) của hệ thống bổ thể cổ điển.

"Mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể ("kháng thể gốc") bao gồm mảnh hoặc dẫn xuất của kháng thể, thường bao gồm ít nhất một đoạn của vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi (ví dụ, một hoặc nhiều CDR) của kháng thể gốc, mà giữ được ít nhất tính đặc hiệu liên kết nào đó của kháng thể gốc. Các ví dụ về các mảnh liên kết của kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂ và Fv; kháng thể dimer; kháng thể tuyến tính; phân tử kháng thể chuỗi đơn, như sc-Fv; và kháng thể nano và kháng thể đa giá được tạo bởi các mảnh của kháng thể. Mảnh liên kết hoặc dẫn xuất thường giữ được ít nhất 10% hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó khi hoạt tính liên kết kháng nguyên này được biểu diễn trên cơ sở nồng độ mol. Tốt hơn nếu, mảnh liên kết hoặc dẫn xuất này giữ được ít nhất 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc bằng hoặc lớn hơn 100% ái lực liên kết kháng nguyên của kháng thể gốc. Cũng được dự định là mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể bao gồm các sự thay thế axit amin bảo toàn hoặc không bảo toàn mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của nó (được gọi là "các biến thể bảo toàn" hoặc "các biến thể bảo toàn chức năng" của kháng thể). Thuật ngữ "hợp chất liên kết" để chỉ cả kháng thể và mảnh liên kết của nó.

Kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" để chỉ mảnh kháng thể bao gồm vùng VH và VL của kháng thể, trong đó các vùng này có mặt trong mạch polypeptit đơn. Nói chung, polypeptit Fv còn bao gồm đoạn liên kết polypeptit giữa các vùng VH và VL mà cho phép scFv tạo thành cấu trúc mong muốn để liên kết kháng nguyên.

"Kháng thể vùng" là đoạn globulin miễn dịch có chức năng miễn dịch mà chỉ chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Trong một số trường hợp, hai hoặc nhiều vùng VH được liên kết cộng hóa trị với đoạn liên kết peptit để tạo thành kháng thể vùng hóa trị hai. Hai vùng VH của kháng thể vùng hóa trị hai có thể hướng đích các kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau.

"Kháng thể hóa trị hai" bao gồm hai vị trí liên kết kháng nguyên. Trong một số trường hợp, hai vị trí liên kết này có tính đặc hiệu kháng nguyên giống nhau. Tuy nhiên, kháng thể hóa trị hai có thể là hai giá.

"Kháng thể dime" để chỉ mảnh kháng thể nhỏ có hai vị trí liên kết kháng nguyên và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) được liên kết với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng một mạch polypeptit (VH-VL hoặc VL-VH). Bằng cách sử dụng đoạn liên kết quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai vùng trong một chuỗi, các vùng này bị ép ghép cặp với các vùng bổ sung của chuỗi còn lại để tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên.

"Kháng thể thể khảm" là kháng thể có các vùng biến đổi của kháng thể thứ nhất và các vùng hằng định của kháng thể thứ hai, trong đó các kháng thể thứ nhất và thứ hai này là từ các loài khác nhau. Thông thường, vùng biến đổi thu được từ kháng thể của động vật thử nghiệm như động vật gặm nhấm ("kháng thể gốc"), và trình tự vùng hằng định thu được từ kháng thể người, nên kháng thể thể khảm thu được ít có khả năng gây ra phản ứng miễn dịch bất lợi ở đối tượng người so với kháng thể gốc của động vật gặm nhấm.

"Kháng thể được nhân tính hóa" để chỉ dạng kháng thể chứa các trình tự từ cả các kháng thể của người và không phải của người (như chuột nhắt và chuột). Nói chung, kháng

thể được nhân tính hóa bao gồm gần như toàn bộ của ít nhất một, và thông thường là hai, vùng biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc gần như toàn bộ các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của globulin miễn dịch không phải của người và toàn bộ hoặc gần như toàn bộ các vùng khung (FR) là các vùng khung của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được nhân tính hóa có thể tùy ý bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định globulin miễn dịch của người (Fc).

“Kháng thể đầy đủ của người” để chỉ kháng thể chỉ bao gồm các trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể đầy đủ của người có thể chứa các mạch glyco của chuột nhắt nếu được tạo ra ở chuột nhắt, các tế bào của chuột nhắt hoặc các tế bào lai thu được từ các tế bào của chuột nhắt. Tương tự, “kháng thể của chuột nhắt” để chỉ kháng thể chỉ bao gồm các trình tự globulin miễn dịch của chuột nhắt. Theo cách khác, kháng thể đầy đủ của người có thể chứa các mạch glyco của chuột nếu được tạo ra ở chuột, các tế bào của chuột hoặc các tế bào lai thu được từ các tế bào của chuột. Tương tự, “kháng thể của chuột” để chỉ kháng thể chỉ bao gồm các trình tự globulin miễn dịch của chuột.

“Isotyp” của các kháng thể để chỉ các loại kháng thể (ví dụ, IgM, IgE và IgG (như IgG1, IgG2 hoặc IgG4)) được tạo bởi các gen vùng hằng định chuỗi nặng. Isotyp còn bao gồm các dạng được cải biến của một trong số các dạng này trong đó các cải biến được tạo ra để làm thay đổi chức năng của Fc, ví dụ để làm tăng hoặc làm giảm chức năng thực hiện hoặc liên kết với các thụ thể Fc.

Thuật ngữ “chất đối kháng trực PD-1” để chỉ phân tử mà ức chế sự tương tác của phối tử liên kết với trực PD-1 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó, nhờ đó loại bỏ sự rối loạn chức năng tế bào T do việc truyền tín hiệu trên trực truyền tín hiệu PD-1, kết quả của nó là khôi phục hoặc làm tăng chức năng tế bào T (ví dụ, tăng sinh, sản sinh xytokin và tiêu diệt tế bào đích). Như được sử dụng ở đây, các chất đối kháng trực PD-1 bao gồm các chất đối kháng PD-1 (ví dụ, các kháng thể kháng PD-1), các chất đối kháng

PD-L1 (ví dụ, các kháng thể kháng PD-L1), và các chất đối kháng PD-L2 (ví dụ, các kháng thể kháng PD-L2).

Thuật ngữ "chất đối kháng PD-1" để chỉ phân tử mà làm giảm, phong bế, ức chế, loại trừ hoặc cản trở sự truyền tín hiệu do sự tương tác của PD-1 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó (như PD-L1 và PD-L2). Theo một số phương án, chất đối kháng PD-1 là phân tử mà ức chế sự liên kết của PD-1 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó. Theo một số phương án cụ thể, chất đối kháng PD-1 ức chế sự liên kết của PD-1 với PD-L1 và/hoặc PD-L2. Ví dụ, chất đối kháng PD-1 bao gồm kháng thể kháng PD-1, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử dính bám miễn dịch, protein dung hợp, oligopeptit và các phân tử khác mà làm giảm, phong bế, ức chế, loại trừ hoặc cản trở sự truyền tín hiệu do sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và/hoặc PD-L2. Theo một phương án, chất đối kháng PD-1 làm giảm các tín hiệu đồng kích thích tiêu cực được trung gian bởi hoặc thông qua các protein bề mặt tế bào được biểu hiện trên các lympho bào T (sự truyền tín hiệu được trung gian qua PD-1), nhờ đó làm cho các tế bào T rối loạn chức năng trở nên rối loạn chức năng ít hơn (ví dụ, làm tăng đáp ứng của tế bào thực hiện với sự nhận biết kháng nguyên). Theo một số phương án, chất đối kháng PD-1 là kháng thể kháng PD-1. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng PD-1 là nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, hoặc kháng thể kháng PD-1 bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong WO2014/206107.

Thuật ngữ "chất đối kháng PD-L1" để chỉ phân tử mà làm giảm, phong bế, ức chế, loại trừ hoặc cản trở sự truyền tín hiệu do sự tương tác của PD-L1 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó (như PD-1 và B7-1). Theo một số phương án, đây là phân tử mà ức chế sự liên kết của PD-L1 với các phối tử liên kết của nó. Theo một khía cạnh cụ thể, chất đối kháng PD-L1 ức chế sự liên kết của PD-L1 với PD-1 và/hoặc B7-1. Theo một số phương án, chất đối kháng PD-L1 bao gồm kháng thể kháng PD-L1, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử dính bám miễn dịch, protein dung hợp, oligopeptit và các

phân tử khác mà làm giảm, phong bế, ức chế, loại trừ hoặc cản trở sự truyền tín hiệu do sự tương tác của PD-L1 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó (như PD-1 và B7-1). Theo một phương án, chất đối kháng PD-L1 làm giảm các tín hiệu đồng kính thích tiêu cực được trung gian bởi hoặc thông qua các protein bề mặt tế bào được biểu hiện trên các lympho bào T (sự truyền tín hiệu được trung gian qua PD-L1), nhờ đó làm tăng hoạt tính của các tế bào T (ví dụ, làm tăng đáp ứng của tế bào thực hiện đối với sự nhận biết kháng nguyên). Theo một số phương án, chất đối kháng PD-L1 là kháng thể kháng PD-L1. Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể kháng PD-L1 là atezolizumab, durvalumab hoặc kháng thể kháng PD-L1 bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong WO2018/153320.

Thuật ngữ "chất đối kháng PD-L2" để chỉ phân tử mà làm giảm, phong bế, ức chế, loại trừ hoặc cản trở sự truyền tín hiệu do sự tương tác của PD-L2 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó (như PD-1). Theo một số phương án, chất đối kháng PD-L2 là phân tử mà ức chế sự liên kết của PD-L2 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó. Theo một khía cạnh cụ thể, chất đối kháng PD-L2 ức chế sự liên kết của PD-L2 với PD-1. Theo một số phương án, chất đối kháng PD-L2 bao gồm kháng thể kháng PD-L2, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử dính bám miễn dịch, protein dung hợp, oligopeptit và các phân tử khác mà làm giảm, phong bế, ức chế, loại trừ hoặc cản trở sự truyền tín hiệu do sự tương tác của PD-L2 với một hoặc nhiều trong số các phối tử liên kết của nó (như PD-1). Theo một phương án, chất đối kháng liên kết PD-L2 làm giảm các tín hiệu đồng kính thích tiêu cực được trung gian bởi hoặc thông qua các protein bề mặt tế bào được biểu hiện trên các lympho bào T (sự truyền tín hiệu được trung gian qua PD-L2), nhờ đó làm tăng hoạt tính của các tế bào T (ví dụ, làm tăng đáp ứng của tế bào thực hiện đối với sự nhận biết kháng nguyên).

Thuật ngữ "etigilimab" để chỉ kháng thể giống với trình tự có mã đăng ký CAS số: 2044984-83-8, hoặc kháng thể của isotyp của nó. Theo một phương án cụ thể, etigilimab là thuộc isotyp IgG4.

