



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

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

(11)



1-0051414

(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2021-03887

(22) 17/12/2019

(86) PCT/EP2019/085776 17/12/2019

(87) WO2020/127366 25/06/2020

(30) 18306801.4 21/12/2018 EP

(45) 25/09/2025 450

(43) 27/12/2021 405A

(73) OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (FR)

22 boulevard Benoni Goullin, 44200 NANTES, France

(72) POIRIER, Nicolas (FR); MARY, Caroline (FR); THEPENIER, Virginie (FR);
MORELLO, Aurore (FR); PENGAM, Sabrina (FR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 CỦA NGƯỜI ĐƯỢC LÀM TƯƠNG THÍCH VỚI
NGƯỜI, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY VÀ ĐƯỢC PHẨM
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2021-03887

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người, axit nucleic mã hoá nó, để sử dụng trong việc tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng cách hoạt hoá tế bào T và điều trị bệnh như bệnh ung thư và bệnh nhiễm trùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực miễn dịch và liệu pháp miễn dịch, cụ thể là trong việc điều trị bệnh ở người. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hữu ích để điều trị bệnh ở người.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1, còn gọi là CD279) là phân tử protein bề mặt tế bào thuộc siêu họ globulin miễn dịch. PD-1 được biểu hiện trên lympho bào T và lympho bào B và các đại thực bào, và có vai trò đối với số phận của tế bào và sự biệt hoá tế bào. Cụ thể là, PD-1, hoạt động như điểm kiểm soát miễn dịch, đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa giảm hệ thống miễn dịch bằng cách ngăn ngừa sự hoạt hoá tế bào T, mà sẽ làm giảm tính tự miễn và thúc đẩy tính tự dung nạp. Hai phối tử đối với PD-1 đã được xác định, PD-L1 và PD-L2, mà đã được chứng tỏ điều hòa giảm sự hoạt hoá tế bào T, gây cảm ứng tín hiệu đồng kích thích ở tế bào T và thúc đẩy sự chết theo chương trình của chúng, chứng mất ứng, và suy kiệt chức năng của chúng, khi liên kết với PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Phối tử PD-L1 và PD-L2 không được biểu hiện ở tế bào của người bình thường, nhưng có nhiều ở nhiều loại bệnh ung thư của người (Dong et al. (2002) *Nat Med* 8:787-9, Brahmer *et al.*, *N Eng J Med*, 366(26), 2012; Topalian *et al.*, *N Eng J Med*, 366(26), 2012; Wolchok et al., *N Engl J Med*. 2013 Jul 11; 369(2): 122–133).). PD-L1 được biểu hiện rộng rãi hơn PD-L2 và được biểu hiện bởi nhiều loại tế bào tạo máu và tế bào không tạo máu.

Khối u, vi khuẩn và virus đã khai thác con đường đồng ức chế như là PD-L1/PD-1 để lẩn tránh sự bảo vệ và giám sát miễn dịch bằng cách tạo ra môi trường vi mô ức chế miễn dịch. Cụ thể là, con đường PD-L1/PD-1 gây ra bởi khối u, vi khuẩn hoặc virus có thể trốn thoát sự giám sát miễn dịch của vật chủ thông qua nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm kích thích làm bất hoạt tế bào T, làm suy yếu, không đáp ứng và chết theo

chương trình, gây cảm ứng khuếch đại tế bào T-reg, và tăng cường khả năng nội tại của khối u để không bị tiêu diệt và chết theo chương trình. Tương tác của PD-1 và PD-L1 được điều tiết bởi tế bào bệnh ung thư cũng dẫn đến giảm lympho bào xâm nhập khối u và ức chế sự tăng sinh tế bào T được điều tiết bởi thụ thể tế bào T bằng cách làm giảm tín hiệu hạ lưu của TCR, dẫn đến sự hoạt hoá giảm và sản sinh xytokin (Dong et al. J. Mol. Med. 2003, 81: 281-7; Blank et al. Cancer Immunol. Immunother. 2005, 54: 307-314; Konishi et al. Clin. Cancer Res. 2004, 10: 5094-100). Sự biểu hiện của PD-1 trên lympho bào xâm nhập khối u hoặc tế bào khối u đã được tìm thấy ở một số sinh thiết khối u nguyên phát (Ribas A. Cancer Discov. 2015, 5(9):915-9).

Do vai trò ức chế miễn dịch, chất ức chế PD-1 đã được phát triển để chống lại tác dụng gây hại này lên hệ thống miễn dịch của người. Chất ức chế PD-1 này được cho là hoạt hoá hệ thống miễn dịch để tấn công khối u hoặc tế bào bị lây nhiễm và do đó có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư và bệnh. Thực tế là, phác đồ sử dụng chất ức chế PD-1 hoặc PD-L1 để phá vỡ tương tác của chúng đã chứng tỏ có tiềm năng để cải thiện liệu pháp miễn dịch ung thư (Brahmer *et al.*, N Eng J Med, 366(26), 2012; Powles *et al.*, Nature, 515(7528), 2014; Topalian *et al.*, N Eng J Med, 366(26), 2012; Ansell, Curr Opin Hematol, 22(4), 2015). Cụ thể là, việc phong bế các tương tác giữa PD-1 và phối tử của nó làm tăng cường tính miễn dịch của tế bào T CD8 đặc hiệu khối u mà có khả năng loại trừ tế bào khối u (Topalian S. et al. Curr Opin Immunol. 2012, 24(2):207-12). Tác dụng ức chế của PD-1 cũng đạt được thông qua cơ chế kép kích thích chết theo chương trình ở tế bào T đặc hiệu kháng nguyên ở hạch bạch huyết đồng thời giảm sự chết theo chương trình ở tế bào T điều hoà.

Việc sử dụng kháng thể đơn dòng (“mAbs”) đặc hiệu để phong bế PD-1/PD-L1 là đã biết trong lĩnh vực này để chống lại tác dụng ức chế miễn dịch của con đường truyền tín hiệu PD-1/PD-L1. Tuy nhiên, vấn đề thực tiễn đáng kể đã cản trở việc sử dụng rộng rãi *in vivo* ở người. Quan ngại chính là kháng thể đơn dòng có nguồn gốc không phải của người thường gây miễn dịch, do đó hạn chế hiệu quả của chúng và, trong một vài trường hợp, gây phản ứng dị ứng nguy hiểm. Đáp ứng miễn dịch đối với mAbs lạ này bao gồm sản sinh kháng thể ái lực cao đặc hiệu mà liên kết với và gây thải trừ mAbs, do đó làm giảm đáng kể hiệu lực của mAb bằng cách thúc đẩy sự thanh thải chúng khỏi cơ thể và ức chế khả năng liên kết với kháng nguyên đích của chúng. Để giải quyết vấn đề này, có thể làm cho kháng thể quan tâm không phải của người tương thích với người

để làm giảm tính gây miễn dịch đối với người, đồng thời vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể không phải của người gốc (kính điển là kháng thể của chuột). Kháng thể được làm tương thích với người này thường bao gồm một hoặc nhiều miền thay đổi trong đó miền liên kết kháng nguyên là thu được từ kháng thể không phải của người, và vùng khung thu được từ trình tự kháng thể của người hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

Do đó, có nhu cầu phát triển kháng thể được làm tương thích với người để cung cấp chất cải thiện cho liệu pháp miễn dịch an toàn, nhất là kháng lại bệnh ung thư, nhằm đích PD-1 của người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa vào sự phát triển kháng thể được làm tương thích với người nhằm đích đặc hiệu PD-1 của người, mà thể hiện ái lực liên kết cao đối với PD-1 và cạnh tranh mạnh với phối tử PDL-1 và/hoặc PDL-2 của nó. Kháng thể được làm tương thích với người này đã được tạo ra bằng công nghệ di truyền để cho khả năng sản xuất cao và năng suất sản xuất cao ở hệ thống sản xuất dựa vào tế bào động vật có vú. Kháng thể được làm tương thích với người này cụ thể trong bản mô tả này được gọi là “HKLD”.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã nhận thấy có tác dụng đáng kể và bất ngờ của kháng thể này dẫn đến hoạt động thực bào của đại thực bào đối với tế bào khối u mà không biểu hiện PD-L1, với hiệu quả hứa hẹn của kháng thể này nhất là để điều trị khối u âm tính với PD-L1 và/hoặc bệnh nhân bị suy giảm đáp ứng miễn dịch tế bào T.

Lợi ích lớn và tác dụng bất ngờ được thể hiện và được giải thích nhất là ở phần đầu của bản mô tả và trong ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, kháng thể kháng PD-1 của người đơn dòng được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) miền thay đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 và HCDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9, và

(ii) miền thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, LCDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit

amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 và LCDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14,

trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là chất đối kháng của liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người.

Theo khía cạnh thứ hai, kháng thể kháng PD-1 của người đơn dòng được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) VH bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 21; và (b) VL bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24.

Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là chất đối kháng của liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người.

Theo khía cạnh cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm - (a) chuỗi nặng bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 31, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ vị trí 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 và 112 được nêu trong SEQ ID NO: 31, và (b) chuỗi nhẹ bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 34, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ vị trí 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 và 105 được nêu trong SEQ ID NO: 34.

Theo khía cạnh cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người.

Theo khía cạnh cụ thể hơn, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng của IgG1 của người, tùy ý có thay thế hoặc tổ hợp các thay thế được chọn từ nhóm gồm có T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E;

K322A và K444A, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm có N297A tùy ý kết hợp với M252Y/S254T/T256E, và L234A/L235A.

Theo khía cạnh khác cụ thể hơn, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng của IgG4 của người, tùy ý có thay thế hoặc tổ hợp các thay thế được chọn từ nhóm gồm có S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E và K444A.

Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với PD-1 của người với hằng số ái lực liên kết (KD) đối với PD-1 của người bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-7} M, ái lực này tốt hơn là được xác định bằng phân tích bộ cảm biến sinh học.

Cụ thể là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có nhân tính (T20) bằng hoặc lớn hơn 85%, tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn 88% và/hoặc mà có năng suất sản xuất cao ở tế bào động vật có vú.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm phân tử axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được đề cập trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến vector bao gồm phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm phân tử axit nucleic được phân lập như được đề cập trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic được phân lập và/hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập và/hoặc vector theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ như được đề cập trong bản mô tả này và tùy ý bước phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và/hoặc phân tử axit nucleic được phân lập và/hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập và/hoặc vector và/hoặc tế bào chủ như được đề cập trong bản mô tả này và chất mang được dụng.

Tùy ý, dược phẩm còn bao gồm chất trị liệu bổ sung, tốt hơn là được chọn trong

nhóm gồm có chất alkyl hoá, chất ức chế sinh mạch, kháng thể, cụ thể là kháng thể nhằm đích kháng khối u, chất chống chuyển hoá, chất chống phân bào, chất chống tăng sinh, chất chống virus, chất ức chế aurora kinaza, chất thúc đẩy sự chết theo chương trình (ví dụ, chất ức chế họ Bcl-2), chất hoạt hoá con đường thụ thể gây chết, chất ức chế Bcr-Abl kinaza, kháng thể BiTE (chất tuyển mộ tế bào T lưỡng đặc hiệu), thể liên hợp kháng thể thuốc, chất cải biến đáp ứng sinh học, chất ức chế Bruton tyrosin kinaza (BTK), chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin, chất ức chế chu trình tế bào, chất ức chế cyclooxygenaza-2, liệu pháp kết hợp Doxorubicin + Vincristine + Dexamethason (DVDs), chất ức chế thụ thể chất đồng đẳng gen gây ung thư của virus bệnh bạch cầu (ErbB2), chất ức chế yếu tố tăng trưởng, chất ức chế protein sốc nhiệt (HSP)-90, chất ức chế histon deacetylaza (HDAC), liệu pháp hormon, chất miễn dịch, chất ức chế của chất ức chế protein chết theo chương trình (IAP), kháng sinh xen vào giữa, chất ức chế kinaza, chất ức chế kinesin, chất ức chế Jak2, đích ở động vật có vú của chất ức chế rapamycin, microARN, chất ức chế kinaza được điều tiết bởi tín hiệu ngoại bào được hoạt hoá bởi chất gây phân bào, protein liên kết đa hoá trị, thuốc chống viêm phi steroid (NSAID), chất ức chế poly ADP (adenosin diphosphat)-riboza polymeraza (PARP), chất hoá trị liệu platin, chất ức chế kinaza tương tự polo (Plk), chất ức chế phosphoinositid-3 kinaza (PI3K), chất ức chế proteasom, chất tương tự purin, chất tương tự pyrimidin, chất tương tự tyrosin kinaza thụ thể, retinoid/deltaoit alkaloit của cây, axit ribonucleic ức chế nhỏ (siARN), chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế ubiquitin ligaza, chất giảm methyl hoá, chất ức chế điểm kiểm soát, vắcxin peptit và chất tương tự, epitop hoặc neoepitop từ kháng nguyên khối u, cũng như tổ hợp của một hoặc nhiều chất trong số các chất này.

Cụ thể là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, dược phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm phân tử axit nucleic được phân lập, vector, hoặc tế bào chủ là để sử dụng làm thuốc.

Tuy ý, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, dược phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập, vector, hoặc tế bào chủ là để sử dụng kết hợp với liệu pháp xạ trị hoặc chất trị liệu bổ sung, tốt hơn là được chọn trong nhóm gồm có chất alkyl hoá, chất ức chế sinh mạch, kháng thể, cụ thể là kháng thể nhằm đích kháng khối u, chất chống chuyển hoá, chất chống phân bào, chất chống tăng sinh, chất chống virus, chất ức chế aurora kinaza, chất thúc đẩy sự chết theo chương trình (ví dụ, chất ức chế họ Bcl-2), chất hoạt hoá con đường thụ thể

gây chết, chất ức chế Bcr-Abl kinaza, kháng thể BiTE (chất tuyến mô tế bào T lưỡng đặc hiệu), thể liên hợp kháng thể thuốc, chất cải biến đáp ứng sinh học, chất ức chế Bruton tyrosin kinaza (BTK), chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin, chất ức chế chu trình tế bào, chất ức chế xycloxygenaza-2, DVD, chất ức chế thụ thể chất đồng đẳng gen gây ung thư của virus bệnh bạch cầu (ErbB2), chất ức chế yếu tố tăng trưởng, chất ức chế protein sốc nhiệt (HSP)-90, chất ức chế histon deacetylaza (HDAC), liệu pháp hormon, chất miễn dịch, chất ức chế của chất ức chế protein chết theo chương trình (IAP), kháng sinh xen vào giữa, chất ức chế kinaza, chất ức chế kinesin, chất ức chế Jak2, đích ở động vật có vú của chất ức chế rapamycin, microARN, chất ức chế kinaza được điều tiết bởi tín hiệu ngoại bào được hoạt hoá bởi chất gây phân bào, protein liên kết đa hoá trị, thuốc chống viêm phi steroid (NSAID), chất ức chế poly ADP (adenosin diphosphat)-riboza polymeraza (PARP), chất hoá trị liệu platin, chất ức chế kinaza tương tự polo (Plk), chất ức chế phosphoinositit-3 kinaza (PI3K), chất ức chế proteasom, chất tương tự purin, chất tương tự pyrimidin, chất tương tự tyrosin kinaza thụ thể, retinoit/deltaoit alkaloit của cây, axit ribonucleic ức chế nhỏ (siARN), chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế ubiquitin ligaza, chất giảm methyl hoá, chất ức chế điểm kiểm soát, vắcxin peptit và chất tương tự, epitop hoặc neoepitop từ kháng nguyên khối u, cũng như tổ hợp của một hoặc nhiều chất trong số các chất này.

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập, vector, hoặc tế bào chủ để sử dụng làm thuốc là để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư. Tốt hơn là, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có thể ác tính huyết học hoặc khối u rắn có biểu hiện của PD-1 và/hoặc PD-L1 như là bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có bệnh tăng sinh thể bạch huyết, u lympho tế bào T nguyên bào miễn dịch mạch máu, hội chứng rối loạn sinh tuỷ, và bệnh bạch cầu dạng tuỷ cấp, bệnh ung thư gây cảm ứng bởi virus hoặc kèm theo suy giảm miễn dịch như là bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có sarcoma Kaposi (ví dụ, liên quan đến virus herpes sarcoma Kaposi); cổ tử cung, bệnh ung thư hậu môn, bệnh ung thư dương vật và bệnh ung thư tế bào vảy âm hộ và bệnh ung thư miệng-hầu (ví dụ, có liên quan đến virus papilloma ở người); u lympho không phải Hodgkin tế bào B (NHL) bao gồm u lympho tế bào B lớn lan toả, u lympho Burkitt, u lympho nguyên bào tương bào, u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát, u lympho tràn dịch nguyên phát HHV-8, u lympho Hodgkin cổ điển,

và rối loạn tăng sinh lympho (ví dụ, có liên quan đến virus Epstein-Barr (EBV) và/hoặc virus herpes sacoma Kaposi); caxinom tế bào gan (ví dụ, có liên quan đến virus viêm gan B và virus viêm gan C); caxinom tế bào Merkel (ví dụ, có liên quan đến polyomavirus tế bào Merkel (MPV)); và bệnh ung thư kèm theo bệnh nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), và bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có di căn hoặc không di căn, u melanin, u trung biểu mô ác tính, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, caxinom tế bào thận, u lympho Hodgkin, bệnh ung thư đầu và cổ, ung thư biểu mô đường tiết niệu, bệnh ung thư đại tràng, caxinom tế bào gan, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, caxinom tế bào Merkel di căn, bệnh ung thư dạ dày hoặc dạ dày-thực quản và bệnh ung thư cổ tử cung.

Theo khía cạnh cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập, vectơ, hoặc tế bào chủ là để sử dụng để điều trị bệnh ung thư trong đó tế bào khối u là âm tính với PD-L1. Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập, vectơ, hoặc tế bào chủ để sử dụng làm thuốc là để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn, tốt hơn là bệnh nhiễm khuẩn mãn tính, tốt hơn nữa là gây ra bởi virus được chọn từ nhóm gồm có HIV, virus viêm gan, virus herpes, adenovirus, virus cúm, flavivirus, echovirus, rhinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus hợp bào hô hấp, virus quai bị, rotavirus, virus sởi, virus rubella, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus sốt xuất huyết, papillomavirus, virus molluscum, virus bại liệt, virus dại, virus JC và virus viêm màng não arbovirus.

Theo khía cạnh cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập, vectơ, hoặc tế bào chủ là để sử dụng để điều trị cho bệnh nhân mắc rối loạn giảm lympho bào.

Theo khía cạnh cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập, vectơ, hoặc tế bào chủ để sử dụng làm thuốc để điều trị cho đối tượng bị ức chế miễn dịch, bị suy giảm miễn dịch hoặc bị suy yếu miễn dịch. Theo khía cạnh cụ thể khác, đối tượng này có tải lượng đột biến cao và mật độ kháng nguyên mới cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Liên kết của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người khác nhau vào PD1 của người theo ELISA và FACS: **A:** phân tích ELISA đối với liên kết của kháng thể ở các nồng độ khác nhau (ng/ml): kháng thể khảm (●) và kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người từ các biến thể chuỗi nặng HC (■), HE (▲), HG (▼), HH (◆), HJ (○), HI (□), HK (△) đến HL (⊗) được kết hợp với biến thể chuỗi nhẹ LD. Việc phát hiện được thực hiện với kháng thể của lừa kháng người được kết hợp với peroxidaza và đo hiện màu ở 450nm sử dụng chất nền TMB. ED50 chỉ nồng độ cần thiết để đạt được 50% tín hiệu trong thử nghiệm này. **B:** Đánh giá khả năng liên kết của kháng thể bằng đo huỳnh quang tế bào trên PBMC của người được kích thích bởi CD3/CD28. Dung dịch pha loãng theo bậc (μg/ml) của HELC (■), HELD (▼) được thêm vào và được biểu lộ sử dụng Fc mAb kháng người ở chuột được đánh dấu PE và tế bào kế Canto II. Dữ liệu được biểu thị bằng Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) nhuộm màu trong quần thể tế bào T CD3⁺ dương tính với PD1⁺. **C:** Đánh giá khả năng liên kết của kháng thể bằng đo huỳnh quang tế bào trên tế bào T được kích thích bởi CD3/CD28. Dịch pha loãng theo bậc (μg/ml) kháng thể được làm tương thích với người được thêm vào và hiện kết quả bằng cách sử dụng Fc mAb của chuột kháng của người được đánh dấu PE và thiết bị đếm tế bào Canto II. Dữ liệu được biểu thị bằng Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) nhuộm màu trong quần thể tế bào T CD3⁺ dương tính với PD1⁺.