Thuật ngữ "axit nucleic" hoặc "polynucleotit" để chỉ axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN) và các polyme của nó ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Nếu không được giới hạn rõ ràng, thuật ngữ này bao gồm các axit nucleic chứa các chất tương tự đã biết của các nucleotit tự nhiên có các đặc tính liên kết tương tự với các đặc tính liên kết của axit nucleic đối chiếu và được chuyển hóa theo cách tương tự với các nucleotit có trong tự nhiên (xem bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 8,278,036 cấp cho Kariko và các đồng tác giả, bằng độc quyền sáng chế này bộc lộ phân tử mARN có uridin được thay bằng giả uridin, phương pháp tổng hợp phân tử mARN, và phương pháp cung cấp protein điều trị *in vivo*). Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, trình tự axit nucleic cụ thể còn bao gồm các biến thể được biến đổi bảo toàn của nó (ví dụ, các thay thế codon thoái biến), các alen, các gen cùng nguồn, các SNP, và các trình tự bổ sung cũng như trình tự được nêu rõ. Cụ thể, các thay thế codon thoái biến có thể đạt được bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều codon được chọn (hoặc tất cả) được thay thế bằng các bazơ hỗn hợp và/hoặc các gốc deoxyinosin (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka và các đồng tác giả *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); và Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

"Cấu trúc" để chỉ phân tử polynucleotit tái tổ hợp bất kỳ (như plasmit, cosmit, virus, phân tử polynucleotit sao chép tự chủ, thể thực khuẩn, hoặc phân tử polynucleotit ADN hoặc ARN sợi đơn hoặc sợi kép, dạng thẳng hoặc hình tròn) thu được từ nguồn bất kỳ, có thể hợp nhất vào hệ gen hoặc sao chép tự chủ, và bao gồm phân tử polynucleotit trong đó một hoặc nhiều phân tử polynucleotit được liên kết theo cách hoạt động chức năng (tức là, liên kết khi hoạt động). Cấu trúc tái tổ hợp thông thường bao gồm polynucleotit theo sáng chế liên kết khi hoạt động với các trình tự điều hòa khởi mào phiên mã mà sẽ phiên mã

trực tiếp polynucleotit trong tế bào chủ. Cả gen khởi đầu khác loài và không khác loài (tức là, nội sinh) có thể được sử dụng để biểu hiện trực tiếp các axit nucleic theo sáng chế.

"Vector" để chỉ cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích biến nạp (tức là, đưa ADN khác loài vào tế bào chủ). Một loại vector là "plasmid", plasmid để chỉ vòng ADN sợi kép mà các đoạn ADN bổ sung được đưa vào có thể được nối. Một loại vector khác là vector virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào hệ gen của virus. Các vector nhất định có thể sao chép tự chủ trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có nguồn gốc sao chép từ vi khuẩn và vector episom của động vật có vú). Các vector khác (ví dụ, vector không phải episom của động vật có vú) được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với hệ gen của sinh vật chủ. Ngoài ra, một số vector nhất định có thể điều khiển sự biểu hiện của các gen liên kết khi hoạt động. Các vector này được gọi ở đây là "các vector biểu hiện".

Thuật ngữ "vector biểu hiện" như được sử dụng ở đây để chỉ phân tử axit nucleic có thể sao chép và biểu hiện gen đích khi được biến nạp, chuyển nhiễm hoặc tải nạp vào tế bào chủ. Vector biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu có thể chọn lọc kiểu hình và nguồn gốc sao chép để đảm bảo duy trì vector này và để khuếch đại trong vật chủ nếu cần.

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác hoặc rõ ràng trong ngữ cảnh, việc "hoạt hóa", "kích thích" và "xử lý" đối với tế bào hoặc thụ thể có thể có nghĩa giống nhau. Ví dụ, tế bào hoặc thụ thể được hoạt hóa, kích thích hoặc xử lý bằng phối tử. "Phối tử" bao gồm các phối tử tự nhiên và tổng hợp, như xytokin, các biến thể xytokin, các dạng tương tự, các protein đột biến, và hợp chất liên kết thu được từ các kháng thể. "Phối tử" còn bao gồm các phân tử nhỏ, như các dạng bất chức peptit của các xytokin và các dạng bất chức peptit của các kháng thể. "Hoạt hóa" có thể để chỉ việc hoạt hóa tế bào được điều hòa bằng các cơ chế bên trong và các yếu tố môi trường hoặc bên ngoài. "Đáp ứng/phản ứng", ví dụ, đáp

ứng của tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật, bao gồm các thay đổi của các đặc tính sinh hóa hoặc sinh lý (ví dụ, nồng độ, tỷ trọng, sự bám dính hoặc sự di chuyển, tốc độ biểu hiện gen, hoặc trạng thái biệt hóa trong khoang sinh học), trong đó các thay đổi này có liên quan đến việc hoạt hóa, kích thích hoặc xử lý, hoặc có liên quan đến cơ chế bên trong như lập trình di truyền.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "điều trị", "tác dụng điều trị" hoặc "việc điều trị" bệnh hoặc rối loạn cụ thể theo một phương án để chỉ việc cải thiện bệnh hoặc rối loạn (tức là, làm chậm hoặc làm ngừng hoặc làm giảm sự tiến triển của bệnh hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của nó). Theo một phương án khác, "điều trị", "tác dụng điều trị" hoặc "việc điều trị" để chỉ việc cải thiện hoặc làm giảm ít nhất một thông số của cơ thể, bao gồm các thông số của cơ thể mà có thể không được nhận ra bởi bệnh nhân. Theo một phương án khác, "điều trị", "tác dụng điều trị" hoặc "việc điều trị" để chỉ việc điều chỉnh bệnh hoặc rối loạn, về mặt thể chất (ví dụ, làm ổn định các triệu chứng có thể thấy rõ), về mặt sinh lý (ví dụ, làm ổn định thông số của cơ thể), hoặc cả hai. Nếu không được mô tả rõ ràng ở đây, nói chung, các phương pháp đánh giá tác dụng điều trị và/hoặc phòng bệnh là đã biết trong lĩnh vực này.

"Đối tượng" bao gồm người hoặc động vật không phải người bất kỳ. Thuật ngữ "động vật không phải người" bao gồm tất cả các động vật có xương sống, ví dụ, các động vật có vú và các động vật không phải động vật có vú, như các động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, mèo, ngựa, gia súc, gà, động vật lưỡng cư, và động vật bò sát. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "cyno" để chỉ khi cynomolgus.

Việc sử dụng "kết hợp với" một hoặc nhiều chất điều trị khác bao gồm sử dụng đồng thời (đồng sử dụng) và sử dụng lần lượt theo thứ tự bất kỳ.

"Lượng hữu hiệu điều trị", "liều hữu hiệu điều trị" và "lượng hữu hiệu" để chỉ lượng của kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở đây là hiệu quả trong việc phòng ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc

tình trạng hoặc sự tiến triển của bệnh hoặc tình trạng khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các dược chất điều trị khác cho tế bào, mô hoặc đối tượng. Liều hữu hiệu điều trị còn để chỉ lượng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó đủ để làm cải thiện các triệu chứng, ví dụ, lượng để điều trị, chữa bệnh, phòng ngừa hoặc cải thiện tình trạng liên quan hoặc thúc đẩy việc điều trị, chữa bệnh, phòng ngừa hoặc cải thiện tình trạng này. Khi thành phần hoạt tính được sử dụng cho đối tượng một mình, liều hữu hiệu điều trị để chỉ lượng của thành phần này. Trong trường hợp sử dụng kết hợp, liều hữu hiệu điều trị để chỉ lượng kết hợp của các thành phần hoạt tính mà tạo ra tác dụng điều trị, bất kể là các thành phần hoạt tính này được sử dụng kết hợp, lần lượt hay đồng thời. Lượng hữu hiệu của chất điều trị sẽ dẫn đến sự tăng chỉ số hoặc thông số chẩn đoán ít nhất là 10%, thường là ít nhất 20%, tốt hơn là ít nhất khoảng 30%, tốt hơn nữa là ít nhất 40%, và tốt hơn nhất là ít nhất 50%.

"Bệnh ung thư" và "thuộc bệnh ung thư" để chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở các động vật có vú mà thông thường được đặc trưng bởi sự sinh trưởng tế bào không được điều hòa. Được bao gồm trong định nghĩa này là các bệnh ung thư lành tính và ác tính cũng như khối u không hoạt động hoặc các khối u di căn nhỏ. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh caxinom, u lympho, u nguyên bào, bệnh sacom và bệnh bạch cầu. Các ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư này bao gồm bệnh caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư phổi (bao gồm bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh caxinom tuyến của phổi và bệnh caxinom tế bào vảy của phổi), bệnh ung thư phúc mạc, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư dạ dày (bao gồm bệnh ung thư dạ dày ruột), bệnh ung thư tụy, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư bàng quang, bệnh u gan, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung hoặc bệnh ung thư tử cung, bệnh caxinom tuyến nước bọt, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư âm hộ, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư gan, và các dạng khác nhau

của các bệnh ung thư đầu và cổ, cũng như u lympho tế bào B (bao gồm u lympho không Hodgkin (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) cấp độ thấp/dạng nang, NHL lympho bào nhỏ (small lymphocytic, SL), NHL cấp độ trung bình/dạng nang, NHL lan tỏa cấp độ trung bình, NHL nguyên bào miễn dịch cấp độ cao, NHL nguyên bào lympho cấp độ cao, NHL tế bào nhỏ không phân cắt cấp độ cao, NHL kích thước lớn, u lympho tế bào vỏ, u lympho liên quan đến AIDS, và macroglobulin huyết Waldenstrom), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia, CLL), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (acute lymphoblastic leukemia, ALL), bệnh bạch cầu tế bào lông, bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính, rối loạn tăng sinh lympho bào sau cấy ghép (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD), và tăng sinh mạch bất thường liên quan đến hội chứng thần kinh da ngoại bì (phakomatoses), phù (như liên quan đến các khối u não) và hội chứng Meigs.

Kháng thể kháng TIGIT và tạo ra kháng thể này

Thuật ngữ "kháng thể kháng TIGIT", "kháng TIGIT", "kháng thể TIGIT " hoặc "kháng thể liên kết TIGIT" để chỉ kháng thể có thể liên kết với protein TIGIT hoặc mảnh của nó với ái lực đủ để cho kháng thể này có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán và/hoặc điều trị hướng đích TIGIT.

Phương pháp thích hợp bất kỳ để tạo ra các kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể được bộc lộ ở đây. TIGIT ở dạng thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch (kháng nguyên) để tạo kháng thể. Bằng cách ví dụ và không làm giới hạn, biến thể TIGIT bất kỳ hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Theo một số phương án, các tế bào lai sản sinh ra các kháng thể đơn dòng của chuột nhất kháng TIGIT của người có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các kỹ thuật tế bào lai ban đầu được phát triển bởi Kohler và các đồng tác giả (1975) (*Nature* 256:495-497). Tốt hơn nữa, các tế bào lách của chuột nhất được phân lập và dung hợp với dòng tế bào u tủy của

chuột nhất bằng cách sử dụng PEG hoặc bằng cách dung hợp bằng điện theo các cách chuẩn. Sau đó, các tế bào lai tiết ra kháng thể có hoạt tính ức chế TIGIT được sàng lọc. Trình tự ADN của vùng biến đổi globulin miễn dịch của các tế bào lai được bộc lộ ở đây có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp PCR trên cơ sở đoạn môi thoái hóa.

Các kháng thể thu được từ động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhất) có thể gây ra tính miễn dịch không mong muốn của các kháng thể khi được sử dụng làm các chất điều trị *in vivo*. Việc sử dụng nhắc lại các kháng thể này gây ra phản ứng miễn dịch trong cơ thể người đối với các kháng thể điều trị. Các phản ứng miễn dịch này dẫn đến ít nhất là sự mất hiệu quả điều trị và, đối với các trường hợp nặng, phản ứng dị ứng có khả năng gây tử vong. Một phương pháp làm giảm tính miễn dịch của các kháng thể của động vật gặm nhấm bao gồm tạo ra kháng thể thể khảm, trong đó vùng biến đổi của chuột nhất được dung hợp với vùng hằng định của người (Liu et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43). Tuy nhiên, sự bảo toàn vùng biến đổi nguyên vẹn của động vật gặm nhấm trong kháng thể thể khảm có thể vẫn gây ra tính miễn dịch có hại ở các bệnh nhân. Việc ghép các vòng của vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của vùng biến đổi của động vật gặm nhấm vào vùng khung của người (tức là, nhân tính hóa) đã được sử dụng để làm giảm đến mức tối thiểu hơn nữa các trình tự của động vật gặm nhấm (Jones et al., (1986) *Nature* 321:522; Verhoeven et al., (1988) *Science* 239:1534).