Fig. 2: Mất khả năng liên kết với PD1 của người của một vài kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người sau khi gây đột biến axit amin trong quá trình làm tương thích với người: khả năng liên kết theo ELISA của biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người sau khi gây đột biến trên chuỗi nặng thay đổi ở vị trí Kabat 97 (nghĩa là vị trí axit amin quy ước 101). **(A):** trong đó HC(E97)LB2 (●) và HC(D97)LB2 (□) được so sánh với khảm (Δ), ở vị trí Kabat R96 **(B):** trong đó HELD(●) và HE(K96)LD (□) được so sánh với khảm (Δ).

(C), (D) và (E): khả năng liên kết theo ELISA của biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người sau khi gây đột biến trên chuỗi nhẹ thay đổi ở vị trí Kabat N28 **(C):** trong đó HCLw(N28) (□) và HCLw(Q28) (●) được so sánh với khảm (Δ), ở vị trí Kabat V94 **(D):** trong đó Hwt-LA(E34) (▪) và HwtLA(N34) (◇) được so sánh với khảm (Δ).

(Δ) (E): trong đó HELD(V94) và HELD(L94) được so sánh với khảm (Δ), ở vị trí Kabat E34. Đối với chuỗi nặng, vị trí Kabat 96 tương ứng với vị trí tuần tự 100 và vị trí Kabat 97 tương ứng với vị trí tuần tự 101. Đối với chuỗi nhẹ, vị trí Kabat 28 tương ứng với vị trí tuần tự 33, vị trí Kabat 34 tương ứng với vị trí tuần tự 39 và vị trí Kabat 94 tương ứng với vị trí tuần tự 99.

Fig. 3: Xác định độ ổn định của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người sau 7 ngày ở 4°C hoặc 37°C đối với sự liên kết PD1 bằng ELISA. Ngày 0 (●), ngày 7 ở 4°C (□) và ngày 7 ở 37°C (▲)

Fig. 4: Hoạt tính chất đối kháng của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đối với tương tác PD1-PDL1:

A: cạnh tranh giữa PDL1 và kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người về sự liên kết với PD1 được đo bằng Biacore

B: cạnh tranh giữa kháng thể được làm tương thích với người và PDL1 đối với PD1 được đo bằng Blitz. Dữ liệu được biểu thị bằng % đáp ứng liên kết trong đó 100% là Ka của tương tác PD1/PD-L1 không có kháng thể (mức đáp ứng tương đối).

C. Nghiên cứu liên kết của PD1 với PDL1 khi có mặt nồng độ gia tăng của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người bằng ELISA dẫn đến xác định giá trị IC50 của mỗi kháng thể biến thể.

Fig. 5: Hoạt tính chất đối kháng của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đối với PD1-PDL2

A. cạnh tranh giữa PDL2 và kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người về sự liên kết với PD1 được đo bằng Biacore

B. Nghiên cứu liên kết của PD1 với PDL2 khi có mặt nồng độ gia tăng của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người (HKLD) bằng ELISA.

Fig. 6: Năng suất cao hơn của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người so với biến thể khảm và Keytruda ở tế bào động vật có vú. Tế bào CHO-K1 bám dính được chuyển nhiễm tạm thời với ADN mã hoá Keytruda, HKLD hoặc kháng thể kháng PD-1 khảm trong đĩa 12 giếng. Năng suất được định lượng bằng ELISA bằng cách sử dụng (kháng thể của lừa kháng Fc của người được cố định để phát hiện và hiện kết quả bằng kháng thể của dê kháng chuột được liên hợp peroxidaza + của chuột

kháng kappa của người). Xác định nồng độ bằng chất chuẩn IvIgG của người. Dữ liệu được chuẩn hoá theo năng suất của kháng thể kháng PD-1 khảm.

Fig. 7: Thử nghiệm sinh học về SHP1-phosphoryl hoá xác định hoạt tính chất đối kháng của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người để phong bế tín hiệu PD1: tín hiệu PD-1 được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học Discoverx. Độ huỳnh quang phát quang (RLU: (Tín hiệu phát quang tương đối) được xác định là tỷ lệ với sự hoạt hoá tín hiệu PD-1. **A:** biểu thị kết quả so sánh nồng độ khác nhau ($\mu\text{g/ml}$) của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người với biến thể LD của chuỗi nhẹ. **B:** biểu thị kết quả so sánh biến thể LD và biến thể LC của chuỗi nhẹ được kết hợp với biến thể HE của chuỗi nặng (kháng thể HELC hoặc HELD). IC50 (ng/mL) chỉ nồng độ cần thiết để đạt được 50% ức chế tín hiệu.

Fig. 8: Thử nghiệm sinh học đo mức hoạt hoá tế bào T khi có mặt kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người. Thực hiện thử nghiệm sinh học PD-1/PD-L1 Promega bằng cách sử dụng hệ chất chỉ thị NFAT luxiferaza. Dịch pha loãng theo bậc của mỗi kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người được thử nghiệm. Trục X biểu thị nồng độ của kháng thể theo $\mu\text{g/mL}$. EC50 ($\mu\text{g/mL}$) chỉ nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được 50% của độ phát quang tối đa.

Fig. 9: Sự bài tiết IFN γ bởi tế bào T sau khi điều trị bằng kháng thể PD-1 được làm tương thích với người trong thử nghiệm phản ứng bạch cầu hỗn hợp. Tế bào tua thu được từ bạch cầu đơn nhân to được đồng nuôi cấy với tế bào T CD4 cùng loài trong 5 ngày. **A.** Nồng độ IFN γ trong dịch nổi được định lượng bằng ELISA. Đường đồ thị đáp ứng theo liều dùng của kháng thể HKLD (màu đen $\blacksquare$) hoặc đối chứng isotyp IgG4 (màu ghi $\bullet$) được thử nghiệm. Dữ liệu biểu thị 4 thử nghiệm độc lập. Mức ý nghĩa thống kê $*p < 0,05$ được tính toán bằng kiểm định t-student.

Fig. 10: Hiệu lực in vivo của biến thể kháng PD-1 được làm tương thích với người ở mô hình u trung biểu mô ở chuột biểu hiện dạng PD-1 của người. Chuột được biến đổi gen để biểu hiện phần ngoại bào của PD-1 của người trong đó exon 2 của gen PDCD1 được thay bằng gen đối ứng của người (được li-xăng bởi Oxford University Innovation). Tế bào u trung biểu mô AK7 được tiêm đúng vị trí vào khoang màng phổi và tăng trưởng khối u được đo bằng mức phát quang sinh học (photo/s/cm²/sr) (**A**) và khả năng sống sót tổng thể được đánh giá (**B**). Chuột được điều trị bằng PBS ($\bullet$) (đối chứng âm tính)

hoặc bằng dạng được làm tương thích với người kháng PD-1 (biến thể HKLD) (▲) hoặc đối chứng kháng PD-1 (□).

Fig. 11: Hiệu lực in vivo của biến thể kháng PD-1 được làm tương thích với người trên mô hình chuột caxinom đại tràng MC38 lạc vị trí biểu hiện dạng PD-1 của người. MC38 được tiêm dưới da và chuột được điều trị bằng PBS (màu ghi ●) (đối chứng âm tính) hoặc bằng dạng được làm tương thích với người kháng PD-1 (biến thể HKLD) màu đen (▲) và thể tích khối u (A) và khả năng sống sót tổng thể (B) được đánh giá.

Fig. 12: Hiệu lực in vivo của biến thể kháng PD-1 được làm tương thích với người trên mô hình chuột caxinom gan. Tế bào Hepa1.6 được cấy vào tĩnh mạch cửa của chuột tạo thành mô hình caxinom gan. Chuột được điều trị bằng đối chứng isotyp IgG4 (màu ghi ●) (đối chứng âm tính) hoặc bằng dạng được làm tương thích với người kháng PD-1 (biến thể HKLD) (màu đen ●) Khả năng sống sót tổng thể được đánh giá.

Fig. 13: Dược động học của kháng thể PD-1 được làm tương thích với người ở khỉ cynomolgus và chuột sau khi tiêm một lần duy nhất. A: chuột Balb/C được tiêm trong tĩnh mạch bằng biến thể HKLD isotyp IgG4 S228P (●) hoặc biến thể HKLD isotyp IgG1 N298A (□) hoặc Keytruda (1 liều ở 5mg/kg) (màu ghi ▲). B: chuột Balb/C được tiêm trong tĩnh mạch (□) hoặc tiêm dưới da (●) bằng biến thể HKLD isotyp IgG4 S228P (1 liều dùng 5mg/kg). C: khỉ Cynomolgus được tiêm trong tĩnh mạch ở liều 1 mg/kg (●) hoặc 5 mg/kg (□) bằng biến thể HKLD. Kháng thể kháng PD-1 được định lượng trong huyết thanh bằng ELISA tự chế tạo hoặc sử dụng công nghệ MSD.

Fig. 14: kháng PD-1 được làm tương thích với người thúc đẩy sự thực bào tế bào khối u âm tính PD-L1 bằng cách phong bế tương tác PD-L1/PD-1 ở đại thực bào. A. nhuộm màu đếm tế bào dòng chảy PD-1/PD-L1 cho tế bào Raji, đại thực bào M0, đại thực bào M1 và đại thực bào được sử dụng cho thử nghiệm thực bào; B. thử nghiệm thực bào in vitro với kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người. M1-đại thực bào của người được nhuộm màu bằng chất nhuộm màu tăng sinh tế bào eFluor450 và ủ với tế bào Raji được đánh dấu bằng CPDeFluor670 trong 1 giờ khi có mặt Rituximab (10ng/mL) và đối chứng isotyp hoặc kháng PD-1 được làm tương thích với người (HKLD, 10ug/mL). Dữ liệu biểu thị kết quả thực bào của 3 thử nghiệm độc lập và được chuẩn hoá theo mức thực bào tối đa. C. thực hiện thử nghiệm thực bào giống như vậy với đại thực bào M1 và tế bào Raji khi có mặt đối chứng isotyp, kháng thể

kháng PD-1 được làm tương thích với người, kháng thể pembrolizumab hoặc kháng thể nivolumab (10ug/mL). **D.** thử nghiệm thực bào của đại thực bào M0 so với đại thực bào M1 với tế bào Raji được ủ với đối chứng isotyp, kháng PD-1 được làm tương thích với người. Dữ liệu được biểu thị bằng số lần mức thực bào thay đổi so với đối chứng isotyp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giới thiệu

Kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người theo sáng chế (HKLD) có tất cả các ưu điểm sau đây:

- có % mức độ tương thích với người cao, cụ thể là điểm nhân tính T20 là 91,07% đối với chuỗi nặng và 88,7% đối với chuỗi nhẹ. Trong khi đó, kháng thể kháng PD1 gọi là Keytruda, mà là kháng thể được phê duyệt về mặt lâm sàng và là chất chuẩn, có điểm nhân tính T20 là 75,7% đối với chuỗi nặng và 82,7% đối với chuỗi nhẹ (Xem Bảng 9). Điểm nhân tính T20 là thông số thường được sử dụng trong lĩnh vực làm kháng thể tương thích với người lần đầu tiên được Gao và các đồng tác giả đề cập đến (BMC Biotechnol, 2013, 13, 55). Điểm nhân tính T20 thường được sử dụng trong đơn sáng chế để xác định kháng thể được làm tương thích với người (ví dụ, WO15161311, WO17127664, WO18136626, WO18190719, WO19060750, hoặc WO19170677).

- bất ngờ thể hiện khả năng sản xuất cao và sản lượng cao khi được sản xuất ở tế bào động vật có vú (ví dụ, COS, CHO) so với kháng thể khảm. Thực tế là, ở tế bào CHO và ở tế bào COS, có mức sản xuất gia tăng 3-4 lần so với kháng thể khảm (Xem Bảng 11) và mức sản xuất gia tăng 2 lần so với Keytruda (xem Fig. 6).

- thể hiện ái lực liên kết (KD) đối với PD-1 của người nhỏ hơn 10-8 M. Kháng thể được làm tương thích với người của sáng chế chứng tỏ khả năng liên kết được cải thiện với PD-1 so với kháng thể khảm như được đánh giá bằng phương pháp khác nhau. Ái lực của kháng thể được làm tương thích với người HKLD là tương đương với một trong số kháng thể kháng PD1 gọi là Keytruda (xem Bảng 7).

- có hoạt tính chất đối kháng và ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người (xem Bảng 13). Cụ thể hơn là, khi so với kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người của sáng chế chứng tỏ khả năng liên kết được cải thiện với tế bào biểu hiện PD1 (Fig. 1C) và khả năng đối kháng (xem Bảng 14 và Bảng 15).

- rất ổn định (xem Bảng 12).
- phong bế tín hiệu PD-1 (SHP-1 phosphoryl hoá và tuyển dụng, xem Bảng 15 và Fig. 7) và thúc đẩy sự hoạt hoá tế bào T (hoạt hoá qua trung gian NFAT, xem Bảng 16 và Fig. 8).
- kích thích sự bài tiết xytokin hiệu ứng bởi tế bào T của người, cụ thể hơn là bài tiết xytokin IFN γ (Fig. 9).
- do đó, có khả năng khôi phục sự hoạt hoá tế bào T.
- thúc đẩy đáp ứng miễn dịch kháng khối u in vivo. Thực tế là, kháng thể được làm tương thích với người của sáng chế có khả năng làm giảm kích cỡ khối u và làm tăng khả năng sống sót ở một vài loại khối u (Fig. 10-Fig. 12).
- có ưu điểm bổ sung bất ngờ vì có khả năng tăng cường thực bào tế bào khối u mà âm tính với PD-L1 bằng cách phong bế liên kết PDL1/PD-1 ở đại thực bào (Fig. 14). Tác dụng này là đặc hiệu của kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người của sáng chế chưa được quan sát thấy với kháng thể kháng PD-1 khác, đặc biệt là pembrolizumab và nivolumab (Fig. 14C). Do đó, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người của sáng chế gây cảm ứng đáp ứng miễn dịch kháng lại tế bào khối u mà không biểu hiện PD-L1 thông qua sự thực bào này. Tính chất này là đặc biệt được quan tâm đối với bệnh nhân bị ức chế miễn dịch hoặc bị suy yếu miễn dịch và/hoặc để điều trị khối u bao gồm tế bào khối u mà không biểu hiện PD-L1. Cụ thể hơn là, kháng thể này là hữu ích để điều trị cho bệnh nhân có số lượng tế bào T thấp, đặc biệt là tế bào T xâm nhập khối u và/hoặc bệnh nhân có số lượng tế bào T bị suy kiệt cao. Thực tế là, kháng thể có thể có tác dụng kháng khối u bổ sung thông qua sự hoạt hoá thực bào bởi đại thực bào. Không bị hạn chế theo lý thuyết, các tác giả sáng chế tin rằng tác dụng đặc hiệu của kháng thể của sáng chế đối với đại thực bào có thể là do khả năng liên kết PD-1 và PD-L1 của nó trên chính tế bào này, cụ thể là chính đại thực bào này.
- Cuối cùng là, kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế thể hiện được động học thuận lợi (Fig. 13).

Gộp lại, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người của sáng chế thể hiện mức độ tương thích với người rất cao, thậm chí so với Keytruda, một kháng thể kháng PD1 đã được duyệt trên lâm sàng. So với kháng thể khảm, kháng thể này thể hiện sản lượng tốt hơn, khả năng liên kết với PD-1 tốt hơn và khả năng đối kháng tốt hơn. Kháng thể này là ổn định và có được động học thuận lợi. Kháng thể này tăng cường hoạt

hoá tế bào T, hoạt hoá thực bào bởi đại thực bào và kích thích đáp ứng miễn dịch kháng khối u in vivo.

Định nghĩa

Để cho sáng chế được dễ hiểu hơn, một số thuật ngữ được định nghĩa dưới đây. Các định nghĩa bổ sung được đưa ra trong bản mô tả này.

Trừ khi được định nghĩa khác đi, tất cả thuật ngữ của lĩnh vực, ký hiệu và thuật ngữ khoa học khác được sử dụng trong bản mô tả này dự định có nghĩa thuộc hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Trong một vài trường hợp, thuật ngữ có nghĩa thông thường được hiểu được định nghĩa trong bản mô tả này để làm rõ và/hoặc để dễ tham khảo, và việc đưa vào các định nghĩa này không nhất thiết được hiểu là có sự khác biệt so với thuật ngữ nói chung được hiểu trong lĩnh vực này. Kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc dẫn chiếu trong bản mô tả này nói chung được hiểu rõ và thường được sử dụng bằng phương pháp quy ước bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chết theo chương trình 1", "chết tế bào theo chương trình 1", "PD1", "PD-1", "PDCD1", "kháng nguyên PD-1", "PD-1 của người", "hPD-1" và "hPD1" được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ thụ thể chết theo chương trình 1, còn gọi là CD279, và bao gồm biến thể và đồng dạng của PD-1 của người, và thụ thể tương tự có ít nhất một epitop chung với PD-1. PD-1 là chất điều hoà then chốt của ngưỡng đáp ứng miễn dịch và dung nạp miễn dịch ngoại vi. Nó được biểu hiện trên tế bào T được hoạt hoá, tế bào B, bạch cầu đơn nhân, và tế bào tua và liên kết với phối tử của nó PD-L1 và PD-L2. PD-1 của người được mã hoá bởi gen PDCD1. Ví dụ như, trình tự axit amin của PD-1 của người có số truy cập GenBank NP_005009. PD1 có bốn biến thể ghép nối intron được biểu hiện trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC). Do đó, protein PD-1 bao gồm PD-1 độ dài đầy đủ, cũng như biến thể ghép nối intron khác của PD-1, như là PD-1Aex2, PD-1Aex3, PD-1Aex2,3 và PD-1Aex2,3,4. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ bao gồm biến thể bất kỳ và, đồng dạng của PD-1 của người mà được biểu hiện một cách tự nhiên bởi PBMC, hoặc được biểu hiện bởi tế bào được chuyển nhiễm bằng gen PD-1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" mô tả loại phân tử globulin miễn dịch và được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó. Cụ thể là, kháng thể

bao gồm phân tử globulin miễn dịch và mảnh có hoạt tính miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch, nghĩa là, phân tử có chứa vị trí liên kết kháng nguyên. Phân tử globulin miễn dịch có thể là loại bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm bất kỳ. Miền ổn định chuỗi nặng tương ứng với nhóm globulin miễn dịch khác nhau lần lượt được gọi là alpha, delta, epsilon, gamma, và mu. Trừ khi có lưu ý cụ thể khác, thuật ngữ "kháng thể" bao gồm globulin miễn dịch nguyên vẹn và "mảnh kháng thể" hoặc "mảnh liên kết kháng nguyên" (như là Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), chuỗi đơn (scFv), thể đột biến của chúng, phân tử bao gồm phần kháng thể, kháng thể kép, kháng thể mạch thẳng, kháng thể chuỗi đơn, và cấu hình được cải biến khác bất kỳ của phân tử globulin miễn dịch mà bao gồm vị trí nhận biết kháng nguyên có tính đặc hiệu cần thiết, bao gồm biến thể glycosyl hoá của kháng thể, biến thể trình tự axit amin của kháng thể. Tốt hơn là, thuật ngữ "kháng thể" chỉ kháng thể được làm tương thích với người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể nghĩa là một phần của kháng thể, nghĩa là phân tử tương ứng với phần cấu trúc của kháng thể theo sáng chế, mà có khả năng liên kết kháng nguyên đối với PD-1, có thể là ở dạng nguyên thủy của nó; mảnh này đặc biệt có tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên giống như hoặc gần như giống như đối với kháng nguyên này so với tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên của kháng thể bốn chuỗi tương ứng. Có lợi là, mảnh liên kết kháng nguyên có ái lực liên kết tương tự như kháng thể 4 chuỗi tương ứng. Tuy nhiên, mảnh liên kết kháng nguyên mà có ái lực liên kết kháng nguyên giảm đi so với kháng thể 4 chuỗi tương ứng cũng bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Khả năng liên kết kháng nguyên có thể được xác định bằng cách đo ái lực giữa kháng thể và mảnh đích. Mảnh liên kết kháng nguyên này cũng có thể được gọi là "mảnh chức năng" của kháng thể. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể là mảnh mà bao gồm miền thay đổi mạnh của chúng gọi là CDR (vùng xác định tính bổ trợ) hoặc (các) phần của nó bao gồm vị trí nhận biết kháng nguyên, nghĩa là miền ngoại bào của PD1, nhờ đó xác định tính đặc hiệu nhận biết kháng nguyên.