Theo một số phương án, các kháng thể thể khảm hoặc được nhân tính hóa được bộc lộ ở đây có thể được điều chế dựa trên các trình tự của các kháng thể đơn dòng của tế bào lai chuột nhất thu được. ADN mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể thu được từ tế bào lai của chuột nhất cần quan tâm và được thiết kế để bao gồm các trình tự globulin miễn dịch không phải của chuột nhất (ví dụ, người) bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn.

Theo một số phương án, đối với các kháng thể TIGIT thể khảm được mô tả ở đây, các chuỗi nặng thể khảm và các chuỗi nhẹ thể khảm có thể thu được bằng cách liên kết khi

hoạt động các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có nguồn gốc tế bào lai với các vùng hằng định của IgG của người bằng cách sử dụng lần lượt các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem patent Mỹ số 4,816,567 cấp cho Cabilly và các đồng tác giả). Theo một số phương án, các kháng thể thể khảm được bộc lộ ở đây bao gồm các vùng hằng định mà có thể được chọn từ loại bất kỳ của IgG của người, như IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4, tốt hơn là IgG4.

Theo một số phương án, các kháng thể TIGIT thể khảm được bộc lộ ở đây có thể thu được bằng cách "trộn và ghép cặp" plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ thể khảm với plasmit biểu hiện chuỗi nặng thể khảm để chuyển nhiễm các tế bào biểu hiện. Sự liên kết với TIGIT của các kháng thể "được trộn và ghép cặp" này có thể được phân tích bằng cách sử dụng các thử nghiệm liên kết nêu trên và các thử nghiệm liên kết thông thường khác (ví dụ, ELISA).

Ranh giới chính xác của trình tự axit amin của các CDR vùng biến đổi của các kháng thể được bộc lộ ở đây có thể được xác định bằng cách sử dụng cách bất kỳ trong số các cách đã biết rõ, bao gồm Chothia dựa trên cấu trúc ba chiều của các kháng thể và cấu trúc của các vòng CDR (Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877-883; Al-Lazikani et al. "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", *Journal of Molecular Biology*, 273:927-948 (1997)), Kabat dựa trên sự biến đổi trình tự kháng thể (Kabat et al., *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 4th edition, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), International Immunogenetics database (IMGT) (1999 *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212), và định nghĩa CDR theo North dựa trên sự phân cụm lan truyền ái lực bằng cách sử dụng một lượng lớn các cấu trúc tinh thể. Ranh giới của các CDR của các kháng thể được bộc lộ ở đây có thể được xác định bởi người có trình độ trong lĩnh vực này theo cách bất kỳ (ví dụ, các hệ thống gán hoặc các tổ hợp khác nhau) trong lĩnh vực này.

Cần lưu ý rằng ranh giới của các CDR của các vùng biến đổi của cùng một kháng thể thu được dựa trên các hệ thống gán khác nhau có thể khác nhau. Tức là, các trình tự CDR của các vùng biến đổi của cùng một kháng thể được định nghĩa theo các hệ thống gán khác nhau là khác nhau. Do đó, khi đi đến định nghĩa kháng thể với trình tự CDR cụ thể được định nghĩa theo sáng chế, phạm vi của kháng thể còn bao gồm các kháng thể mà các trình tự vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự CDR cụ thể nhưng ranh giới CDR của chúng khác với các ranh giới CDR cụ thể được định nghĩa trong sáng chế do áp dụng các cách khác nhau (ví dụ, các hệ thống gán hoặc tổ hợp khác nhau).

Các kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau (tức là, vị trí liên kết khác nhau đối với các kháng nguyên khác nhau) có các CDR khác nhau. Tuy nhiên, mặc dù các CDR thay đổi từ kháng thể này sang kháng thể khác, chỉ một số lượng giới hạn các vị trí axit amin trong CDR tham gia trực tiếp vào sự liên kết kháng nguyên. Vùng chồng nhau nhỏ nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng ít nhất hai trong số các phương pháp Kabat, Chothia, AbM, Contact và North, nhờ đó tạo ra "đơn vị liên kết nhỏ nhất" để liên kết kháng nguyên. Đơn vị liên kết nhỏ nhất có thể là phần nhỏ của CDR. Như sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này, các gốc trong phần còn lại của các trình tự CDR có thể được xác định bằng cấu trúc kháng thể và sự gấp cuộn protein. Do đó, các biến thể của bất kỳ trong số các CDR được nêu ở đây cũng được dự định bởi sáng chế. Ví dụ, trong một biến thể của một CDR, gốc axit amin của đơn vị liên kết nhỏ nhất có thể vẫn không thay đổi, trong khi các gốc CDR còn lại được định nghĩa theo Kabat hoặc Chothia có thể được thay thế bằng các gốc axit amin bảo toàn.

Đối với các kháng thể được nhân tính hóa được mô tả ở đây, các vùng CDR của chuột nhất có thể được chèn vào các vùng khung dòng mầm của người bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Xem patent Mỹ số 5,225,539 cấp cho Winter và các đồng tác giả và các patent Mỹ số 5,530,101, 5,585,089, 5,693,762 và 6,180,370 cấp cho Queen và các đồng tác giả. Nói tóm lại, các gen IgG dòng mầm của người tương đồng

với trình tự cADN của kháng thể của các vùng biến đổi của chuột nhất được lấy trong cơ sở dữ liệu NCBI về gen globulin miễn dịch của người (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) bởi tác giả sáng chế, và về nguyên tắc, việc nhân tính hóa đạt được bằng cách ghép các CDR được chọn. Tuy nhiên, sự trao đổi vòng CDR vẫn không tạo ra một cách đồng nhất kháng thể có các đặc tính liên kết giống như kháng thể ban đầu. Trong các kháng thể được nhân tính hóa, các thay đổi của các gốc vùng khung (FR) (các gốc tham gia vào nền đỡ vòng CDR) thường là cần thiết để duy trì ái lực liên kết kháng nguyên. Nói tóm lại, quá trình nhân tính hóa bao gồm các bước sau đây: A. so sánh trình tự gen của mỗi kháng thể ứng viên có trình tự gen của kháng thể phôi người để tìm ra trình tự có độ tương đồng cao; B. phân tích và kiểm tra ái lực HLA-DR, và chọn trình tự vùng khung của phôi người có ái lực thấp; và C. phân tích các trình tự axit amin vùng khung của các vùng biến đổi và chu vi của chúng bằng cách sử dụng công nghệ mô phỏng bằng máy tính và áp dụng việc lắp ghép phân tử để nghiên cứu các cách tổ hợp không gian và lập thể của chúng. Các axit amin chính mà có thể tương tác với TIGIT và duy trì vùng khung không gian trong trình tự gen của các kháng thể ứng viên được phân tích bằng cách tính lực tĩnh điện, lực Van der Waals, độ ưa nước và độ kỵ nước, và giá trị entropy, và được ghép với vùng khung của gen phôi người được chọn. Các vị trí axit amin của các vùng khung mà phải được giữ lại được ánh xạ. Sau đó, các kháng thể được nhân tính hóa được tổng hợp.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở đây bao gồm các kháng thể có trình tự axit amin đã được đột biến bằng cách xóa, chèn hoặc thay thế axit amin nhưng vẫn có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các kháng thể nêu trên (cụ thể là trong các vùng CDR được mô tả trong các trình tự nêu trên). Theo một số phương án, khi so sánh với các vùng CDR được mô tả trong trình tự cụ thể theo sáng chế, các kháng

thể được bộc lộ ở đây không có nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 đột biến axit amin (xóa, chèn hoặc thay thế) trong các vùng CDR.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm 1 đến 3 vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng được chọn từ vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 1 và 11, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 2 và 12, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 3 và 13.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm 1 đến 3 vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ được chọn từ các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó LCDR1 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc 16, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc 17, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8 hoặc 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 và vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3

và các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, HCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, LCDR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) này bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 4, 14, 21, 23, 25, 27 và 29.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) này bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 9, 19, 22, 24, 26, 28 và 30.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 4, 14, 21, 23, 25, 27, và 29; và

VL bao gồm trình tự axit amin giống với hoặc có mức độ giống ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 9, 19, 22, 24, 26, 28 và 30.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi

nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 25, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 28.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 29, và VL bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây là kháng thể của chuột nhắt, kháng thể thể khảm, kháng thể được nhân tính hóa hoặc kháng thể đầy đủ của người.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây là kháng thể đầy đủ, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể Fab, kháng thể Fab', kháng thể (Fab')₂ hoặc kháng thể hai giá (đa giá).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây là thuộc loại IgG bất kỳ, như IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được tạo ra ở đây, do đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm các trình tự vùng Fc của người (ví dụ, các vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) mà bao gồm cải biến axit amin (ví dụ, sự thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo một số phương án, các kháng thể được cải biến bằng cách thao tác xystein có thể cần được tạo ra, như "sulfo-MAb", trong đó một hoặc nhiều gốc của các kháng thể được thay thế bằng các gốc xystein.

Theo một số phương án, các kháng thể được đề xuất ở đây có thể được cải biến thêm để chứa các gốc khác không phải protein đã biết trong lĩnh vực này và dễ kiểm. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các polyme tan trong nước. Các ví dụ không làm giới hạn về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme etylen glycol/propylen glycol, carboxymetyl xenluloza, glucan, rượu polyvinyl, polyvinylpyrrolidon, poly-1,3-dioxan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, poly axit amin (polyme đồng nhất hoặc copolyme ngẫu nhiên), và glucan hoặc poly(n-vinylpyrrolidon)polyetylen glycol, polyme đồng nhất propylen glycol, copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, polyol polyoxyetyl hóa (như glyxerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có một hoặc nhiều đặc tính sau đây: (1) liên kết đặc hiệu với protein TIGIT của người; (2) phản ứng chéo với TIGIT của khỉ cynomolgus ; (3) ức chế sự liên kết của TIGIT với PVR và/hoặc PVRL2; (4) ức chế sự truyền tín hiệu hoạt tính trung gian bởi TIGIT; (5) thúc đẩy sự hoạt hóa của các chất đối kháng trực PD-1 đối với các tế bào T; và (6) ức chế đáng kể sự phát triển của khối u khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với chất đối kháng trực PD-1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có thể liên kết đặc hiệu với TIGIT có KD bằng khoảng 1nM hoặc ái lực cao hơn (ví dụ, 1 nM–2 pM, 1nM, 100 pM, 10 pM, hoặc 2 pM). Theo một phương án, kháng thể được bộc lộ ở đây mà liên kết đặc hiệu với TIGIT của người còn phản ứng chéo với TIGIT của khỉ cynomolgus. Như được sử dụng ở đây, "khả năng phản ứng chéo" để chỉ khả năng của kháng thể phản ứng với các protein tương đồng từ các loài khác. Việc kháng thể có liên kết đặc hiệu với TIGIT của người hay không có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ về các phương pháp thử nghiệm để xác định ái lực liên kết đã biết trong lĩnh vực này bao gồm cộng hưởng plassmon bề mặt (ví dụ, BIACORE) hoặc các kỹ thuật tương tự (ví dụ, ForteBio).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây có hoạt tính ức chế, ví dụ, ức chế sự biểu hiện (ví dụ, sự biểu hiện của TIGIT trên bề mặt tế bào), hoạt tính và/hoặc sự truyền tín hiệu TIGIT, hoặc gây cản trở sự tương tác giữa TIGIT và PVR và/hoặc PVRL2. Kháng thể kháng TIGIT được đề xuất ở đây làm giảm hoặc điều chỉnh một phần hoặc hoàn toàn sự biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi liên kết với hoặc tương tác với TIGIT (ví dụ, TIGIT của người). Chức năng sinh học của TIGIT được giảm hoặc điều chỉnh hoàn toàn, đáng kể hoặc một phần khi tương tác giữa các kháng thể và polypeptit và/hoặc peptit TIGIT của người. Kháng thể

được mô tả ở đây được cho là có thể ức chế hoàn toàn sự biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT được giảm ít nhất 95% (ví dụ, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%) khi có mặt kháng thể so với mức biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi không có mặt sự tương tác (ví dụ, liên kết) với kháng thể. Kháng thể kháng TIGIT được mô tả ở đây được cho là có thể ức chế đáng kể sự biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT được giảm ít nhất 50% (ví dụ, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90%) khi có mặt kháng thể TIGIT so với mức biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi không có mặt liên kết với kháng thể TIGIT. Kháng thể được mô tả ở đây được cho là có thể ức chế một phần sự biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi mức biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT được giảm ít hơn 95% (ví dụ, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% hoặc 90%) khi có mặt của kháng thể so với mức biểu hiện hoặc hoạt tính của TIGIT khi không có mặt sự tương tác (ví dụ, sự liên kết) với kháng thể.