Mảnh "Fab" có chứa miền ổn định của chuỗi nhẹ và miền ổn định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Mảnh Fab' khác với mảnh Fab ở chỗ có bổ sung một vài gốc ở đầu tận cùng carboxyl của miền CH1 của chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều cysteine từ vùng bản lề của kháng thể. Mảnh F(ab') được sản xuất bởi sự phân cắt liên kết disulfua ở

xystein của vùng bản lề của sản phẩm thủy phân bằng pepsin $F(ab')_2$. Sự kết hợp hoá học bổ sung của mảnh kháng thể là thuộc hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Mảnh Fab và mảnh $F(ab')_2$ không có mảnh Fc của kháng thể nguyên vẹn, thanh thải nhanh chóng hơn từ hệ tuần hoàn của động vật, và có thể có ít liên kết mô không đặc hiệu hơn so với kháng thể nguyên vẹn (xem, ví dụ, Wahl et al, 1983, J. Nucl. Med. 24:316).

Mảnh "Fv" là mảnh nhỏ nhất của kháng thể mà có chứa vị trí nhận biết và liên kết đích toàn vẹn. Vùng này gồm có dime của một miền thay đổi chuỗi nặng và một miền thay đổi chuỗi nhẹ kết hợp chặt chẽ với nhau không phải bằng liên kết cộng hoá trị (dime VH-VL). Chính là ở cấu hình này ba CDR của mỗi miền thay đổi tương tác để xác định vị trí liên kết đích trên bề mặt của dime VH-VL. Thông thường, sáu CDR mang lại tính đặc hiệu liên kết đích cho kháng thể. Tuy nhiên, trong một vài trường hợp thậm chí miền thay đổi đơn nhất (hoặc một nửa của Fv chỉ bao gồm ba CDR đặc hiệu đối với đích) có thể có khả năng nhận biết và liên kết đích, mặc dù ở ái lực thấp hơn so với toàn bộ vị trí liên kết.

Mảnh liên kết kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc mảnh liên kết kháng thể "scFv" bao gồm miền VH và miền VL của kháng thể, trong đó miền này có mặt ở dạng chuỗi polypeptit đơn nhất. Nói chung, polypeptit Fv còn bao gồm liên kết polypeptit giữa miền VH và miền VL mà tạo điều kiện cho scFv tạo thành cấu trúc mong muốn để liên kết đích.

"Kháng thể miền đơn nhất" bao gồm miền VH hoặc miền VL đơn nhất có ái lực đủ đối với PD-1. Theo phương án cụ thể, kháng thể miền đơn nhất là kháng thể có kiểu lạc đà {xem, ví dụ, Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38}.

Về cấu trúc, kháng thể có thể có chuỗi nặng (H) và chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua. Có hai loại chuỗi nhẹ, lambda (λ) và kappa (κ). Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chứa vùng ổn định và vùng thay đổi (hoặc "miền"). Vùng thay đổi chuỗi nhẹ và vùng thay đổi chuỗi nặng có chứa vùng "khung" được xen kẽ bởi ba vùng thay đổi mạnh, còn được gọi là "vùng xác định tính hỗ trợ" hoặc "CDR". Phạm vi của vùng khung và CDR đã được xác định (xem, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, và U.S. Department of Health and Human Services, 1991, được viện dẫn ở đây để tham khảo). Tốt hơn là, CDR được xác định theo phương pháp

Kabat. Vùng khung có vai trò tạo thành giàn giáo mà cung cấp tương tác không phải là cộng hoá trị để định vị CDR theo hướng chính xác giữa các chuỗi. CDR chủ yếu chịu trách nhiệm cho việc liên kết với epitop của kháng nguyên. CDR của mỗi chuỗi thường được gọi là "vùng xác định tính hỗ trợ 1" hoặc "CDR1", "CDR2", và "CDR3", được đánh số tuần tự bắt đầu từ đầu tận cùng N. Miền VL và VH của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm bốn vùng khung "FR", mà trong lĩnh vực này và trong bản mô tả này lần lượt được gọi là "vùng khung 1" hoặc "FR1", "FR2", "FR3", và "FR4". Vùng khung này và vùng xác định tính hỗ trợ tốt hơn là được liên kết có điều khiển theo thứ tự sau: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy).

"Chuỗi nặng kháng thể" như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ loại lớn hơn trong số hai loại chuỗi polypeptit có trong cấu dạng kháng thể. CDR của kháng thể chuỗi nặng thường được gọi là "HCDR1", "HCDR2" và "HCDR3". Vùng khung của kháng thể chuỗi nặng thường được gọi là "HFR1", "HFR2", "HFR3" và "HFR4".

"Chuỗi nhẹ kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ loại nhỏ hơn trong số hai loại chuỗi polypeptit có trong cấu dạng kháng thể, chuỗi nhẹ κ và λ chỉ hai isotyp chuỗi nhẹ kháng thể chính. CDR của chuỗi nhẹ kháng thể thường được gọi là "LCDR1", "LCDR2" và "LCDR3". Vùng khung của chuỗi nhẹ kháng thể thường được gọi là "LFR1", "LFR2", "LFR3" và "LFR4".

Về khả năng liên kết của kháng thể với phân tử đích, thuật ngữ động từ "liên kết" hoặc danh động từ "liên kết" chỉ peptit, polypeptit, protein, protein dung hợp và kháng thể (bao gồm mảnh kháng thể) mà nhận biết và tiếp xúc kháng nguyên. Tốt hơn là, thuật ngữ này chỉ tương tác kiểu kháng nguyên-kháng thể. Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", "liên kết đặc hiệu với", "đặc hiệu với", "liên kết chọn lọc" và "chọn lọc đối với" kháng nguyên cụ thể (ví dụ, PD-1) hoặc epitop trên kháng nguyên cụ thể (ví dụ, PD-1) nghĩa là kháng thể nhận biết và liên kết với kháng nguyên cụ thể, nhưng hầu như không nhận biết hoặc liên kết với phân tử khác trong mẫu. Ví dụ, kháng thể mà liên kết đặc hiệu (hoặc ưu tiên) với PD-1 hoặc với epitop PD-1 là kháng thể mà liên kết epitop PD-1 này, ví dụ với ái lực, ái lực tổng lớn hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc với thời gian lâu hơn so với khi liên kết với epitop PD-1 khác hoặc epitop không phải là PD-1. Tốt hơn là, thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" nghĩa là sự tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên với ái lực liên kết bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-7} M. Theo khía cạnh nhất định, kháng thể liên kết với ái lực bằng hoặc

nhỏ hơn 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M.

Như được sử dụng trong bản mô tả này "kháng thể PD-1", "kháng thể kháng PD-1", "PD-1 Ab", "kháng thể đặc hiệu-PD-1" hoặc "kháng PD-1 Ab" hoặc "kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người" được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ kháng thể, như được mô tả trong bản mô tả này, mà liên kết đặc hiệu với PD-1, tốt hơn là PD-1 của người. Theo phương án nhất định, kháng thể liên kết với miền ngoại bào của PD-1. Cụ thể là, kháng thể kháng PD-1 là kháng thể có khả năng liên kết với kháng nguyên PD-1 và ức chế con đường tín hiệu qua trung gian PD-1, nhờ đó tăng cường đáp ứng miễn dịch như là hoạt hoá tế bào T.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" dự định để chỉ kháng thể trong đó trình tự CDR thu được từ dòng tế bào mầm của loài động vật có vú khác, như là chuột, đã được ghép vào trình tự khung của người (ví dụ kháng thể khảm có chứa trình tự tối thiểu thu được từ kháng thể không phải của người). "Dạng được làm tương thích với người" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, cũng chỉ kháng thể mà đã được làm tương thích với người. Kháng thể được làm tương thích với người nói chung là globulin miễn dịch của người (kháng thể tiếp nhận) trong đó gốc từ một hoặc nhiều CDR được thay thế bằng gốc từ ít nhất một CDR của kháng thể không phải của người (kháng thể cho) đồng thời duy trì tính đặc hiệu, ái lực, và khả năng mong muốn của kháng thể gốc ban đầu. Kháng thể cho có thể là kháng thể không phải của người thích hợp bất kỳ, như là kháng thể của chuột nhắt, chuột cống, thỏ, gà hoặc động vật linh trưởng không phải là người có tính đặc hiệu, ái lực, hoặc tác dụng sinh học mong muốn. Trong một vài trường hợp, gốc vùng khung được chọn của kháng thể tiếp nhận được thay thế bằng gốc vùng khung của kháng thể cho. Theo cách khác, gốc vùng khung được chọn của kháng thể cho được thay thế bằng gốc vùng khung của kháng thể của người hoặc kháng thể được làm tương thích với người. Việc cải biến vùng khung bổ sung có thể được thực hiện trong trình tự khung của người. Kháng thể được làm tương thích với người do đó cũng có thể bao gồm gốc mà không tìm thấy ở kháng thể tiếp nhận hoặc kháng thể cho. Việc cải biến axit amin này có thể được thực hiện để điều chỉnh tinh hơn nữa chức năng của kháng thể và/hoặc gia tăng quá trình làm tương thích với người. Thuật ngữ "thay đổi axit amin" hoặc "cải biến axit amin" nghĩa là thay đổi trình tự axit amin của polypeptit. "Cải biến axit amin" bao gồm thay thế, cài xen và/hoặc làm khuyết đoạn ở trình tự polypeptit. Thuật ngữ

"thay thế axit amin" hoặc "thay thế" ở đây nghĩa là thay thế axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit gốc bằng một axit amin khác. Thuật ngữ "cài xen axit amin" hoặc "cài xen" nghĩa là bổ sung axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit gốc. Thuật ngữ "làm khuyết đoạn axit amin" hoặc "làm khuyết đoạn" nghĩa là loại bỏ axit amin ở vị trí cụ thể trong trình tự polypeptit gốc. Thay thế axit amin có thể là bảo toàn. Thay thế bảo toàn là thay thế một gốc axit amin đã cho bằng một gốc khác có mạch bên ("nhóm R") có tính chất hoá học tương tự (ví dụ, điện tích, cỡ lớn và/hoặc tính kỵ nước). Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vị trí axit amin" hoặc "số chỉ vị trí axit amin" là được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ vị trí của axit amin cụ thể trong trình tự axit amin, nói chung được quy định với mã một chữ cái cho axit amin. Axit amin đầu tiên trong trình tự axit amin (nghĩa là bắt đầu từ đầu tận cùng N) nên được xem là có vị trí 1.

Thay thế bảo toàn là thay thế gốc axit amin đã cho bằng một gốc có mạch bên ("nhóm R") có tính chất hoá học tương tự (ví dụ, điện tích, cỡ lớn và/hoặc tính kỵ nước). Nói chung, thay thế axit amin bảo toàn sẽ không làm thay đổi đáng kể tính chất chức năng của protein. Thay thế bảo toàn và quy tắc tương ứng là được mô tả rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thay thế bảo toàn có thể được xác định bằng thay thế trong phạm vi nhóm axit amin trong bảng dưới đây:

Bảng A – Gốc axit amin

Nhóm axit amin	Gốc axit amin
Gốc axit	ASP và GLU
Gốc bazơ	LYS, ARG, và HIS
Gốc không tích điện ưa nước	SER, THR, ASN, và GLN
Gốc không tích điện béo	GLY, ALA, VAL, LEU, và ILE
Gốc không tích điện không phân cực	CYS, MET, và PRO
Gốc thơm	PHE, TYR, và TRP

Bảng B – Nhóm thay thế gốc axit amin bảo toàn khác

1	Alanin (A)	Serin (S)	Threonin (T)
2	Axit aspartic (D)	Axit Glutamic (E)	
3	Asparagin (N)	Glutamin (Q)	
4	Arginin (R)	Lysin (K)	
5	Isoleuxin (I)	Ileuxin (L)	Methionin (M)
6	Phenylalanin (F)	Tyrosin (Y)	Tryptophan (W)

Bảng C – Phân loại về vật lý và chức năng khác của gốc axit amin

Gốc chứa nhóm rượu	S và T
Gốc béo	I, L, V, và M
Gốc kết hợp xycloalkenyl	F, H, W, và Y
Gốc kỵ nước	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, và Y
Gốc tích điện âm	D và E
Gốc phân cực	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, và T
Gốc nhỏ	A, C, D, G, N, P, S, T, và V
Gốc rất nhỏ	A, G, và S
Gốc tham gia vào tạo thành mạch uốn	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, và T
Gốc linh hoạt	E, Q, T, K, S, G, P, D, E, và R

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể được phân lập" là kháng thể mà đã được phân tách và/hoặc thu hồi từ thành phần môi trường tự nhiên của nó. Kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể in situ trong tế bào tái tổ hợp, mà ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của kháng thể là không có mặt. Theo phương án nhất định, kháng thể được tinh chế đến đồng nhất và/hoặc đến độ tinh khiết lớn hơn 90%, 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, điện di (ví dụ, SDS-PAGE, tập trung đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo) trong

điều kiện khử hoặc không khử.

Thuật ngữ “có nguồn gốc từ” và “thu được từ” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ hợp chất có cấu trúc thu được từ cấu trúc của hợp chất gốc hoặc protein gốc và cấu trúc của nó là đủ tương tự với cấu trúc được đề cập ở đây và dựa vào tính tương tự đó, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ cho là chúng có tính chất, hoạt tính và tính hữu dụng giống hoặc tương tự với hợp chất được yêu cầu bảo hộ. Ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người thu được từ kháng thể của chuột chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà có chung tính chất tương tự với kháng thể của chuột, ví dụ nhận biết cùng epitop, chia sẻ VH và VL tương tự với gốc được cải biến tham gia và/hoặc làm tăng độ tương thích với người của kháng thể.

Thuật ngữ "điều trị" chỉ tác động bất kỳ được dự định để cải thiện tình trạng sức khoẻ của bệnh nhân như là trị liệu, ngăn ngừa, phòng ngừa và làm chậm bệnh hoặc triệu chứng của bệnh. Thuật ngữ này chỉ cả việc điều trị chữa khỏi và/hoặc điều trị phòng ngừa bệnh. Điều trị chữa khỏi được xác định là điều trị dẫn đến chữa khỏi hoặc điều trị làm giảm nhẹ, cải thiện và/hoặc loại trừ, làm giảm và/hoặc làm ổn định một bệnh hoặc triệu chứng của bệnh hoặc sự đau đớn mà bệnh này gây ra một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Điều trị phòng ngừa bao gồm cả điều trị dẫn đến ngăn ngừa bệnh và điều trị làm giảm và/hoặc làm chậm sự tiến triển và/hoặc khả năng mắc bệnh hoặc nguy cơ mắc bệnh. Theo phương án nhất định, thuật ngữ này chỉ sự cải thiện hoặc tiết trừ một bệnh, rối loạn, bệnh nhiễm khuẩn hoặc triệu chứng kèm theo của nó. Theo phương án khác, thuật ngữ này chỉ việc làm giảm tối thiểu sự lan rộng hoặc tiến triển xấu đi của bệnh ung thư. Điều trị theo sáng chế không nhất thiết ám chỉ việc điều trị 100% hoặc điều trị hoàn toàn. Mà, có các mức độ điều trị thay đổi mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này nhận biết được là có lợi ích tiềm năng hoặc tác dụng trị liệu tiềm năng. Tốt hơn là, thuật ngữ “điều trị” chỉ việc áp dụng hoặc sử dụng chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều hoạt chất cho đối tượng mắc rối loạn/bệnh, ví dụ có liên quan đến con đường truyền tín hiệu qua trung gian PD-1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “rối loạn” hoặc “bệnh” chỉ cơ quan, bộ phận, cấu trúc hoặc hệ thống hoạt động không đúng cách của cơ thể do tác động của sai sót di truyền hoặc phát triển, bệnh nhiễm khuẩn, độc tố, suy dinh dưỡng hoặc mất cân bằng dinh dưỡng, độc tính hoặc yếu tố môi trường không thuận lợi. Tốt hơn là, thuật ngữ này chỉ rối loạn sức khoẻ hoặc bệnh ví dụ bệnh tật mà làm gián đoạn

chức năng vật lý hoặc tinh thần bình thường. Tốt hơn là, thuật ngữ rối loạn chỉ bệnh miễn dịch và/hoặc bệnh viêm nhiễm mà ảnh hưởng đến động vật và/hoặc người, như là bệnh ung thư.

Thuật ngữ "bệnh miễn dịch", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ tình trạng ở đối tượng đặc trưng ở chỗ có tổn thương tế bào, mô và/hoặc cơ quan gây ra bởi phản ứng miễn dịch của đối tượng này đối với tế bào, mô và/hoặc cơ quan của chính mình. Thuật ngữ "bệnh viêm nhiễm" chỉ tình trạng ở đối tượng đặc trưng ở chỗ có viêm nhiễm, ví dụ, viêm nhiễm mãn tính. Rối loạn tự miễn có thể có kèm theo viêm nhiễm hoặc không. Hơn nữa, viêm nhiễm có thể là do rối loạn tự miễn hoặc không.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" như được sử dụng trong bản mô tả này được xác định là bệnh được đặc trưng bởi sự tăng trưởng nhanh và mất kiểm soát của tế bào bất thường. Tế bào ung thư có thể lây lan tại chỗ hoặc qua hệ tuần hoàn và bạch huyết đến bộ phận khác của cơ thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh có liên quan đến hoặc kèm theo PD-1”, “bệnh ung thư dương tính PD-1” hoặc “bệnh nhiễm khuẩn dương tính PD-1” dự định để chỉ bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm khuẩn (ví dụ gây ra bởi virus và/hoặc vi khuẩn) mà là do biểu hiện PD-1 hoặc có triệu chứng/đặc tính của biểu hiện PD-1, nghĩa là tình trạng bất kỳ gây ra bởi, bị làm trầm trọng bởi, hoặc theo cách khác có liên quan đến biểu hiện hoặc hoạt tính tăng hoặc giảm của PD-1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng”, “vật chủ”, “cá thể,” hoặc “bệnh nhân” chỉ người, bao gồm người trưởng thành và trẻ em.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dược phẩm” chỉ chế phẩm của một hoặc nhiều hoạt chất, như là bao gồm kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế, với thành phần hoá chất khác tùy ý như là chất mang và tá dược thích hợp về mặt sinh lý. Mục đích của dược phẩm là để tạo thuận lợi cho việc sử dụng hoạt chất cho sinh vật. Chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng thích hợp cho đường dùng hoặc sử dụng quy ước bất kỳ. Theo một phương án, “chế phẩm” thường dự định là kết hợp hoạt chất, ví dụ, hợp chất hoặc chế phẩm, và chất mang, chất trợ (ví dụ, chất hoặc chất đánh dấu có thể phát hiện) hoặc chất hoạt tính có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên, như là chất phụ trợ, chất pha loãng, chất liên kết, chất làm ổn định, chất đệm, muối, dung môi ưa chất béo, chất bảo quản, chất phụ trợ hoặc chất tương tự và bao gồm

chất mang được dụng. "Chất dẫn chấp nhận được" hoặc "chất mang chấp nhận được" như được đề cập ở đây, là hợp chất hoặc tổ hợp các hợp chất bất kỳ đã biết mà thuộc hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này là hữu ích trong bào chế được phẩm.

"Lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu trị liệu" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ lượng hoạt chất cần thiết để mang lại tác dụng trị liệu cho đối tượng, một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất khác, ví dụ lượng hoạt chất mà cần thiết để điều trị bệnh hoặc rối loạn đích, hoặc để tạo ra tác dụng mong muốn. "Lượng hữu hiệu" sẽ thay đổi tùy thuộc vào hoạt chất, bệnh và mức độ nghiêm trọng của nó, đặc điểm của đối tượng cần được điều trị bao gồm tuổi tác, tình trạng thể chất, chiều cao, giới tính và cân nặng, thời gian điều trị, bản chất của liệu pháp sử dụng đồng thời (nếu có), đường dùng cụ thể và yếu tố tương tự thuộc hiểu biết và chuyên môn của người hành nghề y. Yếu tố này là thuộc hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và có thể xác định chỉ bằng thực nghiệm thường quy. Nói chung tốt hơn là liều dùng tối đa của thành phần riêng lẻ hoặc tổ hợp của chúng được sử dụng, nghĩa là liều dùng an toàn cao nhất theo quyết định y khoa hợp lý.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuốc" chỉ chất hoặc chế phẩm bất kỳ có tính chất chữa trị hoặc ngăn ngừa đối với rối loạn hoặc bệnh.