Sự biểu hiện của kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector biểu hiện và phương pháp tạo ra bất kỳ trong số các kháng thể hoặc các mảnh của nó được bộc lộ ở đây, và phương pháp bao gồm: nuôi cấy tế bào chủ, và tinh chế và phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT nêu trên hoặc các mảnh của nó. Axit nucleic này có thể bao gồm axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể, hoặc axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể.

Theo một phương án, một hoặc nhiều vector bao gồm axit nucleic được đề xuất. Theo một phương án, vector này là vector biểu hiện.

Sáng chế đề xuất tế bào chủ của động vật có vú để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp được bộc lộ ở đây, chúng bao gồm một số dòng tế bào bất tử có sẵn từ bộ sưu tập nuôi cấy của Mỹ (American Type Culture Collection, ATCC). Các tế bào này bao gồm, cụ thể, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary, CHO), các tế bào NS0, SP2/0, các tế bào HeLa, các tế bào thận chuột túi má con (baby hamster kidney, BHK), tế bào thận khỉ (monkey kidney cell, COS), tế bào caxinom tế bào gan người, tế bào A549, tế bào 293T, và nhiều dòng tế bào khác. Các tế bào chủ của động vật có vú bao gồm người, chuột nhắt, chuột, chó, khỉ, lợn, dê, bò, ngựa và chuột túi má. Các dòng tế bào được ưu tiên đặc biệt được chọn bằng cách xác định dòng tế bào nào có mức biểu hiện cao.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể kháng TIGIT, trong đó phương pháp này bao gồm: đưa vector biểu hiện vào tế bào chủ động vật có vú, và nuôi cấy tế bào chủ này trong một khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ hoặc tốt hơn nữa là cho phép tiết kháng thể vào môi trường trong đó tế bào chủ được phát triển, nhờ đó tạo ra kháng thể. Kháng thể này có thể được tách ra khỏi môi trường bằng cách sử dụng các phương pháp tinh chế protein chuẩn.

Có thể là các kháng thể được biểu hiện bởi các dòng tế bào khác nhau hoặc ở các động vật chuyển gen có sự glycosyl hóa khác nhau khác. Tuy nhiên, tất cả các kháng thể được mã hóa bởi các phân tử axit nucleic được đề xuất ở đây hoặc bao gồm các trình tự axit amin được đề xuất ở đây là các phần không thể thiếu theo sáng chế, bất kể sự glycosyl hóa của kháng thể. Tương tự, theo một số phương án nhất định, các kháng thể không fucosyl hóa là có lợi do chúng thường có hiệu quả *in vitro* và *in vivo* mạnh hơn so với các kháng thể fucosyl hóa của chúng, và không thể có tính sinh miễn dịch do các cấu trúc glycan của chúng là các thành phần thông thường của IgG huyết thanh tự nhiên của người.

Dược phẩm và chế phẩm dược

Sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với TIGIT. Cần hiểu rằng các kháng thể

kháng TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm chứa nó được đề xuất ở đây có thể được hợp nhất vào chất mang thích hợp, tá dược và các chất phản ứng khác trong chế phẩm để sử dụng kết hợp, do đó tạo ra đặc tính di chuyển, phân phối, dung nạp v.v.. được cải thiện.

Thuật ngữ "chế phẩm" để chỉ chế phẩm cho phép hoạt tính sinh học của các thành phần hoạt tính chứa trong đó có mặt ở dạng hữu hiệu và không chứa các thành phần bổ sung có độc tính không thích hợp cho đối tượng mà chế phẩm này được sử dụng.

Chế phẩm được bao gồm kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây, tốt hơn nếu ở dạng dung dịch nước hoặc chế phẩm đông khô, có thể được điều chế bằng cách trộn kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở đây có độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều tá dược được dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)).

Dược phẩm hoặc chế phẩm được bộc lộ ở đây có thể còn bao gồm một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung cần thiết cho chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn nếu các thành phần hoạt tính có hoạt tính bổ sung không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Theo một số phương án, các thành phần hoạt tính bổ sung là các chất hóa điều trị, các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, các chất ức chế sinh trưởng, các chất kháng sinh hoặc các chất kháng u hoặc kháng ung thư đã biết khác nhau, chúng thích hợp là có mặt kết hợp với lượng hữu hiệu cho mục đích đã định. Theo một số phương án, dược phẩm được bộc lộ ở đây còn bao gồm chế phẩm của polynucleotit mã hóa kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Sử dụng các kháng thể trong y tế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc mảnh

liên kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm để tạo ra hoạt tính kháng u trung gian bởi tế bào T hoặc tế bào NK hoặc làm tăng phản ứng miễn dịch của cơ thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm để điều trị hoặc làm chậm các bệnh ung thư khác nhau, các bệnh liên quan đến miễn dịch và các bệnh rối loạn chức năng tế bào T.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc đồng sử dụng lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều liệu pháp (ví dụ, cách điều trị và/hoặc chất điều trị bổ sung) cho đối tượng. Theo một số phương án, liệu pháp này bao gồm điều trị phẫu thuật và/hoặc xạ trị. Theo một số phương án, chất điều trị bổ sung được chọn từ chất hóa trị liệu và chất đối kháng trực PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-L2).

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây để sản xuất hoặc bào chế thuốc để điều trị các bệnh hoặc rối loạn liên quan như nêu trên. Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng TIGIT hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây và chất đối kháng trực PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-L2) để sản xuất hoặc bào chế thuốc để điều trị các bệnh hoặc rối loạn liên quan như nêu trên.

Theo một số phương án nhất định, các phương pháp và việc sử dụng được mô tả ở đây còn bao gồm: cho đối tượng sử dụng một hoặc nhiều liệu pháp (ví dụ, cách điều trị và/hoặc chất điều trị bổ sung). Kháng thể được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất điều trị khác trong một liệu pháp. Ví dụ, kháng thể này có thể được đồng sử dụng với ít nhất một chất điều trị bổ sung.

Phương pháp chẩn đoán và phát hiện

Theo một số phương án nhất định, bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đề xuất ở đây có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của TIGIT trong mẫu sinh học. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng ở đây bao gồm phát hiện định tính và định lượng. Theo một số phương án nhất định, mẫu sinh học là máu, huyết thanh, hoặc các mẫu chất lỏng khác có nguồn gốc sinh học. Theo một số phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô.

Sáng chế bao gồm tổ hợp bất kỳ của các phương án cụ thể được mô tả. Các phương án khác của sáng chế và phạm vi áp dụng đầy đủ sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết được đưa ra dưới đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết và các ví dụ cụ thể, mặc dù chỉ ra các phương án được ưu tiên của sáng chế, được đưa ra chỉ bằng cách minh họa, do các thay đổi và cải biến khác nhau trong phạm vi của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này từ phần mô tả chi tiết này. Tất cả các công bố, bằng độc quyền sáng chế và đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế được nêu ở đây, bao gồm các trích dẫn, được viện dẫn toàn bộ ở đây đối với tất cả các mục đích.

Các ký hiệu viết tắt sau đây được sử dụng trong đơn này:

RLU: đơn vị phát quang tương đối;

BSA: albumin huyết thanh bò.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Protein tái tổ hợp hTIGIT-ECD-mFc

Trình tự cADN mã hóa vùng ngoại bào TIGIT được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR thông thường, và đoạn được khuếch đại được tạo dòng vào hệ plasmid biểu hiện của tế bào có nhân chuẩn được thiết kế tự sinh (MX2-mFc, chứa vùng Fc của IgG2a của chuột nhắt) bằng cách sử dụng kỹ thuật tạo dòng thông thường, trong đó plasmid biểu hiện của tế bào có nhân chuẩn chứa hệ sàng lọc puromycin, sao cho plasmid biểu hiện protein dung hợp tái

tổ hợp hTIGIT-ECD-mFC được tạo ra. Protein tái tổ hợp hTIGIT-ECD-mFC được biểu hiện và tinh chế bằng cách sử dụng tế bào biểu hiện 293E.

Trình tự axit amin của vùng ngoại bào TIGIT của người (hTIGIT-ECD) là các axit amin ở các vị trí 24–155 có mã số lưu giữ NCBI NM_173799.4, và được sử dụng để phát hiện chất sinh miễn dịch và hoạt tính của các kháng thể được bộc lộ ở đây.

Trình tự của vùng ngoại bào TIGIT của khỉ cynomolgus (cynoTIGIT-ECD) có mã số lưu giữ NCBI XP_015300912.1, và được sử dụng để phát hiện hoạt tính của các kháng thể được bộc lộ ở đây.

Ví dụ 2. Điều chế và sàng lọc các kháng thể của tế bào lai

Các kháng thể của tế bào lai được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Tóm lại, protein tái tổ hợp hTIGIT-ECD-mFC để làm kháng nguyên được trộn với lượng tương đương của chất phụ trợ miễn dịch, và 5 con chuột Balb/c cái 6 tuần tuổi được gây miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch lần đầu, việc gây miễn dịch tăng cường được thực hiện một lần vào tuần thứ ba sau khi gây miễn dịch lần đầu và sau đó cứ hai tuần một lần, tổng cộng 6 lần gây miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch tăng cường lần cuối cùng, chuột có độ chuẩn kháng thể kháng hTIGIT cao trong huyết thanh được chọn làm nguồn các tế bào miễn dịch đối với thử nghiệm dung hợp tế bào. Các tế bào lách được phân lập bằng cách sử dụng kỹ thuật tế bào lai chuẩn và được dung hợp với các tế bào của dòng tế bào u tủy chuột nhắt SP2/0 (ATCC) theo quy trình tạo lỗ bằng điện thông thường (xem sổ tay thiết bị tạo lỗ bằng điện BTX). Các tế bào được dung hợp này được tái tạo hỗn dịch trong môi trường DMEM đầy đủ (Corning) chứa HAT và được cấy đều trong đĩa có 384 lỗ chứa các tế bào nuôi của chuột nhắt.

Dịch nổi bề mặt được tiết bởi tế bào lai đơn dòng được xác định dựa trên các đặc tính liên kết kháng thể/kháng nguyên mong muốn ban đầu (như tính đặc hiệu liên kết đối với TIGIT, khả năng phong bế sự liên kết của TIGIT với PVR và ngăn chặn hoạt tính sinh học

trung gian bởi TIGIT), với các kháng thể trong dịch nổi bề mặt được tiết bởi các tế bào lai 2O18 và 23O20 được sử dụng để xác định thêm tính chất.