Thuật ngữ "ở dạng kết hợp" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ sử dụng hơn một liệu pháp (ví dụ, chất phòng ngừa và/hoặc chất trị liệu). Sử dụng thuật ngữ "ở dạng kết hợp" không giới hạn thứ tự mà các liệu pháp (ví dụ, chất phòng ngừa và/hoặc chất trị liệu) được sử dụng cho đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn.

Thuật ngữ "polynucleotit", "axit nucleic" và "trình tự axit nucleic" là tương đương và chỉ dạng polyme của nucleotit có độ dài bất kỳ, ví dụ ARN hoặc ADN hoặc chất tương tự của chúng. Axit nucleic (ví dụ, thành phần, hoặc phần, axit nucleic) của sáng chế có thể có trong tự nhiên, được cải biến hoặc được tạo ra bằng công nghệ di truyền. Axit nucleic được tạo ra bằng công nghệ di truyền bao gồm axit nucleic tái tổ hợp và axit nucleic tổng hợp. "Axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể kháng PD1" chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hoá chuỗi nặng kháng thể và chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc mảnh của chúng), bao gồm phân tử axit nucleic này trong một vector đơn nhất hoặc các vector riêng rẽ, và phân tử axit nucleic này có mặt ở một hoặc nhiều

vị trí trong tế bào chủ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “cấu trúc axit nucleic”, “plasmid”, và “vector” là tương đương và chỉ phân tử axit nucleic mà có vai trò chuyển trình tự axit nucleic hành khách, như là ADN hoặc ARN, vào tế bào chủ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” dự định bao gồm tế bào riêng lẻ hoặc môi trường nuôi cấy tế bào mà có thể là hoặc đã là thể nhận vector, phân tử axit nucleic ngoại sinh, và polynucleotit mã hoá cấu trúc kháng thể theo sáng chế; và/hoặc thể nhận chính cấu trúc kháng thể. Việc đưa vật liệu tương ứng này vào tế bào có thể được thực hiện bằng cách biến nạp, chuyển nhiễm và cách tương tự. Thuật ngữ “tế bào chủ” cũng dự định bao gồm thể hệ con cháu hoặc thể hệ con cháu tiềm năng của một tế bào đơn nhất. Tế bào chủ bao gồm tế bào vi khuẩn, vi sinh vật, thực vật và động vật.

“Tế bào miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tế bào tham gia vào tính miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng ví dụ như là bạch cầu có nguồn gốc từ tế bào gốc tạo máu (HSC) được sản xuất ở tủy xương, tế bào lympho (tế bào T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên (NK) và tế bào giết tự nhiên T (NKT)) và tế bào có nguồn gốc tủy (bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa eosin, bạch cầu ưa basơ, bạch cầu đơn nhân to, đại thực bào, tế bào tua). Cụ thể là, tế bào miễn dịch có thể được lựa chọn trong danh mục không toàn diện bao gồm tế bào B, tế bào T, cụ thể là tế bào T CD4⁺ và tế bào T CD8⁺, tế bào NK, tế bào NKT, tế bào APC, tế bào tua và bạch cầu đơn nhân to. “Tế bào T” như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm ví dụ tế bào T CD4⁺, tế bào T CD8⁺, tế bào T hỗ trợ loại 1, tế bào T hỗ trợ loại 2, tế bào T hỗ trợ loại 17 và tế bào T ức chế.

Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” chỉ tác dụng của, ví dụ, tế bào lympho, tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào thực bào, tế bào bạch cầu hạt, và đại phân tử hoà tan được sản xuất bởi tế bào nêu trên hoặc gan (bao gồm kháng thể, cytokin, và bổ thể) mà dẫn đến phá hoại chọn lọc, phá huỷ, hoặc thải trừ mầm bệnh xâm nhập, tế bào hoặc mô bị nhiễm mầm bệnh, tế bào ung thư từ cơ thể người, hoặc trong trường hợp tính tự miễn dịch hoặc viêm nhiễm bệnh lý, tế bào hoặc mô của người bình thường.

Thuật ngữ “chất đối kháng” như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ chất mà phong bế hoặc giảm hoạt tính hoặc chức năng của một chất khác. Cụ thể là, thuật ngữ này chỉ kháng thể mà liên kết với thụ thể tế bào (ví dụ PD-1) như là chất tham chiếu (ví dụ PD-L1 và/hoặc PD-L2), ngăn không cho tế bào này có tất cả hoặc một phần của tác

dụng sinh học bình thường của nó (ví dụ tạo ra môi trường vi lượng ức chế miễn dịch). Hoạt tính chất đối kháng của kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được đánh giá bằng ELISA cạnh tranh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "được phân lập" chỉ ra là chất được nêu (ví dụ, kháng thể, polypeptit, axit nucleic, v.v.) hầu như được tách ra khỏi, hoặc được làm giàu so với, vật liệu khác mà cùng với vật liệu này chất được nêu có trong tự nhiên. Cụ thể là, kháng thể "được phân lập" là kháng thể mà đã được nhận diện và tách và/hoặc thu hồi từ thành phần môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được phân lập được tinh chế (1) đến lớn hơn 75% khối lượng của kháng thể như được xác định bằng phương pháp Lowry, hoặc (2) đến đồng nhất theo SDS-PAGE trong điều kiện khử hoặc không khử. Kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể in situ trong tế bào tái tổ hợp do ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của kháng thể sẽ không có mặt. Tuy nhiên, kháng thể được phân lập thường sẽ được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế.

Thuật ngữ "và/hoặc" như được sử dụng trong bản mô tả này được coi là đề cập cụ thể đến một trong hai dấu hiệu hoặc thành phần được xác định cụ thể cùng với nhau hoặc không cùng với nhau. Ví dụ, "A và/hoặc B" được coi là đề cập cụ thể đến lần lượt (i) A, (ii) B và (iii) A và B, đúng như là mỗi phương án được đưa ra một cách riêng rẽ.

Thuật ngữ dạng số ít không xác định có thể chỉ một hoặc nhiều danh từ yếu tố mà nó bỏ nghĩa (ví dụ, "thuốc thử" có nghĩa là một hoặc nhiều thuốc thử) trừ khi ngữ cảnh rõ ràng là một trong số yếu tố này hoặc nhiều hơn một yếu tố được mô tả.

Thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng trong bản mô tả này liên quan đến giá trị bất kỳ và tất cả các giá trị (bao gồm cận dưới và cận trên của khoảng số) nghĩa là giá trị bất kỳ có khoảng sai lệch chấp nhận lên đến $\pm 10\%$ (ví dụ, $\pm 0,5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 1,5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 2,5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 3,5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 4,5\%$, $\pm 5\%$, $\pm 5,5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 6,5\%$, $\pm 7\%$, $\pm 7,5\%$, $\pm 8\%$, $\pm 8,5\%$, $\pm 9\%$, $\pm 9,5\%$). Sử dụng thuật ngữ "khoảng" khi bắt đầu một chuỗi giá trị bỏ nghĩa cho mỗi giá trị trong số các giá trị này (nghĩa là "khoảng 1, 2 và 3" chỉ khoảng 1, khoảng 2 và khoảng 3). Hơn nữa, khi danh mục các giá trị được mô tả ở đây (ví dụ about 50%, 60%, 70%, 80%, 85% hoặc 86%) danh mục này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và giá trị phân số của chúng (ví dụ, 54%, 85,4%).

Kháng thể được làm tương thích với người kháng lại PD-1 của người

Được đề xuất ở đây là kháng thể được làm tương thích với người mà liên kết với PD-1 của người. Theo một vài khía cạnh, kháng thể được làm tương thích với người liên kết đặc hiệu với PD-1 của người, tốt hơn là với miền ngoại bào của PD-1 của người. Theo một vài khía cạnh, kháng thể được làm tương thích với người liên kết chọn lọc với một hoặc nhiều PD-1 của người có độ dài đầy đủ, PD-1Aex2, PD-1Aex3, PD-1Aex2,3 và PD-1Aex2,3,4.

Theo một vài khía cạnh, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người là kháng thể được phân lập, cụ thể là kháng thể được phân lập phi tự nhiên. Kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người được phân lập có thể được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế. Theo phương án nhất định, kháng thể được phân lập được tinh chế đến ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% khối lượng. Theo phương án nhất định, kháng thể được phân lập được cung cấp dưới dạng dung dịch bao gồm ít nhất là 85%, 90%, 95%, 98%, từ 99% đến 100% khối lượng của kháng thể, phần còn lại của khối lượng này bao gồm khối lượng của chất tan khác được hoà tan trong dung môi.

Dạng được làm tương thích với người của kháng thể kháng PD1 theo sáng chế có thể bao gồm globulin miễn dịch của nhóm bất kỳ, như là IgD, IgE, IgG, IgA, hoặc IgM (hoặc phân nhóm của chúng), chuỗi globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó (như là Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv hoặc trình tự con liên kết kháng nguyên khác của kháng thể) mà có chứa trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải của người (ví dụ của chuột) nhằm đích PD-1 của người. Tốt hơn là, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người theo sáng chế có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, tốt hơn là từ IgG4.

Tốt hơn là, kháng thể được làm tương thích với người kháng lại PD-1 của người là kháng thể đơn dòng.

Tốt hơn là, kháng thể này có khả năng phong bế hoặc ức chế tương tác giữa PD-1 và ít nhất một trong số phối tử của nó (ví dụ PD-L1 và/hoặc PD-L2). Khả năng “phong bế liên kết” hoặc “phong bế tương tác” hoặc “ức chế tương tác” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ khả năng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên ngăn không cho tương tác liên kết giữa hai phân tử (ví dụ PD-1 và phối tử PD-L1 và/hoặc PD-L2 của nó) đến mức độ có thể phát hiện bất kỳ.

Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là chất đối kháng liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người, tốt hơn nữa là của PD-L1 và PD-L2 của người với PD-1 của người.

Theo phương án nhất định, kháng thể kháng hPD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên ức chế tương tác liên kết giữa PD-1 và ít nhất một trong số phối tử của nó (ví dụ PD-L1 và/hoặc PD-L2, tốt hơn là PD-L1 và PD-L2) ở mức ít nhất là 50%. Theo phương án nhất định, mức ức chế này có thể là lớn hơn 60%, lớn hơn 70%, lớn hơn 80%, hoặc lớn hơn 90%.

“Vùng xác định tính hỗ trợ” hoặc “CDR” đã biết trong lĩnh vực này chỉ trình tự không liên tục của axit amin trong phạm vi vùng thay đổi của kháng thể, mà mang lại tính đặc hiệu kháng nguyên và ái lực liên kết kháng nguyên. Ranh giới trình tự axit amin chính xác của một CDR đã cho có thể xác định dễ dàng bằng cách sử dụng cách bất kỳ trong số cách đã biết, bao gồm cách do Kabat và đồng tác giả mô tả, (Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991) sơ đồ đánh số "Kabat"); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol, 273:927-948 (sơ đồ đánh số "Chothia"); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 (sơ đồ đánh số "Contact"); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77 (sơ đồ đánh số "IMGT"); và Honegge và Pluckthun, J. Mol. Biol, 2001, 309:657-70 (sơ đồ đánh số "AHO"). Trừ khi có quy định khác, sơ đồ đánh số được sử dụng để nhận diện CDR cụ thể trong bản mô tả này là sơ đồ đánh số Kabat.

Vùng CDR của kháng thể được làm tương thích với người là thu được từ kháng thể của chuột và đã được làm tối ưu để i) tạo ra kháng thể được làm tương thích với người an toàn có mức độ tương thích với người rất cao; và ii) làm tăng tính chất kháng thể, cụ thể hơn là năng suất cao hơn.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(i) miền thay đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, HCDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 và HCDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9, và

(ii) miền thay đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, LCDR2 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit

amin được nêu trong SEQ ID NO: 13 và LCDR3 bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm vùng khung, cụ thể là vùng khung vùng thay đổi chuỗi nặng (HFR) HFR1, HFR2, HFR3 và HFR4 và vùng khung vùng thay đổi chuỗi nhẹ (LFR) LFR1, LFR2, LFR3 và LFR4.

Tốt hơn là, kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm vùng khung của người hoặc được làm tương thích với người. "Khung tiếp nhận của người" cho mục đích ở đây là khung bao gồm trình tự axit amin của khung miền thay đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền thay đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đồng thuận của người, như được định nghĩa dưới đây. Khung tiếp nhận của người thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đồng thuận của người có thể bao gồm trình tự axit amin giống nhau, hoặc có thể có chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo phương án nhất định, số lượng thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo phương án nhất định, khung của người tiếp nhận VL là tương đồng về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch của người VL hoặc trình tự khung đồng thuận của người. "Khung đồng thuận của người" là khung mà biểu thị gốc axit amin hay gặp nhất trong chọn lọc các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người.

Cụ thể là, kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm vùng khung vùng thay đổi chuỗi nặng (HFR) HFR1, HFR2, HFR3 và HFR4 tương ứng bao gồm trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 37, 38, 39 và 40, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ vị trí 27, 29 và 32 của HFR3, nghĩa là, được nêu trong SEQ ID NO: 40. Tốt hơn là, kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm HFR1 được nêu trong SEQ ID NO: 37, HFR2 được nêu trong SEQ ID NO: 38, HFR3 được nêu trong SEQ ID NO: 39 và HFR4 được nêu trong SEQ ID NO: 40.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể kháng PD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm vùng khung vùng thay đổi chuỗi nhẹ (LFR) LFR1, LFR2, LFR3 và LFR4 tương ứng bao gồm trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 41, 42, 43 và 44, tùy

ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng. Tốt hơn là, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm LFR1 được nêu trong SEQ ID NO: 41, LFR2 được nêu trong SEQ ID NO: 42, LFR3 được nêu trong SEQ ID NO: 43 và LFR4 được nêu trong SEQ ID NO: 44.

Miền VL và VH của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm bốn vùng khung bị ngắt quãng bởi ba vùng xác định tính hỗ trợ tốt hơn là được liên kết có điều khiển theo thứ tự sau đây: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy).

Theo phương án thứ nhất, kháng thể được làm tương thích với người kháng PD-1 của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

(a) vùng thay đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ các vị trí 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 và 112 được nêu trong SEQ ID NO: 21;

(b) vùng thay đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ các vị trí 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 và 105 được nêu trong SEQ ID NO: 24.

Tốt hơn là, cải biến là thay thế, cụ thể là thay thế bảo toàn.

Tốt hơn là, kháng thể được làm tương thích với người kháng PD-1 của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: (a) vùng thay đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; và (b) vùng thay đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24.

Theo một phương án, chuỗi nặng (CH) và chuỗi nhẹ (CL) bao gồm trình tự VL và trình tự VH như mô tả ở trên.

Theo phương án cụ thể, kháng thể kháng PD-1 của người hoặc mảnh liên kết

kháng nguyên của nó bao gồm: (a) chuỗi nặng bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 31, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ các vị trí 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 và 112 được nêu trong SEQ ID NO: 31, và (b) chuỗi nhẹ bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 34, tùy ý với một, hai hoặc ba cải biến được chọn từ thay thế, bổ sung, khuyết đoạn và tổ hợp bất kỳ của chúng ở vị trí bất kỳ trừ các vị trí 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 và 105 được nêu trong SEQ ID NO: 34.

Tốt hơn là, cải biến là thay thế, cụ thể là thay thế bảo toàn.

Tốt hơn là, kháng thể kháng PD-1 của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: (a) chuỗi nặng bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 31, và (b) chuỗi nhẹ bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 34.

Fc và vùng bản lề

Một vài nghiên cứu phát triển kháng thể trị liệu đã dẫn đến việc tạo ra vùng Fc bằng công nghệ di truyền để tối ưu hoá tính chất của kháng thể cho phép tạo ra phân tử mà thích hợp hơn với hoạt tính được lý cần thiết của chúng. Vùng Fc của kháng thể điều tiết thời gian bán thải trong huyết thanh và chức năng hiệu ứng của nó, như là độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), độc tính tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP). Một vài đột biến nằm ở phần ranh giới giữa miền CH2 và miền CH3, như là T250Q/M428L và M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F, đã chứng tỏ làm tăng ái lực liên kết với FcRn và thời gian bán thải của IgG1 in vivo. Tuy nhiên, không luôn luôn có mối quan hệ trực tiếp giữa khả năng liên kết FcRn gia tăng và thời gian bán thải được cải thiện. Một cách để cải thiện hiệu lực của kháng thể trị liệu là làm tăng khả năng tồn lưu trong huyết thanh của nó, nhờ đó cho nồng độ trong máu cao hơn, sử dụng tần suất ít hơn và liều dùng giảm đi. Tạo ra vùng Fc bằng công nghệ di truyền có thể là mong muốn để làm giảm hoặc làm tăng chức năng hiệu ứng của kháng thể. Đối với kháng thể mà nhằm đích phân tử bề mặt tế bào, đặc biệt là phân tử trên tế bào miễn dịch, làm mất chức năng hiệu ứng là cần thiết. Ngược lại, đối với kháng thể dự định để sử dụng trong khoa ung thư, làm tăng chức năng hiệu ứng

có thể cải thiện hoạt tính trị liệu. Bốn isotyp IgG của người liên kết thụ thể Fcγ hoạt hoá (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), thụ thể FcγRIIb ức chế, và thành phần bổ thể thứ nhất (C1q) với các ái lực khác nhau, cho chức năng hiệu ứng rất khác nhau. Liên kết của IgG với FcγR hoặc C1q tùy thuộc vào gốc nằm ở vùng bản lề và miền CH2. Hai vùng của miền CH2 là quan trọng cho liên kết FcγR và C1q, và có trình tự độc nhất trong IgG2 và IgG4.

Kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế tùy ý bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định của globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng của globulin miễn dịch của người hoặc được làm tương thích với người. Tốt hơn là, vùng Fc là một phần của kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này. Thuộc hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, việc lựa chọn isotyp IgG của miền ổn định chuỗi nặng tập trung vào việc liệu chức năng đặc hiệu có cần thiết hay không và nhu cầu có thời gian bán thải in vivo thích hợp. Ví dụ, kháng thể được thiết kế để tiêu diệt chọn lọc tế bào ung thư thường cần có isotyp hoạt tính mà cho phép hoạt hoá bổ thể và tiêu diệt tế bào qua trung gian chất hiệu ứng bởi độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể. Cả hai isotyp IgG1 và IgG3 của người (thời gian bán thải ngắn hơn) đều đáp ứng tiêu chí này, cụ thể là isotyp IgG1 của người (kiểu hoang và biến thể). Cụ thể là, tùy thuộc vào isotyp IgG của miền ổn định chuỗi nặng (cụ thể là isotyp IgG1 kiểu hoang của người và isotyp IgG1 biến thể), kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người của sáng chế có thể có độc tính tế bào đối với tế bào biểu hiện PD-1 thông qua cơ chế CDC, ADCC và/hoặc ADCP. Thực tế là, vùng có thể kết tinh mảnh (Fc) tương tác với phân tử phụ trợ khác nhau để điều tiết các chức năng hiệu ứng gián tiếp như là độc tính tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào của tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) và độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Theo phương án được ưu tiên, vùng ổn định là thu được từ chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, hoặc nhóm khác. Theo khía cạnh khác, vùng ổn định của người là được chọn từ nhóm gồm có IgG1, IgG2, IgG2, IgG3 và IgG4. Tốt hơn là, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người bao gồm vùng Fc của IgG1 hoặc IgG4. Còn tốt hơn nữa là, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người bao gồm vùng Fc của IgG4 có S228P mà làm ổn định IgG4.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 bao gồm vùng Fc được cắt ngắn hoặc mảnh của vùng Fc này. Theo một phương án, vùng ổn định bao gồm miền CH2. Theo

một phương án khác, vùng ổn định bao gồm miền CH2 và miền CH3 hoặc bao gồm bản lề-CH2-CH3. Theo cách khác, vùng ổn định có thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần của vùng bản lề, miền CH2 và/hoặc miền CH3. Theo phương án được ưu tiên, vùng ổn định có chứa miền CH2 và/hoặc miền CH3 thu được từ chuỗi nặng của IgG4 của người.

Theo một phương án khác, vùng ổn định bao gồm miền CH2 và ít nhất một phần của vùng bản lề. Vùng bản lề có thể thu được từ chuỗi nặng của globulin miễn dịch, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, hoặc các nhóm khác. Tốt hơn là, vùng bản lề là thu được từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người, hoặc các nhóm thích hợp khác, được gây đột biến hoặc không. Tốt hơn nữa là, vùng bản lề là thu được từ chuỗi nặng IgG1 của người. Theo một phương án, vùng ổn định bao gồm miền CH2 thu được từ isotyp kháng thể thứ nhất và vùng bản lề thu được từ isotyp kháng thể thứ hai. Theo phương án cụ thể, miền CH2 là thu được từ chuỗi nặng IgG2 hoặc IgG4 của người, trong khi đó vùng bản lề là thu được từ chuỗi nặng IgG1 của người được biến đổi.

Theo một phương án, vùng ổn định có chứa đột biến mà làm giảm ái lực đối với thụ thể Fc hoặc làm giảm chức năng hiệu ứng của Fc. Ví dụ, vùng ổn định có thể có chứa đột biến mà loại bỏ vị trí glycosyl hoá trong vùng ổn định của chuỗi nặng IgG.

Theo một phương án khác, vùng ổn định bao gồm miền CH2 và ít nhất một phần của vùng bản lề. Vùng bản lề có thể thu được từ chuỗi nặng của globulin miễn dịch, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, hoặc các nhóm khác. Tốt hơn là, vùng bản lề là thu được từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 của người, hoặc các nhóm thích hợp khác. Vùng bản lề IgG1 có ba xystein, hai trong số này tham gia vào liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Các xystein này cho phép tạo thành liên kết disulfua ổn định và hiệu quả giữa các phần Fc. Do đó, vùng bản lề được ưu tiên của sáng chế là thu được từ IgG1, tốt hơn nữa là từ IgG1 của người. Theo phương án nhất định, xystein thứ nhất trong vùng bản lề IgG1 của người được gây đột biến thành một axit amin khác, tốt hơn là serin. Vùng bản lề isotyp IgG2 có bốn liên kết disulfua mà có xu hướng thúc đẩy sự oligome hoá và có thể là liên kết disulfua sai trong khi bài tiết ở hệ tái tổ hợp. Vùng bản lề thích hợp có thể thu được từ bản lề IgG2; mỗi trong số hai xystein thứ nhất lần lượt tốt hơn là được gây đột biến thành một axit amin khác. Vùng bản lề của IgG4 đã biết là tạo thành liên kết disulfua giữa các chuỗi không hiệu quả. Tuy nhiên, vùng bản lề thích hợp cho sáng chế có thể là thu được từ vùng bản lề IgG4, tốt hơn là có chứa đột biến mà tăng cường sự tạo thành liên kết disulfua đúng giữa các gốc thu được từ chuỗi nặng

(Angal S, et al. (1993) Mol. Immunol., 30:105-8). Tốt hơn nữa là, vùng bản lề là thu được từ chuỗi nặng IgG4 của người.

Theo một phương án, vùng ổn định bao gồm miền CH2 thu được từ isotyp kháng thể thứ nhất và vùng bản lề thu được từ isotyp kháng thể thứ hai. Theo phương án cụ thể, miền CH2 là thu được từ chuỗi nặng IgG4 của người, đồng thời vùng bản lề là thu được từ chuỗi nặng IgG1 của người được biến đổi.

Theo sáng chế, vùng ổn định có thể có chứa miền CH2 và/hoặc miền CH3 và vùng bản lề mà thu được từ các isotyp kháng thể khác nhau, nghĩa là, vùng ổn định lai. Ví dụ, theo một phương án, vùng ổn định có chứa miền CH2 và/hoặc miền thu được từ IgG2 hoặc IgG4 và vùng bản lề đột biến thu được từ IgG1. Theo cách khác, vùng bản lề đột biến từ một phân nhóm IgG khác được sử dụng trong vùng ổn định lai. Ví dụ, dạng đột biến của vùng bản lề IgG4 mà cho phép liên kết disulfua hiệu quả giữa hai chuỗi nặng có thể được sử dụng. Bản lề đột biến cũng có thể thu được từ bản lề IgG2 trong đó hai xystein thứ nhất lần lượt được gây đột biến thành một axit amin khác. Việc lắp ráp vùng ổn định lai này đã được mô tả trong công bố Patent Mỹ số 20030044423, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Theo một phương án, theo sáng chế, vùng ổn định có thể có chứa CH2 và/hoặc CH3 có một trong số đột biến được mô tả trong Bảng D dưới đây, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Bảng D: Miền Fc được tạo ra bằng công nghệ di truyền của người thích hợp của kháng thể

Fc được tạo ra bằng công nghệ di truyền	Isotyp	Đột biến	Liên kết FcR/C1q	Chức năng hiệu ứng
<u>hIgG1e1-Fc</u>	IgG1	T250Q/M428L	Liên kết gia tăng với FcRn	Thời gian bán thải gia tăng
<u>hIgG1e2-Fc</u>	IgG1	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	Liên kết gia tăng với FcRn	Thời gian bán thải gia tăng
<u>hIgG1e3-Fc</u>	IgG1	E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S	Liên kết giảm với FcγRI	ADCC và CDC giảm

<u>hIgG1e4-Fc</u>	IgG1	E333A	Liên kết gia tăng với FcγRIIIa	ADCC và CDC gia tăng
<u>hIgG1e5-Fc</u>	IgG1	S239D/A330L/I332E	Liên kết gia tăng với FcγRIIIa	ADCC gia tăng
<u>hIgG1e6-Fc</u>	IgG1	P257I/Q311	Liên kết gia tăng với FcRn	Thời gian bán thải không thay đổi
<u>hIgG1e7-Fc</u>	IgG1	K326W/E333S	Liên kết gia tăng với C1q	CDC gia tăng
<u>hIgG1e9-Fc</u>	IgG1	S239D/I332E/G236A	Tỷ lệ FcγRIIIa/FcγRIIb gia tăng	Thực bào bởi đại thực bào gia tăng
<u>hIgG1e9-Fc</u>	IgG1	N297A	Liên kết giảm với FcγRI	ADCC và CDC giảm
<u>hIgG1e9-Fc</u>	IgG1	LALA (L234A/L235A)	Liên kết giảm với FcγRI	ADCC và CDC giảm
<u>hIgG1e10- Fc</u>	IgG1	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E)	Liên kết giảm với FcγRI Liên kết gia tăng với FcRn	ADCC và CDC giảm Thời gian bán thải gia tăng
<u>hIgG1e11- Fc</u>	IgG1	K322A	Liên kết giảm với C1q	CDC giảm
<u>hIgG2e1-Fc</u>	IgG4	S228P	-	Trao đổi nhánh Fab giảm
<u>hIgG4e1-Fc</u>	IgG4	LALA (L234A/L235A)	Liên kết gia tăng với FcRn	Thời gian bán thải gia tăng
<u>hIgG4e2-Fc</u>	IgG4	S228P+ YTE (S228P + M252Y/S254T/T256E)	- Liên kết gia tăng với FcRn	Trao đổi nhánh Fab giảm Thời gian bán thải gia tăng
<u>hIgG4e3-Fc</u>	IgG4	K444A		Mất mô-típ phân cắt ở Cter của kháng thể
<u>hIgG1e3-Fc</u>	IgG1	K444A		Mất mô-típ phân cắt

				ở Cter của kháng thể
--	--	--	--	----------------------

Đánh số gốc trong vùng ổn định chuỗi nặng là theo cách đánh số EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. Mỹ, 63, 78-85 (1969); www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs)

Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng của IgG1 của người, tùy ý có thay thế hoặc tổ hợp các thay thế được chọn từ nhóm gồm có T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K444A, và K322A, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm có N297A tùy ý kết hợp với M252Y/S254T/T256E, và L234A/L235A.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng của IgG4 của người, tùy ý có thay thế hoặc tổ hợp các thay thế được chọn từ nhóm gồm có S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E, và K444A.

Theo phương án nhất định, cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất ở đây để tạo ra biến thể vùng Fc. Theo phương án nhất định, biến thể vùng Fc có một vài, nhưng không phải tất cả, chức năng hiệu ứng. Kháng thể này có thể hữu ích, ví dụ, trong ứng dụng trong đó thời gian bán thải của kháng thể *in vivo* là quan trọng, cho dù chức năng hiệu ứng nhất định là không cần thiết hoặc có tác hại. Ví dụ về chức năng hiệu ứng bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) và độc tính tế bào qua trung gian bổ thể được điều khiển bởi kháng thể (ADCC). Nhiều thay thế hoặc các thay thế hoặc khuyết đoạn với chức năng hiệu ứng bị biến đổi là đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, vùng ổn định có chứa đột biến mà làm giảm ái lực đối với thụ thể Fc hoặc làm giảm chức năng hiệu ứng của Fc. Ví dụ, vùng ổn định có thể có chứa đột biến loại bỏ vị trí glycosyl hoá trong vùng ổn định của chuỗi nặng IgG. Tốt

hơn là, miền CH2 có chứa đột biến mà loại bỏ vị trí glycosyl hoá trong miền CH2.

Theo một phương án, kháng hPD1 theo sáng chế có miền ổn định chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 39 và/hoặc miền ổn định chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 40, cụ thể là miền ổn định chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 39 và miền ổn định chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 40.

Theo một phương án, kháng hPD1 theo sáng chế có miền ổn định chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 47 và/hoặc miền ổn định chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 40, cụ thể là miền ổn định chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 47 và miền ổn định chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 40.

Miền ổn định chuỗi nặng (IgG4m-S228P) SEQ ID NO: 39	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Miền ổn định chuỗi nhẹ (CLkappa) SEQ ID NO: 40	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
Miền ổn định chuỗi nặng (IgG1m-N298A) SEQ ID NO: 47	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLSPGK

Bảng E. Ví dụ về miền ổn định chuỗi nặng và miền ổn định chuỗi nhẹ thích hợp cho kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế.

Biến đổi axit amin gần vùng nối của phần Fc và phần không phải là Fc có thể làm tăng đáng kể thời gian bán thải trong huyết thanh của protein dung hợp Fc (công bố đơn PCT WO 01/58957). Do đó, vùng nối của protein hoặc polypeptit của sáng chế có thể

có chứa biến đổi, mà so với trình tự có trong tự nhiên của chuỗi nặng của globulin miễn dịch và erythropoietin, tốt hơn là nằm trong phạm vi khoảng 10 axit amin kể từ điểm giao nhau. Thay đổi axit amin này có thể làm tăng tính kỵ nước. Theo một phương án, vùng ổn định là thu được từ trình tự IgG trong đó gốc lysin đầu tận cùng C bị thay thế. Tốt hơn là, gốc lysin đầu tận cùng C của trình tự IgG bị thay thế bằng axit amin không phải là lysin, như là alanin hoặc leuxin, để làm tăng hơn nữa thời gian bán thải.

Cụ thể là, axit amin K444 trong miền IgG1 hoặc IgG4 có thể được thay thế bằng alanin để làm giảm sự phân cắt thủy phân protein. Do đó, theo một phương án, kháng thể kháng PD1 bao gồm ít nhất một thay thế axit amin nữa gồm có K444A.

Theo một phương án, kháng thể kháng PD1 bao gồm gốc cystein bổ sung ở miền đầu tận cùng C của IgG để tạo ra liên kết disulfua bổ sung.

Theo phương án nhất định, kháng thể có thể được biến đổi để làm tăng, làm giảm hoặc loại bỏ mức độ mà nó được glycosyl hoá. Glycosyl hoá polypeptit thường là "được liên kết N" hoặc "được liên kết O".

Glycosyl hoá "được liên kết N" chỉ sự gắn phần hydrat cacbon vào mạch bên của gốc asparagin. Trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là trình tự nhận biết để gắn bằng enzym phần hydrat cacbon vào mạch bên asparagin. Do đó, sự có mặt của một trong hai trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hoá tiềm năng.

Glycosyl hoá "được liên kết O" chỉ sự gắn của một trong số đường N-acetylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza với axit hydroxyamino, hay gặp nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể sử dụng. Việc bổ sung hoặc làm khuyết đoạn các vị trí glycosyl hoá được liên kết N vào kháng thể có thể đạt được bằng cách làm biến đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều trình tự tripeptit nêu trên được tạo ra hoặc loại bỏ. Việc bổ sung hoặc làm khuyết đoạn các vị trí glycosyl hoá được liên kết O có thể đạt được bằng cách bổ sung, làm khuyết đoạn hoặc thay thế một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin ở hoặc vào (tùy từng trường hợp) trình tự kháng thể.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó:

- có điểm nhân tính T20 lớn hơn 85%;
- thể hiện khả năng sản xuất cao khi được sản xuất ở tế bào động vật có vú;
- thể hiện năng suất cao ở tế bào động vật có vú;
- có ái lực liên kết (KD) đối với PD-1 của người bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-7} M;
- có hoạt tính chất đối kháng và ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người, tốt hơn là PD-L1 và PD-L2;
- phong bế hoặc ức chế sự truyền tín hiệu PD-1 (phosphoryl hoá SHP-1 và tuyển mộ);
- tăng cường hoạt hoá tế bào T, đáng chú ý là, (pSHP-1 ức chế và hoạt hoá NFAT qua trung gian TCR, bài tiết IFN γ và IL-2; và/hoặc
- thúc đẩy đáp ứng miễn dịch kháng khối u.
- chứng tỏ có được động động học và dược lực in vivo tốt.

Cho mục đích của sáng chế, “nhân tính” được xác định bằng cách sử dụng công cụ phân tích điểm T20 để định lượng nhân tính của vùng thay đổi của kháng thể đơn dòng được mô tả trong: Gao S H, Huang K, Tu H, Adler A S. BMC Biotechnology. 2013; 13:55.

Công cụ dựa vào web được cung cấp để tính toán điểm T20 của trình tự kháng thể bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu ngưỡng T20 của người: <http://abAnalyzer.lakepharma.com>. Để tính điểm T20, trình tự protein vùng thay đổi VH, VK, hoặc VL nhập vào trước tiên được đánh số Kabat, và gốc CDR được nhận diện. Trình tự độ dài đầy đủ hoặc trình tự chỉ của khung (với gốc CDR được loại bỏ) được so với từng trình tự trong cơ sở dữ liệu kháng thể tương ứng bằng cách sử dụng thuật toán BLAST protein-protein blastp. Mức đồng nhất trình tự giữa mỗi cặp so sánh được tách riêng, và sau khi mỗi trình tự trong cơ sở dữ liệu đã được phân tích, trình tự được xếp thứ tự từ cao đến thấp dựa vào mức đồng nhất trình tự so với trình tự nhập vào. % đồng nhất trình tự của 20 trình tự đã bắt cặp được lấy trung bình để thu được điểm T20.

Đối với mỗi loại chuỗi (VH, VK, VL) và độ dài trình tự (độ dài đầy đủ hoặc chỉ có khung) trong “All Human Databases”, mỗi trình kháng thể được tính điểm bằng cơ sở dữ liệu tương ứng của nó sử dụng công cụ phân tích điểm T20. Điểm T20 thu được cho 20 trình tự đã bắt cặp sau khi bản thân trình tự nhập vào bị loại trừ (% đồng nhất trình tự của trình tự từ 2 đến 21 được lấy trung bình do trình tự 1 luôn là chính kháng

thể nhập vào). Điểm T20 cho mỗi nhóm được xếp loại từ cao đến thấp. Sự giảm điểm là gần như tuyến tính đối với phần lớn trình tự; tuy nhiên, điểm T20 có mức thấp dưới đáy ~15% của kháng thể bắt đầu giảm rõ rệt. Do đó, 15% dưới đáy của trình tự bị loại bỏ và trình tự còn lại tạo thành cơ sở dữ liệu ngưỡng T20 của người, trong đó ngưỡng điểm T20 chỉ ra điểm T20 thấp nhất của trình tự trong cơ sở dữ liệu mới.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kháng thể được làm tương thích với người” là kháng thể có điểm nhân tính T20 ít nhất là 80% hoặc ít nhất là 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 88%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt nhất là điểm nhân tính T20 nằm trong khoảng từ 85% đến 95%, tốt hơn là trong khoảng từ 88% đến 92%.

Do đó, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế có điểm nhân tính T20 ít nhất là 80% hoặc ít nhất là 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 88%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, tốt nhất là điểm nhân tính T20 nằm trong khoảng từ 85% đến 95%, tốt hơn là trong khoảng từ 88% đến 92%.

Theo một phương án, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được đề cập trong bản mô tả này như là năng suất được cải thiện, tốt hơn là so với kháng thể khảm tương ứng. Cụ thể là, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người có năng suất lớn hơn 5 mg/L, 6mg/L, 7 mg/L, 8 mg/L hoặc 9 mg/L ở tế bào CHO, tốt hơn là lớn hơn 1 hoặc 2 g/L. Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người này có năng suất lớn hơn 2 mg/L, 3 mg/L hoặc 4 mg/L ở tế bào COS, tốt hơn là lớn hơn 4 mg/L.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người này có năng suất ít nhất là gấp hai lần năng suất kháng thể khảm tương ứng.

Ái lực của kháng thể có thể chỉ số đo khả năng liên kết của nó với kháng nguyên đặc hiệu ở vị trí kháng nguyên-kháng thể đơn nhất và về bản chất là tổng của tất cả lực hút và đẩy có mặt ở tương tác giữa vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể và epitop cụ thể. Ái lực của một kháng thể với kháng nguyên cụ thể (ví dụ PD-1) có thể được biểu hiện bằng hằng số phân ly cân bằng K , được xác định bằng phương trình $K_d = [Ag][Ab]/[Ag Ab]$, biểu thị ái lực của vị trí kết hợp-kháng thể; trong đó $[Ag]$ là nồng độ của kháng nguyên tự do (M), $[Ab]$ là nồng độ của kháng thể tự do (M) và $[Ag Ab]$ là nồng độ của (M) phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Trong trường hợp kháng nguyên và kháng thể phản ứng mạnh với nhau sẽ có rất ít kháng nguyên tự do hoặc kháng thể tự do, và do đó hằng số cân bằng hoặc ái lực của kháng thể sẽ là thấp. Ái lực trung bình

đối với kháng thể là bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-7} M. Theo khía cạnh nhất định, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người liên kết PD-1 của người với ái lực bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} M, tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-9} M. Theo một khía cạnh, ái lực này bằng hoặc nhỏ hơn $1,5 \times 10^{-9}$ M. Ái lực có thể được đo bằng phương pháp bất kỳ thuộc hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bằng cách phân tích cảm biến sinh học như là phân tích Biacore cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), phân tích Blitz và đồ thị Scatchard. Cụ thể hơn là, ái lực liên kết được đo bằng Biacore như mô tả chi tiết trong Ví dụ 2. Kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có ái lực tốt hơn so với kháng thể khảm.

Ái lực liên kết có thể được biểu thị là K_D hoặc hằng số phân ly, và ái lực liên kết tăng tương ứng với K_D giảm. Một cách xác định ái lực liên kết của kháng thể với PD-1 là đo ái lực liên kết của mảnh Fab của kháng thể. Để thu được mảnh Fab, kháng thể có thể được phân cắt bằng papain hoặc được biểu hiện bằng cách tái tổ hợp. Ái lực của mảnh Fab kháng PD-1 của kháng thể có thể được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (hệ thống cộng hưởng plasmon bề mặt (SPF) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway N.J.). Tốc độ kết hợp động học (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) (nói chung được đo ở 25°C) là thu được; và giá trị hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính là k_{off}/k_{on} .

Cụ thể là, kháng thể được đề xuất ở đây liên kết với PD-1 của người với hằng số ái lực (K_D) bằng hoặc nhỏ hơn từ 0,75 đến 1,34 nM, tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn từ 0,75 đến 1 nM, tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn từ 0,75 đến 0,8 nM, như có thể xác định bằng phân tích Blitz. Hệ thống này cho phép đo tốc độ và hằng số ái lực đối với các tương tác liên kết (k_a , k_d , K_D).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được xác định ở trên ức chế một phần hoặc hoàn toàn, cụ thể là hoàn toàn, liên kết của PDL-1 và/hoặc PDL-2 với PD-1 của người.

Kháng thể được làm tương thích với người này của sáng chế liên kết đặc hiệu với hPD-1 và đối kháng tương tác giữa PD-1 và PD-L1 và/hoặc PD-L2. Cụ thể là, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được xác định ở trên là chất đối kháng liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người, tốt hơn là của PD-L1 và PD-L2 của người với PD-1 của

người.