Ví dụ 3: Tác dụng của các kháng thể của chuột nhất kháng TIGIT đối với hoạt tính của các tế bào T

Sự hoạt hóa tế bào T đạt được bằng cách kích thích các thụ thể tế bào T (các TCR) nhận biết các peptit đặc hiệu được trình diện bởi các protein phức chất hòa hợp mô chủ yếu nhóm I hoặc nhóm II trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC). Sau đó, các TCR được hoạt hóa khơi mào tăng thác các sự kiện truyền tín hiệu mà có thể được theo dõi bởi các gen thông báo được điều khiển bởi các yếu tố phiên mã (như protein hoạt hóa 1 (activator-protein-1, AP-1), yếu tố nhân của các tế bào T được hoạt hóa (nuclear factor of activated T cell, NFAT), hoặc yếu tố nhân chất tăng cường chuỗi nhẹ κ của các tế bào B được hoạt hóa (NF κ b)). Các đáp ứng của tế bào T được điều chỉnh bởi chế phẩm này hoặc cảm ứng sự tham gia của các đồng thụ thể được biểu hiện trên các tế bào T. Protein gây chết tế bào theo chương trình (PD1) và TIGIT là các chất điều hòa âm của hoạt tính tế bào T. PD-1 và TIGIT tương tác với các phối tử của chúng (PD-L1) và PVR (và/hoặc PVRL2) tương ứng được biểu hiện trên các tế bào đích bao gồm APC hoặc các tế bào ung thư, điều này dẫn đến sự truyền tín hiệu ức chế bằng cách huy động phosphatase tới thể tín hiệu TCR, nhờ đó tạo ra sự truyền tín hiệu ức chế dương. Sự truyền tín hiệu tế bào T được gây ra bởi sự tương tác giữa APC và các tế bào T được xác định bằng cách thiết kế hai dòng tế bào ổn định, là tế bào Jurkat (Jurkat/NFAT-Luc/hPD-1-hTIGIT) và tế bào CHO (CHO/hPD-L1-hPVRL2).

Cụ thể, các tế bào CHO biểu hiện ổn định hPD-L1/hPVRL2 được cấy vào đĩa có 96 lỗ ở mật độ 5×10^4 tế bào/lỗ và được ủ qua đêm ở 37°C và 7% CO_2 . Sau khi dịch nổi bề mặt tế bào được loại bỏ, 40 μl dung dịch pha loãng kháng thể kháng TIGIT (2O18, 23O20 hoặc MBSA43) (nồng độ ban đầu 10 $\mu\text{g/ml}$, chuẩn độ 3 lần) được bổ sung vào mỗi lỗ, và/hoặc 40 μl JS001 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) được bổ sung trước. 40 μl tế bào có gen thông báo Jurkat

có thể biểu hiện liên tục hPD-1/hTIGIT/NFAT-luxiferaza được bổ sung, với mật độ tế bào tổng cộng là 1×10^5 . Sau 6 giờ ủ ở 37°C và 7% CO_2 , chất phản ứng luxiferaza được bổ sung, và giá trị độ phát sáng được phát hiện bằng bộ phận đọc vi đĩa.

MBSA43 là kháng thể kháng TIGIT của người có bán trên thị trường là sản phẩm của ThermoFisher (Cat. No.: 16-9500-82).

JS001 là kháng thể kháng PD-1 (CN201310258289, kháng thể 38) được phát triển độc lập bởi Junshi Biosciences.

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng GraphPad Prism 5 để tính các giá trị EC_{50} để hoạt hóa các tế bào T bằng các kháng thể TIGIT và nhờ đó đánh giá tác dụng của các kháng thể kháng TIGIT một mình hoặc kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (JS001) đối với hoạt tính của các tế bào T. Xem Fig.1 và Bảng 1 dưới đây để biết chi tiết.

Bảng 1. Tác dụng của các kháng thể kháng TIGIT một mình hoặc kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (JS001) đối với hoạt tính của các tế bào T

Nhóm	Kháng thể	Mức độ thay đổi RLU, lần	EC_{50}
Nhóm 1	2O18 +JS001	3,3	65,47
Nhóm 2	2O18 một mình	6,3	51,78
Nhóm 3	23O20+JS001	2,3	180,9
Nhóm 4	23O20 một mình	2,3	195,5
Nhóm 5	MBSA43+JS001	2,2	164,3
Nhóm 6	MBSA43 một mình	2,2	179,7
Nhóm 7	mIgG+JS001	1,2	~ 11641
Nhóm 8	mIgG một mình	1,2	~ 13058

mIgG: kháng thể đối chứng âm.

Các kết quả này cho thấy rằng:

(1) các kháng thể 2O18 và 23O20 có thể thúc đẩy đáng kể hoạt tính của các tế bào T;

(2) tác dụng của kháng thể 2O18 trong việc hoạt hóa các tế bào T là tốt hơn đáng kể so với tác dụng của kháng thể MBSA43 có bán trên thị trường;

(3) các kháng thể 2O18, 23O20 và MBSA43 đều có tác dụng hiệp đồng đối với sự hoạt hóa tế bào T khi được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng PD-1 JS001.

Ví dụ 4: Thiết kế và biểu hiện các kháng thể thể khảm

Các trình tự ADN của các vùng biến đổi của kháng thể được biểu hiện bởi các tế bào lai 2O18 và 23O20 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên PCR đoạn môi thoái hóa.

Các trình tự nucleotit và các trình tự axit amin của 2O18 và 23O20 được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của các kháng thể của tế bào lai

Các kháng thể của tế bào lai	Vùng biến đổi	Trình tự axit amin	Trình tự nucleotit
2O18	VH	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5
	VL	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
23O20	VH	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
	VL	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20

Đoạn Fc vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 người (SEQ ID NO: 35) và vùng hằng định chuỗi nhẹ được tạo dòng từ các tế bào máu của người (Beijing Blood Institute) và được nối với plasmit pCDNA3.1 để thao tác. Các đoạn trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên được tổng hợp bằng GenScript. Các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được cắt bằng Bspq I và sau đó được nối với plasmit pCDNA3.1 đã được thao tác tương ứng. Các plasmit biểu hiện của các chuỗi nặng thể khảm (ch-HC) hoặc các chuỗi nhẹ thể khảm (ch-LC) của IgG4 được xác nhận bằng cách giải trình tự. Các plasmit biểu hiện khác nhau nêu trên của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thể khảm được ghép cặp để chuyển nhiễm các tế bào biểu hiện, để tạo ra 4 kháng thể thể khảm được đánh số từ ch1 đến ch4 (xem bảng 3).

Bảng 3. Các nguồn chuỗi nhẹ /chuỗi nặng của kháng thể thể khảm

HC LC	2O18-ch-HC	23O20-ch-HC
2O18-ch-LC	ch1	ch3
23O20-ch-LC	ch2	ch4

Ví dụ 5: Phát hiện hoạt tính liên kết của các kháng thể thể khảm kháng TIGIT với kháng nguyên TIGIT bằng ELISA

1 $\mu\text{g/ml}$ TIGIT của người-ECD-mFc được cố định trên đĩa có 96 lỗ và ủ trong 60–90 phút ở nhiệt độ không đổi 37°C . Sau đó, dung dịch trong các lỗ được loại bỏ, và các lỗ được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa và được khóa trong 60 phút bằng PBS chứa 2% BSA. Sau khi đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa, các dung dịch pha loãng kháng thể thể khảm ở các nồng độ khác nhau được bổ sung. Các kháng thể này được ủ ở 37°C trong 60 phút, và sau đó đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa và được bổ sung kháng-IgG4-HRP được pha loãng 5000 lần. Hệ này được ủ ở 37°C trong 30 phút, và sau đó được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa và được bổ sung 100 μl cơ chất TMB để hiện màu. Hệ này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, và sau đó phản ứng được kết thúc bằng 100 μl dung dịch axit clohydric 2M. Năng suất hấp thụ ở 450nm được đo bằng bộ phận đọc đĩa.

Như được thể hiện trên Fig.2, các kháng thể thể khảm ch1 và ch4 liên kết với TIGIT của người với độ đặc hiệu cao hơn, và các giá trị EC_{50} của các kháng thể thể khảm này là 32,49ng/ml và 8,932ng/ml tương ứng.

Ví dụ 6: Tác dụng của các kháng thể thể khảm kháng TIGIT đối với hoạt tính của các tế bào T

Theo nguyên lý thử nghiệm và phương pháp như được mô tả trong phương án 3, tác dụng của các kháng thể thể khảm ch1 và ch4 đối với hoạt tính của các tế bào T được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm gen thông báo luxiferaza (thử nghiệm luxiferaza).

Như được thể hiện trên Fig.3, các kháng thể thể khảm ch1 và ch4 có thể làm tăng đáng kể tín hiệu huỳnh quang, tức là, thúc đẩy sự hoạt hóa của các tế bào T trong máu, và các giá trị EC_{50} của các kháng thể thể khảm này là 76,64ng/ml và 103,9ng/ml tương ứng.

Ví dụ 7. Nhân tính hóa các kháng thể

Để nhân tính hóa các kháng thể, các gen IgG của người tương đồng với trình tự cADN của các vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhất được lấy trong cơ sở dữ liệu NCBI về gen globulin miễn dịch của người (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Sau đó, các trình tự axit amin và ranh giới chính xác của các vùng biến đổi CDR được xác định bằng hệ thống đánh số Kabat hoặc hệ thống đánh số IMGT. Các trình tự CDR của vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhất được xác định bằng IMGT được thể hiện trong Bảng 4. IGVH và IGVk của người có độ tương đồng cao với các vùng biến đổi của kháng thể của chuột nhất được chọn làm khuôn để nhân tính hóa và được nhân tính hóa bằng cách ghép CDR. Tóm lại, quá trình nhân tính hóa bao gồm các bước sau đây: A. so sánh trình tự gen của mỗi kháng thể ứng viên với trình tự gen của kháng thể phôi người để tìm ra trình tự có độ tương đồng cao; B. phân tích và kiểm tra ái lực HLA-DR, và chọn trình tự vùng khung của phôi người có ái lực thấp; và C. phân tích các trình tự axit amin vùng khung của các vùng biến đổi và chu vi của chúng bằng cách sử dụng công nghệ mô phỏng bằng máy tính và áp dụng kỹ thuật lắp ghép phân tử để nghiên cứu các cách tổ hợp không gian và lập thể của chúng. Các axit amin chính mà có thể tương tác với TIGIT và duy trì vùng khung không gian trong trình tự gen của các kháng thể ứng viên được phân tích bằng cách tính lực tĩnh điện, lực Van der Waals, độ ưa nước và độ kỵ nước, và giá trị entropy, và được ghép với vùng khung của gen phôi người được chọn. Các vị trí axit amin của các vùng khung mà cần được giữ lại được ánh xạ. Sau đó, các kháng thể được nhân tính hóa được tổng hợp. Dựa trên các yếu tố nêu trên, tổng cộng 81 kháng thể được nhân tính hóa được thiết kế để sàng lọc hoạt tính kháng thể. Thông tin trình tự axit amin của các kháng thể hu3, hu20,

hu62, hu69 và hu81 được thể hiện trong bảng 5, và thông tin trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của các kháng thể hu3 và hu20 được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 4: các CDR được xác định bằng IMGT

Kháng thể Vùng	2018	23O20
VH	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14
HCDR1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11
HCDR2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12
HCDR3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13
VL	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 19
LCDR1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16
LCDR2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17
LCDR3	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18