Trong một vài ví dụ, kháng thể kháng PD-1 được mô tả trong bản mô tả này ức chế con đường truyền tín hiệu PD-1 ở mức ít nhất là 20%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 75%, ít nhất là 90%, ít nhất là 100%, hoặc ở mức ít nhất là 2 lần, ít nhất là 5 lần, ít nhất là 10 lần, ít nhất là 20 lần, ít nhất là 50 lần, ít nhất là 100 lần, hoặc ít nhất là 1000 lần. Cụ thể là, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng làm giảm hoặc ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 với PD-1 ở mức ít nhất là 50%, 60%, 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn nữa là 90% hoặc tốt nhất là 100%, so với phân tử đối chứng âm tính, trong thử nghiệm liên kết, như là thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Thử nghiệm này được đề cập trong: Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm. Stat.* 2011; 10: 128–134 và trong Ví dụ 3. Kháng thể được làm tương thích với người của sáng chế có IC50 như được đo bằng thử nghiệm này là nhỏ hơn 50 ng/ml, cụ thể là nhỏ hơn 40 ng/ml và tùy ý nhỏ hơn 20 ng/ml. Để so sánh, kháng thể khảm có IC50 lớn hơn 50 ng/ml, nghĩa là, khoảng 60 ng/ml. Theo cách khác, khả năng của kháng thể được làm tương thích với người của sáng chế đối kháng tương tác của PD-L1 với PD-1 cũng có thể được đo bằng thử nghiệm cạnh tranh với PD-L1 đối với PD-1 bằng Blitz và Biacore như mô tả chi tiết trong Ví dụ 4.

Phương pháp để xác định tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể bằng cách ức chế cạnh tranh là đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Colligan et al., *Current Protocols in Immunology*, Green Publishing Assoc., NY (1992; 1993); Muller, *Meth. Enzym.* 92:589-601 (1983)) và được mô tả chi tiết trong ví dụ dưới đây.

Phương pháp để xác định hoạt tính chất đối kháng của kháng thể là đã biết trong lĩnh vực này, và ví dụ là ELISA, phân tích cảm biến sinh học như là Biacore và Blitz. Phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD1, vector biểu hiện tái tổ hợp và tế bào chủ

Cũng được đề cập ở đây là axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này, chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng bất kỳ của nó, vector như là vector biểu hiện hoặc

virut tái tổ hợp bao gồm các axit nucleic này, và tế bào chủ bao gồm các axit nucleic và/hoặc vectơ này.

Trình tự axit nucleic

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được xác định ở trên hoặc chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng bất kỳ của nó.

Trình tự ADN của kháng thể có thể, ví dụ, được khuếch đại từ ARN của tế bào tổng hợp globulin miễn dịch, tổng hợp bằng cách sử dụng PCR với globulin miễn dịch được tách dòng, hoặc tổng hợp bằng các oligonucleotit mà mã hoá trình tự axit amin peptit tín hiệu. Tốt hơn là, tín hiệu peptit bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45 cho VH và/hoặc CH; và/hoặc trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 cho VL và/hoặc CL. Cụ thể là, tín hiệu peptit là ở đầu tận cùng N của CH, VH, CL và/hoặc VL.

Axit nucleic này có thể mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Axit nucleic này có thể dễ dàng được phân lập và xác định trình tự bằng cách sử dụng quy trình thông lệ.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người bao gồm:

- phân tử axit nucleic thứ nhất mã hoá miền thay đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21, tùy ý với tín hiệu peptit được nêu trong SEQ ID NO. 45, và
- phân tử axit nucleic thứ hai mã hoá miền thay đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 24, tùy ý với tín hiệu peptit được nêu trong SEQ ID NO: 46.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người bao gồm:

- phân tử axit nucleic thứ nhất được nêu trong SEQ ID NO: 48 mã hoá miền chuỗi nặng thay đổi, tùy ý với trình tự axit nucleic mã hoá tín hiệu peptit được nêu trong SEQ ID NO. 45, và
- phân tử axit nucleic thứ hai được nêu trong SEQ ID NO: 49 mã hoá miền thay

đổi chuỗi nhẹ, tùy ý với trình tự axit nucleic mã hoá tín hiệu peptit được nêu trong SEQ ID NO: 46.

Theo một phương án cụ thể, phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người bao gồm:

- phân tử axit nucleic thứ nhất được nêu trong SEQ ID NO: 50 mã hoá chuỗi nặng, và
- phân tử axit nucleic thứ hai được nêu trong SEQ ID NO: 51 mã hoá chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic là phân tử axit nucleic được phân lập, cụ thể là phi tự nhiên.

Phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế tốt hơn là được bao gồm trong vectơ hoặc nhóm vectơ.

Vectơ

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vectơ bao gồm phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic như được xác định ở trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vectơ” là phân tử axit nucleic được sử dụng làm chất dẫn để chuyển vật liệu di truyền vào tế bào. Thuật ngữ “vectơ” bao gồm plasmid, virus, cosmid và nhiễm sắc thể nhân tạo. Nói chung, vectơ được tạo ra bằng công nghệ di truyền bao gồm gốc sao chép, vị trí đa tách dòng và chất đánh dấu chọn lọc. Bản thân vectơ nói chung là trình tự nucleotit, thường là trình tự ADN, mà bao gồm đoạn cài xen (gen chuyển) và trình tự lớn hơn mà có vai trò là “khung” của vectơ. Vectơ hiện đại có thể bao gồm các dấu hiệu bổ sung bên cạnh đoạn cài xen gen chuyển và khung: đoạn khởi đầu, chất đánh dấu di truyền, tính kháng kháng sinh, gen chỉ thị, trình tự nhằm đích, nhân tinh chế. Vectơ được gọi là vectơ biểu hiện (cấu trúc biểu hiện) cụ thể là để biểu hiện gen chuyển ở tế bào đích, và nói chung có trình tự đối chứng.

Theo một phương án, cả hai trình tự mã hoá chuỗi nặng và trình tự mã hoá chuỗi nhẹ và/hoặc vùng ổn định của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người được bao gồm trong một vectơ biểu hiện. Mỗi trình tự trong số trình tự mã hoá chuỗi nặng và trình tự mã hoá chuỗi nhẹ có thể được liên kết có điều khiển với đoạn khởi đầu thích hợp. Theo cách khác, sự biểu hiện của cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được

điều khiển bởi cùng đoạn khởi đầu. Theo một phương án khác, lần lượt chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được tách dòng vào vector riêng rẽ. Trong trường hợp này, vector biểu hiện mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng chuyển nhiễm vào một tế bào chủ để biểu hiện cả hai chuỗi, mà có thể được lắp ráp để tạo thành kháng thể nguyên vẹn *in vivo* hoặc *in vitro*. Theo cách khác, vector biểu hiện mã hoá chuỗi nặng và vector mã hoá chuỗi nhẹ có thể được đưa vào tế bào chủ khác nhau để biểu hiện lần lượt chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, sau đó chuỗi này có thể được tinh chế và lắp ráp để tạo thành kháng thể nguyên vẹn *in vitro*.

Phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó có thể được tách dòng vào vector bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và tiếp đó biến nạp vào tế bào chủ. Do đó, sáng chế cũng đề xuất vector tái tổ hợp, mà bao gồm phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh của nó theo sáng chế. Theo một phương án được ưu tiên, vector biểu hiện còn bao gồm đoạn khởi đầu và trình tự axit nucleic mã hoá peptit tín hiệu bài tiết, và tùy ý ít nhất là một gen có tính kháng thuốc để sàng lọc.

Vector biểu hiện thích hợp thường có chứa (1) yếu tố ADN của sinh vật chưa có nhân điển hình mã hoá gốc sao chép của vi khuẩn và chất đánh dấu tính kháng kháng sinh để tạo ra sự tăng trưởng và chọn lọc của vector biểu hiện ở vật chủ vi khuẩn; (2) yếu tố ADN của sinh vật có nhân điển hình mà kiểm soát sự khởi đầu phiên mã, như đoạn khởi đầu; và (3) yếu tố ADN mà kiểm soát quá trình xử lý sản phẩm phiên mã, như trình tự kết thúc phiên mã/polyadenyl hoá.

Phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xây dựng vector biểu hiện có chứa trình tự axit nucleic của kháng thể kháng PD1 được mô tả trong bản mô tả này và thành phần điều hoà thích hợp cho phiên mã/dịch mã. Phương pháp này bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp ADN, kỹ thuật tái tổ hợp *in vivo*, v.v. Trình tự ADN được liên kết một cách hiệu quả với đoạn khởi đầu phù hợp ở vector biểu hiện để điều khiển quá trình tổng hợp mARN. Vector biểu hiện có thể còn bao gồm vị trí liên kết ribosom để khởi đầu dịch mã, yếu tố kết thúc phiên mã và yếu tố tương tự.

Vector biểu hiện có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau bao gồm chuyển nhiễm canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian

liposom, đục lỗ điện, và kỹ thuật tương tự. Tốt hơn là, tế bào đã chuyển nhiễm được chọn lọc và nhân lên trong đó vector biểu hiện được tích hợp ổn định trong bộ gen của tế bào chủ để sản xuất thể biến nạp ổn định. Kỹ thuật để đưa vector vào tế bào của sinh vật có nhân điển hình và kỹ thuật để chọn lọc thể biến nạp ổn định bằng cách sử dụng chất đánh dấu chọn lọc trội được mô tả bởi Ausubel, Bebbington, “Expression of Antibody Genes in Nonlymphoid Mammalian Cells,” in 2 METHODS: A companion to methods in enzymology 136 (1991), và bởi Murray (biên tập), Gene transfer and expression protocols (Humana Press 1991). Vector tách dòng thích hợp được mô tả bởi Sambrook và các đồng tác giả (biên tập), MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1989) (sau đây gọi là “Sambrook”); bởi Ausubel và các đồng tác giả mô tả (biên tập), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Wiley Interscience 1987) (sau đây gọi là “Ausubel”); và bởi Brown (biên tập), MOLECULAR BIOLOGY LABFAX (Academic Press 1991).

Tế bào chủ

Phân tử axit nucleic, nhóm phân tử axit nucleic và/hoặc vector của sáng chế có thể được bao gồm trong tế bào chủ, cụ thể là cho mục đích sản xuất kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người. Sáng chế do đó đề xuất tế bào chủ bao gồm ít nhất là phân tử axit nucleic và/hoặc nhóm phân tử axit nucleic và/hoặc vector được mô tả ở trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” dự định bao gồm tế bào riêng rẽ hoặc dịch nuôi cấy tế bào bất kỳ mà có thể là hoặc đã là tế bào tiếp nhận vector, phân tử axit nucleic ngoại sinh, và polynucleotit mã hoá kháng thể của sáng chế và/hoặc tiếp nhận chính kháng thể. Việc đưa vật liệu tương ứng này vào tế bào có thể được thực hiện bằng cách biến nạp, chuyển nhiễm và cách tương tự. Thuật ngữ “tế bào chủ” cũng dự định bao gồm thể hệ sau hoặc thể hệ sau tiềm năng của một tế bào đơn nhất. Tế bào chủ thích hợp bao gồm tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc tế bào của sinh vật có nhân điển hình, và cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào thực vật và tế bào động vật như là tế bào côn trùng và tế bào động vật có vú, ví dụ, chuột, chuột cống, thỏ, khỉ hoặc người.

Theo một phương án, tế bào chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp với): (1) vector

bao gồm axit nucleic mà mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể và/hoặc vùng ổn định của kháng thể, hoặc (2) vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic mà mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic mà mã hoá trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người cũng được đề xuất ở đây. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ bao gồm axit nucleic mã hoá kháng thể, như được đề xuất ở trên, trong điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ). Cụ thể là, để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người, axit nucleic mã hoá kháng thể, ví dụ, như mô tả ở trên, được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng tiếp và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ.

Tế bào chủ thích hợp để sản xuất kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào của sinh vật có nhân điển hình, như là tế bào động vật có vú, tế bào thực vật, tế bào côn trùng và hoặc tế bào nấm men. Tế bào động vật có vú là vật chủ có nhân điển hình được đặc biệt ưu tiên bởi vì tế bào động vật có vú cung cấp cải biến sau dịch mã thích hợp như là glycosyl hoá. Tốt hơn là, tế bào chủ có nhân điển hình này có thể là nấm như là *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*; tế bào côn trùng như là *Mythimna separate*; tế bào cây như là cây thuốc lá, và tế bào động vật có vú như là tế bào BHK, tế bào 293, tế bào CHO, tế bào NSO và tế bào COS. Ví dụ khác về dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích là tế bào CV-1 với gen SV40 (tế bào COS), dòng CV1 thận khỉ được biến nạp với SV40 (COS-7); dòng thận phôi của người (tế bào 293 hoặc tế bào 293 như mô tả, ví dụ, trong: Graham, F.L. et al, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); tế bào thận chuột đồng con (BHK); tế bào Sertoli của chuột (tế bào TM4 như mô tả, ví dụ, trong: Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); tế bào thận biểu mô của người (tế bào HEK); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh Châu Phi (VERO-76); tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA); tế bào thận loài răng nanh (MDCK; tế bào gan chuột buffalo (BRL 3 A); tế bào phôi của người (W138); tế bào gan của người (Hep G2); khối u vú của chuột (MMT 060562); tế bào TRI như mô tả, ví dụ, trong: Mather, J.P. et al, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột

đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm tế bào DHFR⁺ CHO (Urlaub, G. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ 77 (1980) 4216-4220); và dòng tế bào u tuỷ như là Y0, NSO và Sp2/0. Xem tổng kết về dòng tế bào chủ động vật có vú nhất định thích hợp để sản xuất kháng thể, ví dụ, Yazaki, P. và Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), các trang 255-268. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú mà được làm thích ứng để sinh trưởng trong hỗn dịch có thể là hữu ích.

Cụ thể là, tế bào chủ theo sáng chế được chọn từ nhóm gồm có tế bào CHO, tế bào COS, tế bào NSO, và tế bào HEK.

Cho vật chủ động vật có vú, tín hiệu điều hoà phiên mã và dịch mã của vector biểu hiện có thể có thể thu được từ nguồn virus, như là adenovirus, virus papilloma ở bò, virus simian, hoặc virus tương tự, trong đó tín hiệu điều hoà được kết hợp với gen cụ thể mà có mức biểu hiện cao. Trình tự điều hoà phiên mã và dịch mã thích hợp cũng có thể thu được từ gen động vật có vú, như là các gen actin, collagen, myosin, và metallothionein.

Thế biến nạp ổn định mà sản xuất kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được nhận diện bằng phương pháp khác nhau. Sau khi tế bào sản xuất phân tử đã được nhận diện, tế bào chủ được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp (ví dụ nhiệt độ, môi trường) thích hợp để chúng sinh trưởng và để biểu hiện kháng thể được làm tương thích với người. Kháng thể được làm tương thích với người sau đó được phân lập và/hoặc tinh chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý biến tính thông thường, xử lý bằng chất kết tủa protein (như là kết tủa bằng muối), ly tâm, phân giải tế bào bằng thẩm thấu, sóng âm, siêu ly tâm, sắc ký sàng phân tử hoặc sắc ký gel, sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, HPLC, sắc ký lỏng khác bất kỳ, và tổ hợp phương pháp này. Như được mô tả, ví dụ, bởi Coligan, kỹ thuật phân lập kháng thể được làm tương thích với người cụ thể là bao gồm sắc ký ái lực với Protein-A Sepharose, sắc ký loại trừ kích cỡ và sắc ký trao đổi ion. Protein A tốt hơn là được sử dụng để phân lập kháng thể theo sáng chế.

Thế liên hợp kháng thể

Sáng chế cũng đề xuất “thế liên hợp kháng thể” còn gọi là “thế liên hợp miễn dịch” bao gồm kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó được mô tả trong bản mô tả này và chất thích hợp thứ hai, mà có thể là chất trị liệu hoặc chất chẩn đoán. Sáng chế cũng đề xuất thế liên hợp miễn dịch bao gồm

kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như là hoá chất trị liệu hoặc thuốc (ví dụ, chất ức chế miễn dịch), chất ức chế tăng trưởng, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố miễn dịch, độc tố tế bào, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc mảnh của chúng), độc tố phóng xạ, đồng vị phóng xạ, polyme không phải protein ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc polyoxyalkylen. Thể liên hợp kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để cải biến đáp ứng sinh học đã cho, và gốc thuốc không được hiểu là giới hạn ở hoá chất trị liệu cổ điển. Ví dụ, gốc thuốc có thể là protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học mong muốn. Thuật ngữ “được liên hợp miễn dịch” ở đây chỉ liên kết ngang hoá học hoặc gắn cộng hoá trị một phân tử/gốc khác với kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế bằng phương pháp tái tổ hợp. Phương pháp điều chế thể liên hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, WO 2014/160160, Patent Mỹ số 5,208,020 và Patent Mỹ số 5,416,064; và Chari et al., 1992 Cancer Res. 52:127-131).

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể kháng PD1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó, thể liên hợp kháng thể như đề cập ở trên, phân tử axit nucleic, nhóm phân tử axit nucleic, vector và/hoặc tế bào chủ như được mô tả ở trên, tốt hơn là như thành phần hoạt tính hoặc hợp chất hoạt tính. Chế phẩm này có thể được tiệt khuẩn và, nếu muốn, trộn với chất phụ trợ như là chất mang và tá dược được dụng mà không tương tác có hại với và kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó, thể liên hợp kháng thể, axit nucleic, vector và/hoặc tế bào chủ của sáng chế. Tùy ý, dược phẩm có thể còn bao gồm chất trị liệu bổ sung như mô tả chi tiết dưới đây.

Tốt hơn là, dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó, phân tử axit nucleic, nhóm phân tử axit nucleic, vector và/hoặc tế bào chủ, như được mô tả trong bản mô tả này, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược, muối, và chất chống oxy hoá được dụng hoặc sinh lý dụng như mô tả dưới đây. Mong muốn là, dạng dược dụng được sử dụng mà không ảnh hưởng bất lợi đến tác dụng tăng cường miễn dịch mong muốn của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế. Để tạo thuận lợi cho việc sử dụng, kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương

thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó như được mô tả trong bản mô tả này có thể được bào chế thành dược phẩm để sử dụng *in vivo*. Cách thức bào chế chế phẩm này đã được mô tả trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21st edition (2005)).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế cho đường dùng thông lệ bao gồm sử dụng tại chỗ, qua ruột, qua đường miệng, ngoài đường tiêu hoá, trong mũi, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bắp cơ, trong khối u, dưới da hoặc trong nhãn cầu và đường dùng tương tự. Tốt hơn là, dược phẩm theo sáng chế được bào chế để sử dụng qua đường ruột hoặc ngoài đường tiêu hoá. Chế phẩm và công thức bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hoá có thể bao gồm dung dịch trong nước vô khuẩn mà cũng có thể có chứa chất đệm, chất pha loãng và chất phụ gia thích hợp khác như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất tăng cường tính thấm, hợp chất, hợp chất carder và chất mang được dùng hoặc tá dược được dùng khác.

Dược phẩm có thể được điều chế bằng cách phối trộn chất có độ tinh khiết mong muốn với chất mang, tá dược, hoặc chất làm ổn định được dùng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng chế phẩm được đông khô hoặc dung dịch trong nước. Chất mang, tá dược, hoặc chất làm ổn định được dùng là không độc đối với thể nhận ở liều lượng và nồng độ sử dụng, và bao gồm chất đệm như là phosphat, xitrat, và axit hữu cơ khác; chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như là octadecyldimethylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua, benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc benzyl alcohol; alkyl paraben như là metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit khối lượng phân tử thấp (nhỏ hơn khoảng 10 gấc); protein, như là albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như là polyvinylpyrrolidon; axit amin như là glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất tạo chelat như là EDTA; đường như là sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion đối ứng tạo muối như là natri; phức hợp kim loại (ví dụ, phức hợp Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không-ion như là TWEENTM, PLURONICSTM hoặc polyetylen glycol (PEG).

Chất dẫn dược dụng dạng rắn có thể bao gồm một hoặc nhiều chất mà cũng có thể hoạt động như chất điều vị, chất làm trơn, chất hoà tan, chất tạo hỗn dịch, chất nhuộm

màu, chất độn, chất trơn chảy, chất hỗ trợ nén, chất kết dính trợ, chất làm ngọt, chất bảo quản, chất nhuộm màu, chất bao, hoặc chất gây phân rã-viên nén. Chất dẫn dạng rắn thích hợp bao gồm ví dụ canxi phosphat, magie stearat, bột talc, đường, lactoza, dextrin, tinh bột, gelatin, xenluloza, polyvinylpyrrolidin, sáp độ nóng chảy thấp và nhựa trao đổi ion. Chất mang được dụng bao gồm dung dịch trong nước hoặc hệ phân tán và bột vô khuẩn để pha chế tùy ứng dụng dịch hoặc hệ phân tán để tiêm. Miễn là môi trường hoặc chất là tương hợp với hợp chất hoạt tính, sử dụng chúng trong dược phẩm theo sáng chế là được dự định.

Kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được hoà tan hoặc tạo hỗn dịch trong chất dẫn lỏng được dụng như là nước, dung môi hữu cơ, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và hỗn hợp tương tự gồm cả hai hoặc dầu được dụng hoặc chất béo được dụng và hỗn hợp thích hợp của chúng. Chất dẫn lỏng có thể có chứa chất phụ gia được phẩm thích hợp khác như là chất hoà tan, chất nhũ hoá, chất đệm, chất làm ngọt, chất điều vị, chất tạo hỗn dịch, chất thấm ướt, chất làm đặc, chất màu, chất điều chỉnh độ nhớt, chất làm ổn định hoặc chất điều hoà thẩm thấu. Ví dụ thích hợp về chất dẫn lỏng để sử dụng qua đường miệng và đường ruột bao gồm nước (một phần có chứa chất phụ gia như nêu trên, ví dụ dẫn xuất xenluloza, tốt hơn là dung dịch natri carboxymetyl xenluloza), rượu (bao gồm rượu monohydric và rượu polyhydric, ví dụ glycol) và dẫn xuất của chúng, và dầu (ví dụ dầu dừa được phân đoạn và dầu lạc). Để sử dụng ngoài đường tiêu hoá, chất dẫn cũng có thể là este dạng dầu như là etyl oleat và isopropyl myristat. Chất dẫn lỏng vô khuẩn là hữu ích trong chế phẩm dạng lỏng vô khuẩn để sử dụng qua đường ruột. Chất dẫn lỏng cho chế phẩm được tạo áp có thể là hydrocarbon được halogen hoá hoặc chất đẩy được dụng khác.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm một hoặc nhiều muối được dụng. "Muối được dụng" chỉ muối mà giữ được hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không có tác dụng độc tính không mong muốn. Ví dụ về muối này bao gồm muối cộng axit và muối cộng bazơ. Muối cộng axit bao gồm muối thu được từ axit vô cơ không độc, như là axit clohydric, axit nitric, axit phosphoric, axit sulfuric, axit bromohydric, axit iohydric, axit phosphoric và axit tương tự, cũng như từ axit hữu cơ không độc như axit mono- và dicarboxylic béo, axit alkanoic được thế phenyl, axit hydroxy alkanoic, axit thơm, axit sulfonic béo và thơm và axit tương tự. Muối cộng bazơ

bao gồm muối thu được từ kim loại kiềm hoặc kim loại kiềm thổ, như natri, kali, magie, canxi và kim loại tương tự, cũng như từ amin hữu cơ không độc, như N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, cloprocain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, procain và chất tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm chất chống oxy hoá được dụng. Ví dụ về chất chống oxy hoá được dụng bao gồm: chất chống oxy hoá tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfít, natri sulfit và chất tương tự; chất chống oxy hoá tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol butyl hoá (BHA), hydroxytoluen butyl hoá (BHT), lexithin, propyl gallat, alpha-tocopherol, và chất tương tự; và chất tạo chelat kim loại, như là axit xitric, axit etylendiamin tetra-axetic (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và chất tương tự.

Để tạo thuận lợi cho việc phân phối, kháng thể kháng PD-1 hoặc axit nucleic mã hoá nó có thể được liên hợp với chất đi kèm. Chất đi kèm có thể là chất có trong tự nhiên, như là protein (*ví dụ*, albumin huyết thanh người, lipoprotein tỷ trọng thấp, hoặc globulin), hydrat cacbon (*ví dụ*, dextran, pullulan, chitin, chitosan, inulin, xyclodextrin hoặc axit hyaluronic), hoặc lipid. Chất này cũng có thể là phân tử tái tổ hợp hoặc tổng hợp, như là polyme tổng hợp, *ví dụ*, axit polyamino tổng hợp. Ví dụ về axit polyamino bao gồm polylysin (PLL), axit poly L aspartic, axit poly L-glutamic, copolyme styren-axit maleic anhydrit, copolyme poly(L-lactit-co-glycol hoá), copolyme divinyl ete-maleic anhydrit, copolyme N-(2-hydroxypropyl) metacrylamit (HMPA), polyetylen glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA), polyuretan, poly(2-axit etylacrylic), polyme N-isopropylacrylamit, và polyphosphazin. Trong một ví dụ, chất đi kèm là mixen, liposom, hạt nano, hoặc vi cầu, trong đó oligonucleotit/ARN can thiệp được bao nang. Phương pháp điều chế mixen, liposom, hạt nano, hoặc vi cầu này là đã biết trong lĩnh vực này. Xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 5,108,921; Patent Mỹ số 5,354,844; Patent Mỹ số 5,416,016; và Patent Mỹ số 5,527,5285.

Dược phẩm thông thường cần phải vô khuẩn và ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản. Dược phẩm có thể được bào chế dưới dạng dung dịch, vi nhũ tương, hoặc cấu trúc có trật tự khác thích hợp đối với nồng độ thuốc cao và/hoặc thích hợp để tiêm. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp bao như là lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt cần thiết trong trường hợp hệ phân tán và bằng cách sử dụng

chất hoạt động bề mặt.

Theo một phương án, dược phẩm là chế phẩm tiêm mà có thể có chứa các chất mang khác nhau như dầu thực vật, dimethylactamit, dimetylformamit, etyl lactat, etyl cacbonat, isopropyl myristat, etanol, và polyol (glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng, và chất tương tự). Để tiêm trong tĩnh mạch, kháng thể tan trong nước có thể được sử dụng bằng phương pháp nhỏ giọt, trong đó dược phẩm có chứa kháng thể và tá dược được dùng được truyền. Tá dược sinh lý dụng có thể bao gồm, ví dụ, dextroza 5%, nước muối 0,9%, dung dịch Ringer hoặc tá dược thích hợp khác. Chế phẩm tiêm bắp, ví dụ, dạng chế phẩm vô khuẩn hoà tan thích hợp chứa kháng thể, có thể được hoà tan và sử dụng trong tá dược như nước để tiêm, nước muối 0,9%, hoặc dung dịch glucoza 5%.

Dung dịch để tiêm vô khuẩn có thể được bào chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một hoặc tổ hợp nhiều thành phần nêu trên, nếu cần, tiếp đó vi lọc để diệt khuẩn. Nói chung, hệ phân tán được bào chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính vào chất dẫn vô khuẩn mà có chứa môi trường phân tán cơ bản và thành phần khác cần thiết từ các chất nêu trên. Trong trường hợp bột vô khuẩn để bào chế dung dịch tiêm vô khuẩn, phương pháp pha chế được tốt hơn là sấy khô trong chân không và làm khô-đông lạnh (đông khô) để thu được bột chứa thành phần hoạt tính + thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch đã lọc vô khuẩn trước đó của nó. Khả năng hấp thu kéo dài chế phẩm để tiêm có thể tạo ra bằng cách bao gồm trong chế phẩm này chất làm chậm hấp thu, ví dụ, muối monostearat và gelatin.

Việc ngăn ngừa sự có mặt của vi sinh vật có thể đảm bảo bằng cả quy trình diệt khuẩn và bằng cách đưa vào chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, clobutanol, axit phenol sorbic, và chất tương tự. Cũng có thể mong muốn bao gồm chất đẳng trương, như đường, natri clorua, và chất tương tự vào chế phẩm. Ngoài ra, khả năng hấp thu kéo dài chế phẩm để tiêm có thể tạo ra bằng cách bao gồm trong chế phẩm này chất làm chậm hấp thu, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được là chế phẩm theo sáng chế có thể đẳng trương với máu của người nghĩa là chế phẩm theo sáng chế về cơ bản có áp lực thẩm thấu giống như máu của người. Chế phẩm đẳng trương này nói chung có áp lực thẩm thấu từ khoảng 250 mOSm đến khoảng 350 mOSm. Độ đẳng trương có thể được đo bằng, ví dụ, thẩm thấu kế loại áp lực hơi hoặc đông lạnh đá. Độ

đẳng trương của chế phẩm được điều chỉnh bằng cách sử dụng chất biến đổi độ đẳng trương. "Chất biến đổi độ đẳng trương" là chất trợ được dụng có thể được thêm vào chế phẩm này để tạo ra độ đẳng trương của chế phẩm. Chất biến đổi độ đẳng trương thích hợp cho sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sacarit, muối và axit amin.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để giải phóng thành phần hoạt tính (ví dụ kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người theo sáng chế) hầu như ngay khi sử dụng hoặc ở thời gian định trước bất kỳ hoặc một khoảng thời gian sau khi sử dụng. Dược phẩm theo khía cạnh nhất định có thể sử dụng hệ phân phối giải phóng theo thời gian, giải phóng chậm, và giải phóng kéo dài sao cho việc phân phối chế phẩm xảy ra trước khi, và với thời gian đủ để gây mất cảm vị trí cần được điều trị. Cách thức đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc giảm thiểu sự giải phóng và hấp thu chế phẩm cho đến khi đến được mô đích hoặc cơ quan đích, hoặc để đảm bảo sự giải phóng chế phẩm theo thời gian. Hệ này có thể tránh việc sử dụng lặp lại chế phẩm, nhờ đó tăng thuận tiện cho đối tượng và thầy thuốc.

Lượng thành phần hoạt tính có thể kết hợp với chất mang để sản xuất dạng phân liều đơn nhất sẽ tùy thuộc vào đối tượng đang điều trị, và đường dùng cụ thể. Lượng thành phần hoạt tính mà có thể được kết hợp với chất mang để sản xuất dạng phân liều đơn nhất nói chung sẽ là lượng chế phẩm mà tạo ra tác dụng trị liệu.

Đối tượng, phác đồ và sử dụng

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó, dược phẩm, phân tử axit nucleic, nhóm phân tử axit nucleic, vector hoặc tế bào chủ của sáng chế để sử dụng làm thuốc, cụ thể là để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng. Ví dụ về điều trị được mô tả cụ thể hơn ở mục "Phương pháp và Sử dụng". Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng dược phẩm, axit nucleic, vector hoặc tế bào chủ của sáng chế hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ở đối tượng. Cuối cùng là, sáng chế đề cập đến phương pháp để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó. Ví dụ về điều trị được mô tả cụ thể hơn ở mục "Phương pháp và Sử dụng".

Đối tượng để điều trị có thể là người, cụ thể là người ở giai đoạn trước khi sinh,

mới sinh, trẻ nhỏ, trẻ sơ sinh, trẻ vị thành niên hoặc người trưởng thành, cụ thể là người trưởng thành ít nhất là 30 tuổi, 40 tuổi, tốt hơn là người trưởng thành ít nhất là 50 tuổi, tốt hơn nữa là người trưởng thành ít nhất là 60 tuổi, còn tốt hơn nữa là người trưởng thành ít nhất là 70 tuổi.

Theo phương án cụ thể, đối tượng bị ức chế miễn dịch hoặc bị suy yếu miễn dịch. Đối tượng này có thể bị ức chế miễn dịch, bị suy giảm miễn dịch hoặc bị suy yếu miễn dịch, ví dụ do nhiễm virus như HIV, bệnh ung thư, bệnh tiểu đường, suy dinh dưỡng, và một số rối loạn di truyền, do điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch hoặc do điều trị trước đó bằng liệu pháp miễn dịch, hoá trị liệu hoặc liệu pháp xạ trị. Đối tượng theo sáng chế có thể bị suy yếu miễn dịch. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bị suy yếu miễn dịch” và “suy giảm miễn dịch” là tương đương và có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Như sử dụng trong sáng chế, thuật ngữ “bị suy yếu miễn dịch” hoặc “bị suy giảm miễn dịch” chỉ trạng thái trong đó đối tượng có bảo vệ miễn dịch bị suy yếu. Cá thể bị suy yếu miễn dịch không có khả năng quản lý đúng cách vi sinh vật mà, trong điều kiện bình thường không biểu hiện nguy cơ. Đối tượng theo sáng chế có thể bị ức chế miễn dịch. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bị ức chế miễn dịch” chỉ trạng thái trong đó đối tượng này không còn bảo vệ miễn dịch.

Do đó, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, dược phẩm, phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm phân tử axit nucleic được phân lập, vector, hoặc tế bào chủ theo sáng chế có thể là để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhân mắc rối loạn giảm lympho bào.

Cụ thể là, đối tượng bị mắc bệnh mà có thể liên quan đến con đường PD-1/PDL-1, cụ thể là trong đó, ít nhất là một trong số phối tử của PD-1 (ví dụ PDL-1 và/hoặc PDL-2) hoặc PD-1 được biểu hiện, đặc biệt là được biểu hiện quá mức. Tốt hơn là, đối tượng đang mắc bệnh ung thư, còn tốt hơn nữa là bệnh ung thư dương tính PD1, PD-L1 và/hoặc PD-L2 hoặc bệnh ung thư dương tính PD-1. Ví dụ về bệnh và bệnh ung thư được mô tả cụ thể hơn dưới đây dưới mục “Phương pháp và sử dụng”.

Theo phương án cụ thể, đối tượng đã tiếp nhận ít nhất là một nhóm thuốc điều trị, tốt hơn là một vài nhóm thuốc điều trị, trước khi sử dụng kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế.

Phương pháp thông thường, đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực

y học, có thể được sử dụng để sử dụng kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó hoặc dược phẩm được đề cập ở đây cho đối tượng, tùy thuộc vào loại bệnh sẽ điều trị hoặc vị trí của bệnh. Chế phẩm này có thể được sử dụng bằng đường dùng thông thường, ví dụ, được sử dụng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hoá, qua đường ruột, bằng cách phun xịt, ngoài da, đường trực tràng, đường mũi, đường miệng, đường âm đạo hoặc qua nguồn cấy ghép. Thuật ngữ “ngoài đường tiêu hoá” như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm kỹ thuật tiêm hoặc truyền dưới da, trong da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong hoạt dịch, trong xương ức, trong màng cứng, trong tổn thương, trong khối u, và trong hộp sọ. Khi được sử dụng ngoài đường tiêu hoá, dược phẩm theo sáng chế ưu tiên được sử dụng bằng đường dùng tĩnh mạch. Khi được sử dụng qua đường ruột, dược phẩm theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng bằng đường dùng qua đường miệng. Chế phẩm này cũng có thể được sử dụng tại chỗ.

Dạng dược phẩm, đường dùng và liều dùng của dược phẩm hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó theo sáng chế có thể được điều chỉnh bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này theo loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm trùng, và theo bệnh nhân, cụ thể là tuổi tác, cân nặng, giới tính và tình trạng thể chất nói chung. Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo một số cách tùy thuộc vào việc muốn điều trị tại chỗ hay toàn thân.

Tốt hơn là, việc điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó hoặc bằng dược phẩm theo sáng chế được sử dụng thường xuyên, tốt hơn là hàng ngày, hàng tuần hoặc hàng tháng, tốt hơn nữa là hàng ngày và một, hai, ba hoặc bốn tuần một lần. Theo phương án cụ thể, điều trị là vài lần một ngày, tốt hơn là 2 hoặc 3 lần/ngày.

Khoảng thời gian điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó hoặc bằng dược phẩm theo sáng chế theo sáng chế tốt hơn là trong khoảng từ 1 ngày đến 20 tuần, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày đến 10 tuần, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày đến 4 tuần, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 ngày đến 2 tuần. Theo cách khác, việc điều trị có thể kéo dài miễn là bệnh vẫn còn.

Kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người được đề cập ở đây có thể được cung cấp ở khoảng liều dùng hữu hiệu từ khoảng 1 ng/kg thể trọng đến khoảng 30

mg/kg thể trọng, từ 1 µg/kg đến khoảng 20 mg/kg, từ 10 µg/kg đến khoảng 10 mg/kg, hoặc từ 100 µg/kg đến 5 mg/kg, tùy ý một, hai, ba hoặc bốn tuần một lần, tốt hơn là bằng cách sử dụng ngoài đường tiêu hoá hoặc sử dụng qua đường miệng, cụ thể là bằng cách sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Cụ thể là, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người theo sáng chế có thể được sử dụng ở liều dùng dưới trị liệu. Thuật ngữ “liều dùng dưới trị liệu” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ liều dùng thấp hơn mức liều lượng liệu pháp đơn hữu hiệu thường được sử dụng để điều trị bệnh, hoặc liều dùng mà hiện không thường được sử dụng cho liệu pháp đơn hữu hiệu bằng kháng thể kháng hPD1.

Phương pháp và sử dụng

Sử dụng để điều trị bệnh

Kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, vector, tế bào chủ, chế phẩm và phương pháp của sáng chế có nhiều ứng dụng và sử dụng *in vitro* và *in vivo* khác nhau. Ví dụ, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó (ở dạng tự do hoặc dưới dạng thể liên hợp miễn dịch), axit nucleic, vector, tế bào chủ, và/hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng làm chất trị liệu, chất chẩn đoán và nghiên cứu y học. Cụ thể là, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người, axit nucleic, vector, tế bào chủ, hoặc được phẩm bất kỳ được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trong phương pháp trị liệu và/hoặc cho mục đích trị liệu. Cụ thể là, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó được đề xuất ở đây có thể hữu ích để điều trị bệnh hoặc tình trạng bất kỳ có liên quan đến PD-1, như bệnh ung thư và bệnh nhiễm trùng, hoặc bệnh khác có kèm theo suy giảm miễn dịch, như rối loạn chức năng tế bào T.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh học, bệnh và/hoặc rối loạn mà có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 với PD-1.

Còn tốt hơn nữa là, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh và/hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư và bệnh nhiễm trùng, tốt hơn là bệnh nhiễm trùng mãn tính, ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng PD1 hoặc được phẩm như được xác định ở

trên. Ví dụ về bệnh này được mô tả cụ thể hơn dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, nhóm axit nucleic hoặc vector mã hoá nó, hoặc được phẩm bao gồm nó để sử dụng để điều trị rối loạn và/hoặc bệnh ở đối tượng và/hoặc để sử dụng làm thuốc hoặc vắc xin. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic hoặc vector mã hoá nó, hoặc được phẩm bao gồm nó để sản xuất thuốc để điều trị bệnh và/hoặc rối loạn ở đối tượng. Cuối cùng, sáng chế đề cập đến phương pháp để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của được phẩm hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó.

Theo khía cạnh cụ thể, sáng chế cụ thể đề cập đến kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, nhóm axit nucleic hoặc vector mã hoá nó, hoặc được phẩm bao gồm nó, như được đề cập trong bản mô tả này, để sử dụng để điều trị bệnh học, bệnh và/hoặc rối loạn mà có thể được ngăn ngừa hoặc điều trị bằng cách ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 với PD-1.

Do đó, được đề cập ở đây là phương pháp để điều trị bệnh liên quan đến con đường truyền tín hiệu PD-1 và/hoặc PD-1/PD-L1 và/hoặc PD-1/PD-L2 bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng PD-1 hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Dữ liệu sinh lý của bệnh nhân (ví dụ tuổi, chiều cao, và cân nặng) và đường dùng có thể được xét đến để xác định liều lượng thích hợp, sao cho lượng hữu hiệu trị liệu sẽ được sử dụng cho bệnh nhân.

Được bộc lộ ở đây, là phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh và/hoặc rối loạn, phương pháp này bao gồm các bước: (a) nhận diện bệnh nhân cần điều trị; và (b) cho bệnh nhân sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể, axit nucleic, vector hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh cụ thể, đối tượng cần điều trị có thể là người có, có nguy cơ, hoặc nghi ngờ mắc bệnh liên quan đến con đường truyền tín hiệu được điều tiết bởi PD-1. Bệnh nhân này có thể được nhận diện bằng cách xét nghiệm thường quy. Ví dụ, đối tượng thích hợp để điều trị có thể được nhận diện bằng cách xét nghiệm xem đối tượng này có mang tế bào dương tính PD-1, PD-L1 và/hoặc PD-L2 hay không. Theo một

phương án, đối tượng cần điều trị là bệnh nhân mắc, nghi ngờ mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh, tốt hơn là bệnh dương tính PD-1, PDL1 và/hoặc PDL2, tốt hơn nữa là bệnh trong đó PD-1 và/hoặc ít nhất là một phối tử của PD-1 được biểu hiện quá mức. Ở đối tượng này, sự phá vỡ tương tác PD-1/PD-L1 và/hoặc PD-1/PD-L2 do sử dụng kháng thể hoặc được phẩm theo sáng chế có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng. Theo phương án nhất định, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị tế bào dương tính PD-1.