Bảng 5: Các trình tự axit amin của các kháng thể được nhân tính hóa (các CDR/các vùng biến đổi)

Kháng thể được nhân tính hóa	hu3	hu20	hu62	hu69	hu81
HCDR1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 11
HCDR2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 12
HCDR3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 13
LCDR1	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 16
LCDR2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 17
LCDR3	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 18
VH	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 29
VL	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 30

Bảng 6: Các axit amin có chiều dài đầy đủ của các kháng thể được nhân tính hóa

Kháng thể được nhân tính hóa	HC	LC
hu3	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
hu20	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34

Ví dụ 8: Phát hiện tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể được nhân tính hóa đối với TIGIT của người bằng ELISA

Tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể được nhân tính hóa đối với TIGIT của người được phát hiện bằng ELISA thông thường. Tức là, 0,5 µg/ml TIGIT của người-ECD-mFc được cố định trên đĩa có 96 lỗ và ủ trong 60–90 phút ở nhiệt độ không đổi 37°C. Sau đó, dung dịch trong các lỗ được loại bỏ, và các lỗ được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa và được khóa trong 60 phút bằng PBS chứa 2% BSA. Sau khi đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa, các dung dịch pha loãng kháng thể được nhân tính hóa ở các nồng độ khác nhau được bổ sung. Các kháng thể được ủ ở 37°C trong 60 phút, và sau đó đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa và được bổ sung kháng IgG4-HRP được pha loãng 5000 lần. Hệ này được ủ ở 37°C trong 30 phút, và sau đó được rửa ba lần bằng dung dịch đệm rửa và được bổ sung 100µl cơ chất TMB để hiện màu. Hệ này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, và sau đó phản ứng được kết thúc bằng 100µl dung dịch axit clohydric 2M. Năng suất hấp thụ ở 450nm được xác định bằng bộ phận đọc đĩa.

Như được thể hiện trên Fig.4, các kháng thể hu3, hu20, hu62, hu69 và hu81 liên kết với TIGIT của người với độ đặc hiệu cao hơn, và các giá trị EC₅₀ của các kháng thể này là 23,20ng/ml, 37,84ng/ml, 8,60ng/ml, 10,66ng/ml và 9,83ng/ml tương ứng; tính đặc hiệu liên kết TIGIT của các kháng thể hu3, hu62, hu69 và hu81 là cao hơn đáng kể so với tính đặc hiệu liên kết của kháng thể etigilimab đối chứng.

Ví dụ 9: Tác dụng của các kháng thể được nhân tính hóa kháng TIGIT đối với hoạt tính của các tế bào T

Theo nguyên lý thử nghiệm và phương pháp như được mô tả trong phương án 3, tác dụng của các kháng thể được nhân tính hóa kháng TIGIT hu3, hu20, hu62, hu69 và hu81 đối với hoạt tính của các tế bào T được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm gen thông báo luxiferaza (thử nghiệm luxiferaza).

Như được thể hiện trên Fig.5, các kháng thể hu3, hu20, hu62, hu69 và hu81 có thể làm tăng đáng kể các tín hiệu huỳnh quang, tức là, thúc đẩy sự hoạt hóa của các tế bào T trong máu, và các giá trị EC_{50} của các kháng thể này là 139,9ng/ml, 42,39ng/ml, 109,4ng/ml, 102,7ng/ml và 88,43ng/ml tương ứng; tác dụng của các kháng thể hu3, hu20, hu62, hu69 và hu81 trong việc thúc đẩy sự hoạt hóa của các tế bào T trong máu là cao hơn đáng kể so với tác dụng của kháng thể etigilimab đối chứng.

Ví dụ 10: Phát hiện tác dụng của các kháng thể trong việc phong bế sự liên kết của hTIGIT với phối tử hPVR của nó bằng FACS

Tác dụng của các kháng thể trong việc phong bế sự liên kết của hTIGIT với phối tử hPVR của nó được phát hiện bằng thử nghiệm dựa trên phép đếm tế bào theo dòng cạnh tranh (FACS). Tóm lại, mỗi dung dịch pha loãng kháng thể ở các nồng độ khác nhau (nồng độ ban đầu 30 μ g/ml, chuẩn độ 3 lần) được trộn với PVR-mFC (1 μ g/ml, 50 μ l) và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, hỗn hợp này được ủ với hỗn dịch tế bào (dòng tế bào 293F-hPVR ổn định, $2,5 \times 10^4$ tế bào/lỗ) trong 15 phút ở 37°C. Sau 3 lần rửa giải bằng PBS, 100 μ l kháng thể của dê kháng IgG người -PE được bổ sung, và hệ này được ủ trong 30 phút trong chỗ tối. Sau 3 lần rửa giải bằng PBS, việc phát hiện được thực hiện bằng FACS. Các tế bào có thể sống được chia cổng dựa trên FSC/SSC, và cường độ huỳnh quang trung bình nhân của chúng được xác định.

Như được thể hiện trên Fig.6, các kháng thể được nhân tính hóa được bộc lộ ở đây có thể phong bế hiệu quả sự liên kết của TIGIT với PVR trên bề mặt tế bào.

Ví dụ 11: Phát hiện sự liên kết của các kháng thể được nhân tính hóa với TIGIT của các loài khác nhau bằng BIACORE

Ái lực của các kháng thể được bộc lộ ở đây đối với TIGIT và động học liên kết của chúng được phát hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE). Chip CM5 xeri S (GE) trước hết được lắp vào thiết bị, và 40 μ g/ml kháng thể của dê kháng mảnh Fc của người (Jackson ImmuneResearch) được hòa tan trong dung dịch đệm natri axetat-axit axetic (pH=5,0) được

sẵn sàng liên kết với bề mặt chip. Dung dịch đệm được sử dụng để phát hiện sự liên kết kháng thể-kháng nguyên là HBS-EP+ của GE Healthcare. Mỗi kháng thể hu3 và hu20 được pha loãng tới 8 $\mu\text{g/ml}$ và được bắt giữ trên bề mặt chip. Kháng nguyên hTIGIT Fc được pha loãng tới 20nM và bơm lên bề mặt chip ở tốc độ dòng 30 $\mu\text{l/phút}$ trong 180 giây, và tín hiệu phân ly liên kết của các kháng thể và kháng nguyên được phát hiện. Dữ liệu thu được được phân tích bằng mô hình liên kết 1:1 bằng cách sử dụng chương trình phần mềm đánh giá Biacore T200 3.0. Các hằng số động học của sự liên kết của các kháng thể với kháng nguyên, tức là, hằng số tốc độ liên kết k_a (1/Ms), hằng số tốc độ phân ly k_d (1/giây) và hằng số phân ly cân bằng K_D (M), đã thu được bằng cách làm khớp, và các kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7: Ái lực của các kháng thể đối với TIGIT-Fc

Kháng thể	Kháng nguyên	k_a (1/Ms)	k_d (1/giây)	K_D (M)
hu3	Cyno TIGIT-Fc	2,11E+05	3,00E-04	1,42E-09
hu20	Cyno TIGIT-Fc	2,26E+05	3,29E-04	1,45E-09
hu3	hTIGIT-Fc	9,35E+05	1,21E-04	1,30E-10
hu20	hTIGIT-Fc	7,77E+05	1,63E-04	2,09E-10

Các kết quả này cho thấy rằng các kháng thể được bọc lộ ở đây có ái lực cao đối với cả TIGIT của người và TIGIT của khỉ cynomolgus, và các giá trị K_D của các kháng thể này đối với TIGIT của người là thấp ở mức 0,13nM.

Ví dụ 12: Ước chế sự phát triển khối u ở chuột nhắt bằng các kháng thể được nhân tính hóa

Thử nghiệm này đề cập đến việc thiết lập mô hình động vật bị bệnh ung thư kết tràng MC38 là chuột nhắt được nhân tính hóa bằng B-hPD-1/hTIGIT (là sản phẩm của Biocytogen Jiangsu Co., Ltd.; chuột cái) và tác dụng kháng u hiệp đồng của các kháng thể kháng TIGIT và kháng thể kháng PD1 được sử dụng kết hợp.

Mỗi con chuột nhất được nhân tính hóa bằng B-hPD-1/hTIGIT được cấy dưới da, ở phía lưng bên phải, bằng 0,1ml tế bào MC38 được tái tạo hỗn dịch trong PBS ở nồng độ 5×10^5 tế bào/0,1ml. Khi thể tích khối u trung bình đạt tới 80–100 mm³, chuột nhất thích hợp được chọn theo thể tích khối u và trọng lượng cơ thể của chuột và được phân bố đều vào 8 nhóm thử nghiệm, mỗi nhóm 8 con, và việc sử dụng được bắt đầu vào ngày phân nhóm. Chế độ sử dụng cụ thể được thể hiện trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 8: Chế độ sử dụng

Nhóm	Kháng thể được sử dụng	Liều lượng (mg/kg) a	Đường sử dụng	Tần suất sử dụng ^b	Số lần sử dụng
1	KLH hIgG4	10	i.p	BIW	6
2	JS001	0,3	i.p	BIW	6
3	hu20	1	i.p	BIW	6
4	hu20	3	i.p	BIW	6
5	hu20	10	i.p	BIW	6
6	JS001+hu20	0,3+1	i.p	BIW	6
7	JS001+hu20	0,3+3	i.p	BIW	6
8	JS001+hu20	0,3+10	i.p	BIW	6

Chú thích: a: thể tích sử dụng được tính ở 10 µl/g theo trọng lượng cơ thể của động vật thử nghiệm;

b: BIW có nghĩa là sử dụng hai lần một tuần;

i.p: tiêm trong phúc mạc;

KLH hIgG4: kháng thể đối chứng âm;

JS001: kháng thể kháng PD-1 (CN2013102582892, kháng thể 38) được phát triển độc lập bởi Junshi Biosciences.

Trong thử nghiệm này, thể tích khối u và trọng lượng cơ thể động vật được xác định hai lần một tuần từ ngày 6 (trước khi sử dụng) trong 3 tuần liên tiếp. Đường kính dài (L) và đường kính ngắn (W) của mỗi khối u được xác định bằng cách sử dụng thước cặp có du xích, và thể tích khối u (V) được tính bằng cách sử dụng công thức sau đây: $V = L \times W^2/2$. Thể tích khối u theo thời gian của chuột trong các nhóm khác nhau được vẽ đồ thị. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng cách sử dụng phân tích phương sai (analysis of variance, ANOVA). Giá trị P thấp hơn 0,05 được cho là có ý nghĩa thống kê trong tất cả các phân tích.

Khi kết thúc thử nghiệm 26 ngày, chuột được chết êm ái. Các mô khối u được tách ra, chụp ảnh và cân, trọng lượng và thể tích khối u (thể tích khối u cuối) của mỗi nhóm chuột được xác định, và tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u tương đối (TGI (%)) được tính.

Các kết quả:

(1) Như được thể hiện trên Fig.7, đối với đơn trị liệu, sau 3 tuần sử dụng, so với nhóm sử dụng 1 (KLH hIgG4; 10 mg/kg), nhóm sử dụng 2 (JS001; 0,3 mg/kg), nhóm sử dụng 3 (hu20; 1 mg/kg), nhóm sử dụng 4 (hu20; 3 mg/kg) và nhóm sử dụng 5 (hu20; 10 mg/kg) ức chế đáng kể sự phát triển khối u ở chuột mang khối u MC38 do thể tích khối u được giảm đi và sự phát triển khối u cũng được làm chậm lại. Đối với việc đồng sử dụng, các nhóm đồng sử dụng có tác dụng ức chế đáng kể hơn đối với sự phát triển khối u ở chuột mang khối u MC38 so với các nhóm đơn trị liệu (nhóm 6 so với nhóm 3/nhóm 2; nhóm 7 so với nhóm 4/nhóm 2; nhóm 8 so với nhóm 5/nhóm 2), tức là, việc đồng sử dụng kháng thể đơn dòng kháng TIGIT hu20 được bộc lộ ở đây và kháng thể đơn dòng kháng PD-1 JS001 có tác dụng kháng u hiệp đồng tốt.

(2) Sáng chế cũng tính tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u tương đối trong mỗi nhóm chuột khi kết thúc thử nghiệm vào ngày 26 (sau khi cấy khối u). Công thức tính tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u tương đối là như sau:

$$\text{Tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u tương đối TGI (\%)} = [1 - (T_i - T_0)/(V_i - V_0)] \times 100\%$$

trong đó $T_i - T_0$ = thể tích khối u cuối của nhóm sử dụng sau khi sử dụng – thể tích khối u của nhóm sử dụng trước khi sử dụng, và $V_i - V_0$ = thể tích khối u cuối của nhóm đối chứng sau khi sử dụng – thể tích khối u của nhóm đối chứng trước khi sử dụng (thể tích khối u trước khi sử dụng vào ngày 6).

Các kết quả tính này được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây:

Bảng 9: Tác dụng của các kháng thể kháng TIGIT đối với sự phát triển mô khối u ở chuột mang khối u (mm^3 , giá trị trung bình $\pm$ SD, n = 8)

Nhóm	Kháng thể được sử dụng, liều lượng	Thể tích khối u trung bình (mm^3 , giá trị trung bình $\pm$ SD, n = 8) khi kết thúc thử nghiệm	TGI(%)
1	KLH hIgG4; 10mg/kg	2562 $\pm$ 529	N/A
2	JS001; 0,3mg/kg	1713 $\pm$ 876	34,3%
3	hu20; 1mg/kg	1739 $\pm$ 956	33,2%
4	hu20; 3mg/kg	1540 $\pm$ 809	41,3%
5	hu20; 10mg/kg	1555 $\pm$ 549	40,7%
6	JS001+hu20; 0,3 mg/kg +1 mg/kg	1153 $\pm$ 617	56,9%
7	JS001+hu20; 0,3 mg/kg +3mg/kg	1101 $\pm$ 712	59,0%
8	JS001+hu20; 0,3 mg/kg +10mg/kg	990 $\pm$ 609	63,5%

Giá trị trung bình $\pm$ SD: Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn

Các kết quả này cho thấy rằng ở giai đoạn cuối của thử nghiệm (vào ngày 26 sau khi cấy khối u), tỷ lệ ức chế sự phát triển khối u tương đối TGI (%) của các nhóm được sử dụng kháng thể kháng TIGIT hu20 kết hợp với kháng thể kháng PD-1 JS001 là cao hơn đáng kể so với tỷ lệ ức chế của các nhóm được sử dụng hu20 hoặc JS001 một mình (nhóm 6 so với nhóm 3/nhóm 2; nhóm 7 so với nhóm 4/nhóm 2; nhóm 8 so với nhóm 5/nhóm 2).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 và các vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, trong đó:

(1) HCDR1 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, HCDR3 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, LCDR1 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, LCDR2 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, và LCDR3 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8; hoặc

(2) HCDR1 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, HCDR2 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, HCDR3 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, LCDR1 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, LCDR2 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, và LCDR3 chỉ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18.

2. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

trình tự axit amin của VH được nêu trong SEQ ID NO: 21 hoặc 23, hoặc có mức độ giống ít nhất 99% với SEQ ID NO: 21 hoặc 23; và

trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 22 hoặc 24, hoặc có mức độ giống ít nhất 99% với SEQ ID NO: 22 hoặc 24.

3. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó:

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 21 và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 22, hoặc

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 23 và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 24.

4. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 31 hoặc 33, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 32 hoặc 34.

5. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 31, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 32; hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 33, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 34.

6. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó:

trình tự axit amin của VH được nêu trong SEQ ID NO: 25, 27 hoặc 29, hoặc có mức độ giống ít nhất 99% với SEQ ID NO: 25, 27 hoặc 29; và

trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 26, 28 hoặc 30, hoặc có mức độ giống ít nhất 99% với SEQ ID NO: 26, 28 hoặc 30.

7. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó:

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 25, và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 26; hoặc

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 27, và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 28, hoặc

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 29, và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 30.

8. Kháng thể kháng TIGIT được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó:

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 4, và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 9; hoặc

trình tự axit amin của VH của kháng thể được nêu trong SEQ ID NO: 14, và trình tự axit amin của VL được nêu trong SEQ ID NO: 19.

9. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đầy đủ, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể Fab, kháng thể Fab', kháng thể (Fab')₂ hoặc kháng thể hai giá.

10. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này là kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

11. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đa giá.

12. Phân tử axit nucleic được phân lập, mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

13. Vector tái tổ hợp hoặc biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều trình tự axit nucleic theo điểm 12, trong đó vector này là thích hợp để tạo ra theo cách tái tổ hợp kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

14. Tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector biểu hiện hoặc tái tổ hợp theo điểm 13 hoặc các phân tử axit nucleic theo điểm 12, và/hoặc biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

15. Dược phẩm bao gồm chế phẩm của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 và chất mang hoặc tá dược được dụng.

16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất đối kháng trực PD-1.

17. Dược phẩm theo điểm 16, trong đó chất đối kháng trực PD-1 được chọn từ kháng thể kháng PD-1, kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng PD-L2.

18. Phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, bao gồm các bước: nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 14, và phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó từ dịch nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Shanghai Junshi Biosciences Co., Ltd.
Suzhou Junmeng Biosciences Co., Ltd.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG TIGIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 204340 1PCWO

<150> CN 201910634309.9

<151> 2019-07-15

<160> 34

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ala Phe Thr Glu Tyr Thr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Ala Lys Leu Leu Arg Leu Met Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Glu Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Leu Leu Arg Leu Met Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 357

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 5

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaaga cttctggata cgcattcact gaatacacca tgcactgggt gaaacagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggaggt attaataccta acactgggtg tactacctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac	240
atggagttcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aaaattacta	300
cggctcatgt actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca	357

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Asp Val Arg Thr Ala

1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Ala Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

His Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

<210> 10

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 10

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc ggatgtgagg actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120
 ggacaatctc cttaaactact gatttactcg gcacacctacc ggtacactgg agtccctgat 180
 cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cactttatta ctgtcatcaa cattatatta ctccgtggac gttcggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Ile Tyr Pro Gly Gly His Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Thr Arg Tyr Tyr Gly Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Leu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Arg His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly His Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

<210> 15

<211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 15

cagggtccagc tgcagcagtc tggagatgaa ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagggtg 60
 tcctgccagg ctgctggata caccttcact aactactgga tactttggat aaagcagagg 120
 cctcgacatg gccttgagtg gattggagat atttaccctg gaggtcatta tactaattac 180
 aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca catcctccag tacagcctac 240
 atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgccatct attactgtac aagatactat 300
 ggtccctatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln Ser Leu Leu Tyr Asn Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Trp Ala Ser

1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr

1

5

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

1

5

10

15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Asn

20

25

30

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

35

40

45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

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

100

105

110

Lys

<210> 20

<211> 339

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 20

```

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctacctgtgt cagttggaga gaaggttact      60
atgagctgca agtccagtca gagcctttta tataatagta atcaaaagaa ctacttggcc      120
tggtaccagc agataccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactggg      180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat      300
ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa      339

```

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng

<400> 21

```

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

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Leu Arg Leu Met Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 24

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 Val Arg Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Leu Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly His Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Tyr Gly Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng

<400> 27

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30

```

Trp Ile Leu Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly His Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Tyr Gly Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 28

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

Lys

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Leu Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly His Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Tyr Tyr Gly Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 30

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

Lys

<210> 31

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Leu Arg Leu Met Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 32

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp
 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> 33

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Leu Leu Arg Leu Met Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro			
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val			
	260	265	270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
	275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
	290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
	325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
	340	345	350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 34

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ

<400> 34

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 Val Arg Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp
 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

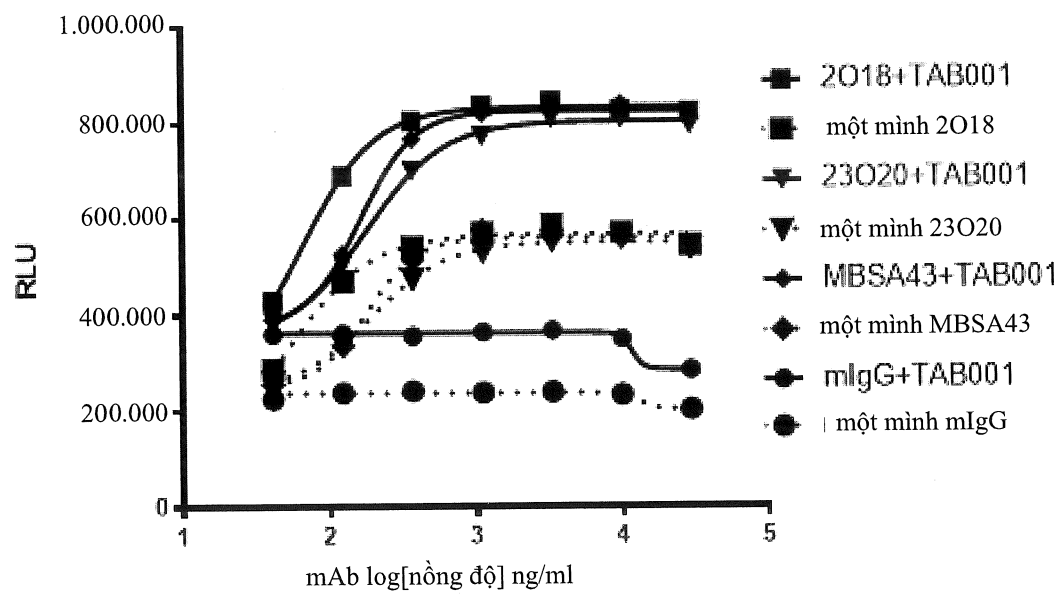


FIG. 1

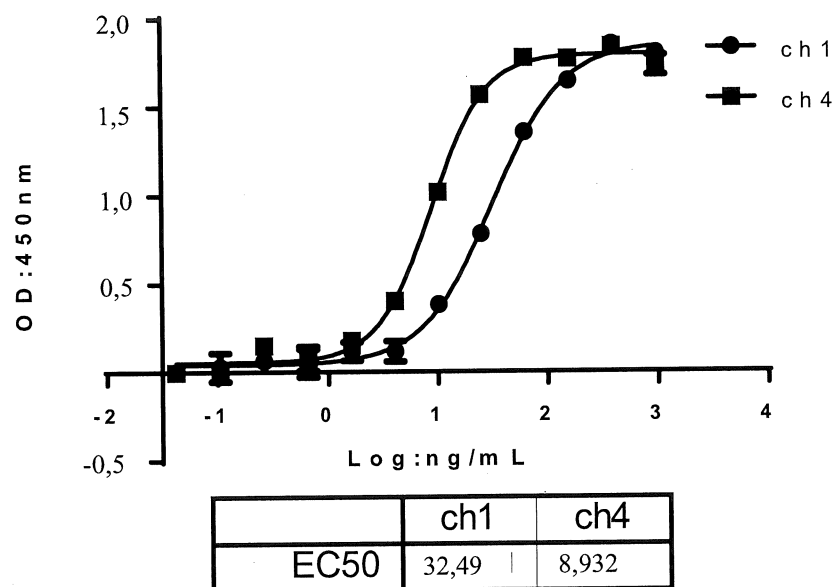


FIG. 2

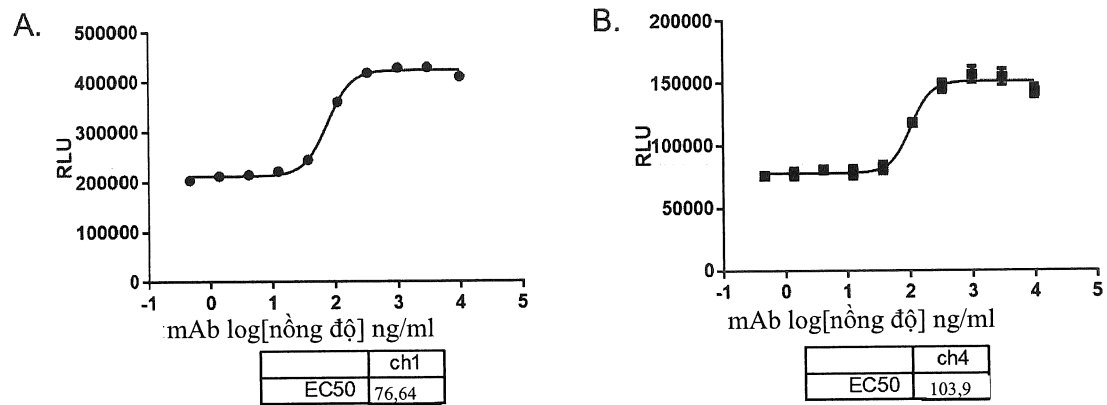


FIG. 3

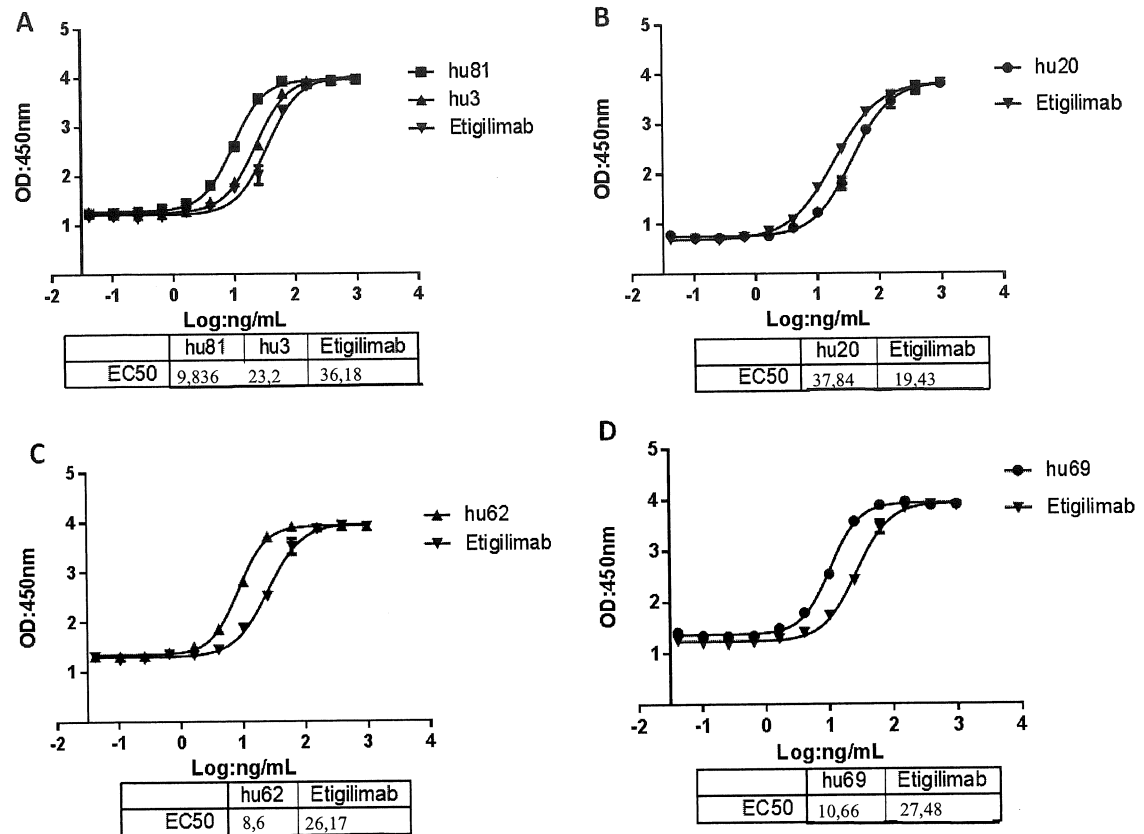


FIG. 4

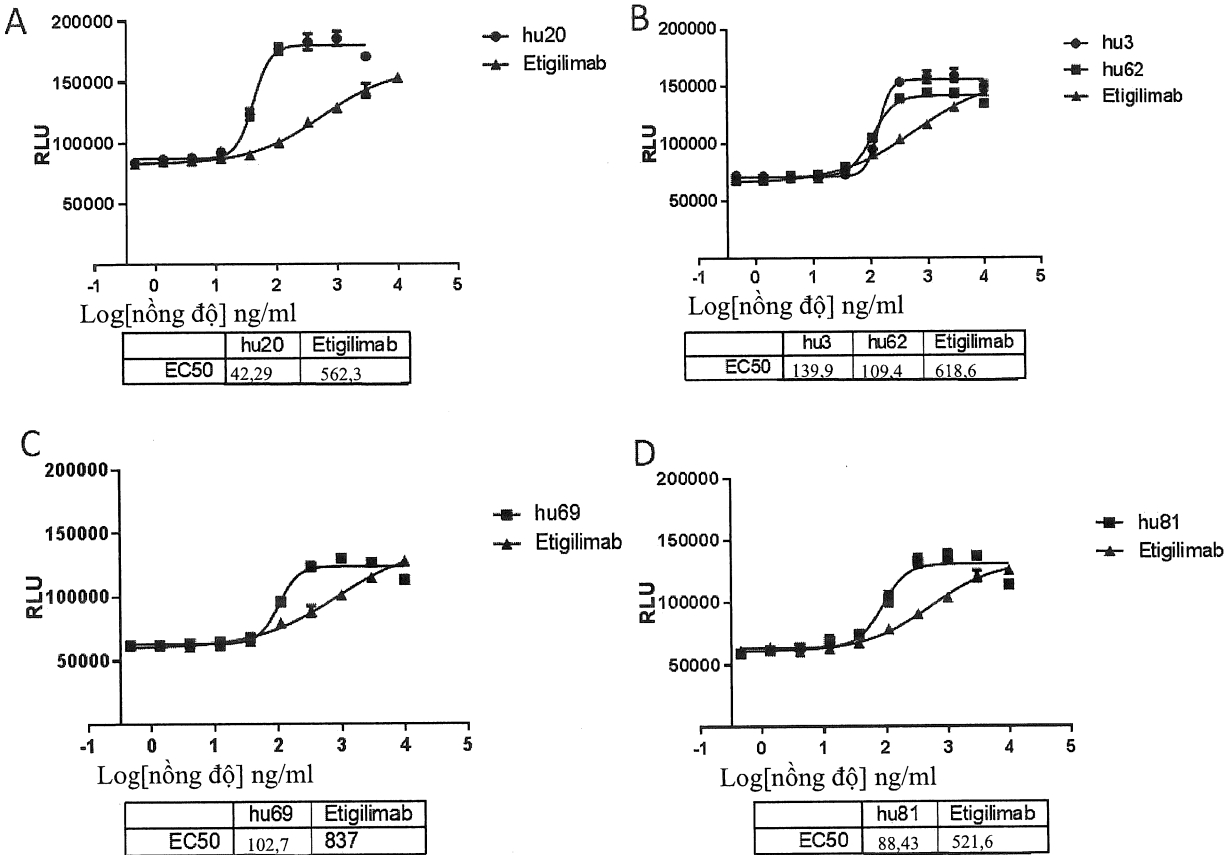


FIG. 5

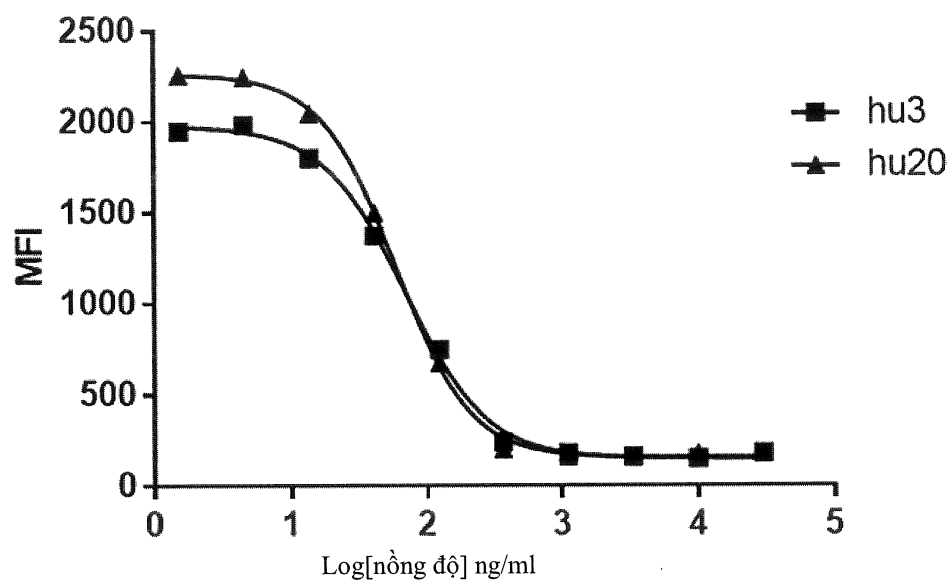


FIG. 6

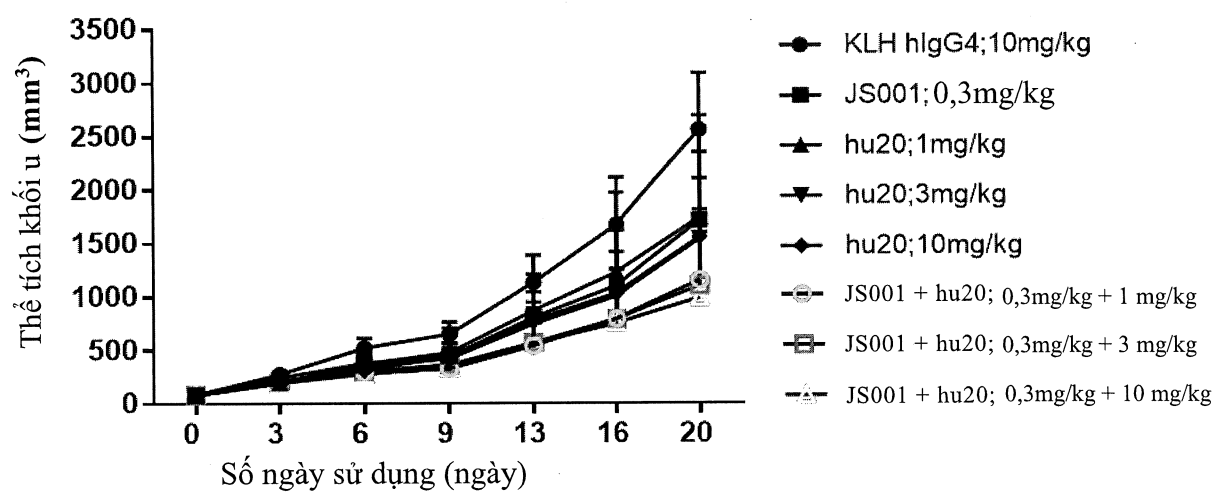


FIG. 7