Theo cách khác, do tác dụng lên thực bào bởi đại thực bào mà không đặc hiệu đối với tế bào đích biểu hiện PD-L1 hoặc PD-L2, đối tượng thích hợp để điều trị cũng có thể có tế bào đích âm tính PD-L1 và/hoặc PD-L2. Theo một phương án, đối tượng cần điều trị mắc, nghi ngờ mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh mà âm tính PDL1 và/hoặc PDL2.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho đối tượng, ví dụ, *in vivo*, để tăng cường miễn dịch, tốt hơn là để điều trị rối loạn và/hoặc bệnh. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp biến đổi đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, vectơ hoặc được phẩm của sáng chế sao cho đáp ứng miễn dịch ở đối tượng này là được biến đổi. Tốt hơn là, đáp ứng miễn dịch được tăng cường, gia tăng, kích thích hoặc điều hoà tăng. Kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc được phẩm có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch như hoạt hoá tế bào T ở đối tượng cần điều trị. Tăng cường đáp ứng miễn dịch có thể dẫn đến ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 với PD-1 nhờ đó giảm môi trường ức chế miễn dịch, kích thích sự tăng sinh và/hoặc hoạt hoá tế bào T ở người và/hoặc bài tiết IFN γ bởi PBMC của người.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, tăng cường đáp ứng miễn dịch có thể là do sự hoạt hoá thực bào tế bào bởi các đại thực bào. Sự thực bào này không chỉ giới hạn ở tế bào biểu hiện PD-L1. Thực tế là, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người theo sáng chế có thể hoạt hoá sự thực bào tế bào bất kỳ bởi đại thực bào này, đặc biệt là tế bào ung thư hoặc tế bào bị lây nhiễm.

Sáng chế cụ thể đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, vectơ hoặc dược phẩm bao gồm nó được mô tả trong bản mô tả này, sao cho đáp ứng miễn dịch ở đối tượng này được tăng cường.

Theo một số phương án, lượng kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này là hữu hiệu để ức chế sự truyền tín hiệu PD-1 (ví dụ, giảm sự truyền tín hiệu PD-1 ở mức ít nhất là 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400%, hoặc 500% so với đối chứng). Theo phương án khác, lượng kháng thể kháng PD-1 được mô tả trong bản mô tả này là hữu hiệu để hoạt hoá đáp ứng miễn dịch (ví dụ, ở mức ít nhất là 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400%, hoặc 500% so với đối chứng).

Theo một số phương án, lượng kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này là hữu hiệu để ức chế liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người (ví dụ, ức chế liên kết ở mức ít nhất là 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400%, hoặc 500% so với đối chứng).

Theo một số phương án, lượng kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này là đủ để có hoạt tính chất đối kháng liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người (ví dụ, ức chế liên kết ở mức ít nhất là 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400%, hoặc 500% so với đối chứng).

Bệnh ung thư

Đã biết trong lĩnh vực này là sự phong bế PD-1 bởi kháng thể có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với tế bào ung thư ở bệnh nhân. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD1 hoặc dược phẩm để sử dụng để điều trị cho đối tượng mắc bệnh ung thư, bao gồm bước cho cá thể này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng PD1 hoặc dược phẩm, tốt hơn là để phá vỡ hoặc ức chế tương tác PD1/PD-L1 và/hoặc PD1/PD-L2. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 hoặc dược phẩm để sử dụng để điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, trong đó kháng thể kháng PD-1 có khả năng hoạt hoá tế bào T bị suy kiệt, tốt hơn là bằng cách phá vỡ hoặc ức chế tương tác PD1/PD-L1 và/hoặc PD1/PD-L2. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-1 hoặc dược phẩm để sử dụng để điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, trong đó kháng thể kháng PD-1 có khả năng hoạt hoá đại thực bào, tốt

hơn là bằng cách phá vỡ hoặc ức chế tương tác PD1/PD-L1 và/hoặc PD1/PD-L2.

Theo một phương án, đối tượng mà cần điều trị là bệnh nhân mắc, nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh, tốt hơn là bệnh ung thư dương tính PD-1 hoặc PD-L1, còn tốt hơn nữa là bệnh ung thư trong đó PD-1 hoặc PD-L1 được biểu hiện hoặc được biểu hiện quá mức. Ví dụ, bệnh nhân thích hợp để điều trị có thể được nhận diện bằng cách xét nghiệm xem bệnh nhân này có mang tế bào khối u dương tính PD-L1 hay không. Ngoài ra hoặc theo cách khác, đối tượng thích hợp để điều trị là đối tượng có tế bào thâm nhiễm khối u mà biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức PD-1.

Theo một phương án khác, đối tượng là bệnh nhân có, nghi ngờ có, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh ung thư, tốt hơn là bệnh ung thư dương tính PD-L1 và/hoặc PD-L2. Theo một số phương án, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị khối u dương tính PD-L1 và/hoặc PD-L2. Ví dụ, bệnh nhân là người thích hợp để điều trị có thể được nhận diện bằng cách xét nghiệm xem bệnh nhân này có mang tế bào ung thư dương tính PD-L1 và/hoặc PD-L2 hay không.

Theo khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng hPD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó để sử dụng để điều trị bệnh ung thư, tốt hơn là bệnh ung thư dương tính PD-L1 và/hoặc PD-L2, còn tốt hơn nữa là bệnh ung thư trong đó PD-L1 và/hoặc PD-L2 được biểu hiện quá mức được đề xuất.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm như được đề cập trong bản mô tả này để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ung thư, ví dụ để ức chế sự tăng trưởng của tế bào khối u, ở đối tượng, tốt hơn là có tế bào khối u dương tính PD-L1, PD-L2.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư, ví dụ ức chế sự tăng trưởng của tế bào khối u, ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm theo sáng chế. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến việc điều trị cho đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người sao cho sự phát triển của tế bào ung thư bị ức chế.

Theo một khía cạnh của sáng chế, bệnh ung thư cần được điều trị là có liên quan đến tế bào T bị suy kiệt.

Tốt hơn là, thuật ngữ “tế bào khối u dương tính PD-L1” hoặc “tế bào khối u dương tính PD-L2” dự định để chỉ quần thể tế bào khối u trong đó PD-L1 hoặc PD-L2 lần lượt được biểu hiện ở ít nhất là 10% tế bào khối u, tốt hơn là ít nhất là 20, 30, 40 hoặc 50% tế bào khối u.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người của sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư mà có thể kèm theo biểu hiện mức thấp của PD-1 và/hoặc PD-L1, và/hoặc số lượng tế bào T thấp, đặc biệt là tế bào T thâm nhiễm khối u, và/hoặc số lượng tế bào T bị suy kiệt cao. Thực tế là, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người của sáng chế có thể bất ngờ hoạt hoá sự thực bào tế bào bất kỳ (tế bào biểu hiện hoặc không biểu hiện PD-1 và/hoặc PD-L1) bởi đại thực bào. Trong trường hợp này, bệnh nhân có thể bị ức chế miễn dịch, bị suy giảm miễn dịch hoặc bị suy yếu miễn dịch do nhiễm virus như HIV, bệnh ung thư, bệnh tiểu đường, suy dinh dưỡng, và rối loạn di truyền nhất định, do điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch hoặc do điều trị trước đó bằng liệu pháp miễn dịch, hoá trị liệu hoặc liệu pháp xạ trị.

Do đó, kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư có tế bào khối u âm tính PD-L1.

Tốt hơn là, thuật ngữ “tế bào khối u âm tính PD-L1” hoặc “tế bào khối u âm tính PD-L2” dự định để chỉ quần thể tế bào khối u trong đó PD-L1 hoặc PD-L2 lần lượt được biểu hiện ở mức nhỏ hơn 10% tế bào khối u, tốt hơn là nhỏ hơn 5% tế bào khối u, tốt hơn là nhỏ hơn 1% tế bào khối u.

Bệnh ung thư thích hợp bất kỳ có thể được điều trị bằng kháng thể được đề xuất ở đây có thể là bệnh ung thư tạo máu hoặc bệnh ung thư thể rắn. Bệnh ung thư này bao gồm caxinom, bệnh ung thư cổ tử cung, ung thư đại tràng, ung thư thực quản, ung thư dạ dày, ung thư dạ dày-ruột, ung thư đầu và cổ, ung thư thận, ung thư gan, ung thư phổi, u lympho, u thần kinh đệm, u trung biểu mô, u melanin, ung thư dạ dày, ung thư niệu đạo, ung thư do cảm ứng môi trường và tổ hợp bất kỳ của các bệnh ung thư này. Sáng chế cũng hữu ích để điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư di căn mà biểu hiện PD-L1 (Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17: 133-144). Ngoài ra, sáng chế bao gồm thể

ác tính kháng thuốc hoặc tái phát.

Theo khía cạnh cụ thể, bệnh ung thư là thể ác tính huyết học hoặc khối u rắn có mức biểu hiện cao của PD-1 và/hoặc PD-L1. Bệnh ung thư có thể được chọn từ nhóm gồm có bệnh tăng sinh thể bạch huyết, u lympho tế bào T nguyên bào mạch-nguyên bào miễn dịch, hội chứng loạn sản tuỷ, bệnh bạch cầu dạng tuỷ cấp.

Theo khía cạnh cụ thể, bệnh ung thư là bệnh ung thư gây cảm ứng bởi virus hoặc kèm theo suy giảm miễn dịch. Bệnh ung thư có thể được chọn từ nhóm gồm có sarcoma Kaposi (ví dụ, liên quan đến virus herpes sarcoma Kaposi); cổ tử cung, bệnh ung thư hậu môn, bệnh ung thư dương vật và bệnh ung thư tế bào vảy âm hộ và bệnh ung thư miệng-hầu (ví dụ, có liên quan đến virus papilloma ở người); u lympho không phải Hodgkin tế bào B (NHL) bao gồm u lympho tế bào B lớn lan toả, u lympho Burkitt, u lympho nguyên bào tương bào, u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát, u lympho tràn dịch nguyên phát HHV-8, u lympho Hodgkin cổ điển, và rối loạn tăng sinh lympho (ví dụ, có liên quan đến virus Epstein-Barr (EBV) và/hoặc virus herpes sarcoma Kaposi); sarcoma tế bào gan (ví dụ, có liên quan đến virus viêm gan B và virus viêm gan C); sarcoma tế bào Merkel (ví dụ, có liên quan đến polyomavirus tế bào Merkel (MPV)); và bệnh ung thư kèm theo bệnh nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV).

Tốt hơn là, bệnh ung thư cần được điều trị hoặc ngăn ngừa được chọn từ nhóm gồm có di căn hoặc không di căn, u melanin, u trung biểu mô ác tính, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, sarcoma tế bào thận, u lympho Hodgkin, bệnh ung thư đầu và cổ, ung thư biểu mô đường bài xuất hệ tiết niệu, bệnh ung thư đại tràng, sarcoma tế bào gan, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, sarcoma tế bào Merkel di căn, bệnh ung thư dạ dày hoặc dạ dày-thực quản và bệnh ung thư cổ tử cung.

Bệnh ung thư được ưu tiên để điều trị bao gồm bệnh ung thư thường đáp ứng với liệu pháp miễn dịch.

Để làm ví dụ và không muốn bị giới hạn theo lý thuyết, việc điều trị bằng kháng thể chống ung thư hoặc thể liên hợp miễn dịch chống ung thư hoặc liệu pháp chống ung thư hiện hành khác mà dẫn đến chết tế bào ung thư sẽ làm tăng tiềm lực đáp ứng miễn dịch qua trung gian PD-1. Do đó, điều trị bệnh tăng sinh mạnh (ví dụ, khối u ung thư) có thể bao gồm kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó kết hợp với điều trị chống ung thư, đồng thời hoặc tuần tự hoặc tổ hợp bất kỳ của

chúng, mà có thể làm tăng tiềm lực đáp ứng miễn dịch kháng khối u bởi vật chủ. Tốt hơn là, kháng thể kháng PD-1 có thể được sử dụng kết hợp với chất sinh miễn dịch khác (ví dụ ADC), thuốc điều trị ung thư chuẩn, hoặc kháng thể khác như được mô tả dưới đây.

Bệnh nhiễm trùng

Kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh nhân đã phơi nhiễm với độc tố hoặc mầm bệnh cụ thể. Do đó, một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhiễm trùng ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm bao gồm nó, tốt hơn là sao cho đối tượng được điều trị cho bệnh nhiễm trùng này.

Bệnh nhiễm trùng thích hợp bất kỳ có thể được điều trị bằng kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể được đề xuất ở đây.

Một vài ví dụ về virus gây bệnh gây ra bệnh nhiễm trùng có thể điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm HIV, viêm gan (A, B, hoặc C), virus herpes (ví dụ, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, và CMV, virus Epstein Barr), adenovirus, virus cúm, flavivirus, echovirus, rhinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus hợp bào hô hấp, virus quai bị, rotavirus, virus sởi, virus rubella, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus sốt xuất huyết, papillomavirus, virus molluscum, virus bại liệt, virus dại, virus JC và virus viêm màng não arbovirus.

Cụ thể là, kháng thể kháng PD1 hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh nhân mắc bệnh nhiễm virus mãn tính, như bệnh nhiễm trùng gây ra bởi virus được chọn từ nhóm gồm có Retrovirus, Anellovirus, Circovirus, Herpesvirus, virus Varicella zoster (VZV), Cytomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), Polyomavirus BK, Polyomavirus, virus liên quan Adeno (AAV), Herpes simplex typ 1 (HSV-1), Adenovirus, Herpes simplex typ 2 (HSV-2), virus herpes sarcoma Kaposi (KSHV), virus viêm gan B (HBV), virus GB C, virus Papilloma, virus viêm gan C (HCV), virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus viêm gan D (HDV), virus bệnh bạch cầu tế bào T ở người typ 1 (HTLV1), virus liên quan đến virus bệnh bạch cầu ở chuột Xenotropic (XMLV), virus rubella, bệnh sởi German, Parvovirus B19, virus sởi,

virut coxsackie.

Một vài ví dụ về mầm bệnh vi khuẩn gây bệnh nhiễm trùng có thể điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm *chlamydia*, vi khuẩn *rickettsia*, vi khuẩn lao *mycobacterium*, tụ cầu khuẩn *staphylococcus*, liên cầu khuẩn *streptococcus*, phế cầu khuẩn *pneumococcus*, vi khuẩn viêm màng não *meningococcus* và vi khuẩn lậu *gonococcus*, *klebsiella*, *proteus*, *serratia*, *pseudomonas*, *legionella*, vi khuẩn bạch hầu *diphtheriae*, vi khuẩn thương hàn *salmonella*, *bacillus*, vi khuẩn tả *cholerae*, vi khuẩn uốn ván, vi khuẩn ngộ độc thịt *botulinum*, vi khuẩn bệnh than anthracis, vi khuẩn dịch hạch, vi khuẩn *leptospira*, và vi khuẩn gây bệnh Lyme.

Một vài ví dụ về mầm bệnh nấm gây bệnh nhiễm trùng có thể điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, v.v.), *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* và *Histoplasma capsulatum*.

Một vài ví dụ về ký sinh trùng gây bệnh nhiễm trùng có thể điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, và *Nippostrongylus brasiliensis*.

Trong tất cả các phương pháp nêu trên, sự phong bế PD-1 có thể kết hợp với hình thức liệu pháp miễn dịch khác như là điều trị xytokin (ví dụ, interferon, GM-CSF, G-CSF, IL-2), hoặc liệu pháp bất kỳ, mà tạo ra sự trình diện tăng cường kháng nguyên khối u.

Liệu pháp kết hợp

Cụ thể là, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể kết hợp với một vài cách thức tiềm năng để khắc phục cơ chế lẩn tránh miễn dịch bằng chất đang thử lâm sàng hoặc đã có trên thị trường (xem Bảng 1 trong: Antonia *et al.* Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 6258–6268, 2014). Kết hợp với kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như vậy có thể hữu

ích, nhất là đề:

- 1- Làm đảo ngược sự ức chế tính miễn dịch đáp ứng (phong bế con đường điểm kiểm soát tế bào T), ví dụ bằng cách sử dụng phân tử kháng CTLA4;
- 2- Chuyển đổi tính miễn dịch đáp ứng (thúc đẩy sự truyền tín hiệu thụ thể đồng kích thích tế bào T bằng cách sử dụng phân tử chủ vận, cụ thể là kháng thể);
- 3- Cải thiện chức năng của tế bào miễn dịch bẩm sinh;
- 4- Hoạt hoá hệ thống miễn dịch (tăng tiềm lực chức năng hiệu ứng tế bào miễn dịch), ví dụ thông qua cách thức dựa vào vắc xin.

Do đó, cũng được đề xuất ở đây là liệu pháp kết hợp cho bệnh bất kỳ trong số bệnh như được mô tả trong bản mô tả này với kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó hoặc được phẩm bao gồm như là được mô tả trong bản mô tả này và chất trị liệu bổ sung. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người và chất trị liệu bổ sung có thể có mặt trong được phẩm như mô tả ở trên. Theo cách khác, thuật ngữ “liệu pháp kết hợp” hoặc “liệu pháp được kết hợp” như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm việc sử dụng chất trong số các chất này (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như được mô tả trong bản mô tả này và chất trị liệu thứ hai hoặc thích hợp bổ sung) theo cách tuần tự, nghĩa là trong đó mỗi chất trị liệu được sử dụng ở thời điểm khác nhau, cũng như sử dụng các chất trị liệu này, hoặc ít nhất là hai trong số các chất này, theo cách gần như đồng thời. Sử dụng tuần tự hoặc gần như đồng thời mỗi chất có thể bị ảnh hưởng bởi đường dùng thích hợp bất kỳ. Chất này có thể được sử dụng bằng đường dùng giống nhau hoặc bằng đường dùng khác nhau. Ví dụ, chất thứ nhất (ví dụ, kháng thể kháng PD-1) có thể được sử dụng qua đường miệng, và chất trị liệu bổ sung (ví dụ, chất chống ung thư, chất chống nhiễm trùng; hoặc chất điều biến miễn dịch) có thể được sử dụng qua đường tĩnh mạch. Theo cách khác, chất của liệu pháp kết hợp được lựa chọn có thể được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch trong khi đó các chất khác của liệu pháp kết hợp có thể được sử dụng qua đường miệng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương thức trị liệu, cụ thể là phương thức sản phẩm kết hợp, mà bao gồm dưới dạng thành phần hoạt tính: kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được xác định ở trên và chất bổ sung và chất trị liệu, trong đó các thành phần hoạt tính đã nêu được bào chế cho liệu pháp riêng rẽ, tuần tự hoặc kết hợp, cụ thể là để sử dụng kết hợp

hoặc tuần tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tuần tự" nghĩa là, trừ khi có quy định khác, được đặc trưng ở chỗ có trình tự hoặc thứ tự đều đặn, *ví dụ*, nếu phác đồ liều lượng bao gồm sử dụng kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người và chất thứ hai hoặc bổ sung, phác đồ liều lượng tuần tự có thể bao gồm sử dụng kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người trước khi, đồng thời, gần như đồng thời, hoặc sau khi sử dụng chất thứ hai, nhưng cả hai chất sẽ được sử dụng theo trình tự hoặc thứ tự đều đặn. Thuật ngữ "riêng rẽ" nghĩa là, trừ khi có quy định khác, cách biệt với nhau. Thuật ngữ "đồng thời" nghĩa là, trừ khi có quy định khác, xảy ra hoặc được thực hiện ở cùng thời điểm, *nghĩa là*, các chất của sáng chế được sử dụng ở cùng thời điểm. Thuật ngữ "gần như đồng thời" nghĩa là chất được sử dụng cách nhau vài phút (*ví dụ*, cách nhau 15 phút) và dự định bao gồm sử dụng cùng với nhau cũng như sử dụng liên tục, nhưng nếu sử dụng là liên tục thì sẽ là riêng rẽ về mặt thời gian chỉ trong một khoảng thời gian ngắn (*ví dụ*, thời gian mà nhân viên y tế sử dụng hai hợp chất một cách riêng rẽ).

Nên hiểu là liệu pháp kết hợp bất kỳ như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng theo trình tự bất kỳ để điều trị rối loạn hoặc bệnh được mô tả trong bản mô tả này. Liệu pháp kết hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể được lựa chọn dựa vào một số yếu tố bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở hiệu lực ức chế hoặc ngăn ngừa tiến triển của bệnh đích, hiệu lực làm giảm nhẹ tác dụng phụ của chất khác của liệu pháp kết hợp, hoặc hiệu lực làm giảm nhẹ triệu chứng liên quan đến bệnh đích. Ví dụ, liệu pháp kết hợp được mô tả trong bản mô tả này có thể giảm tác dụng phụ bất kỳ trong số tác dụng phụ liên quan đến thành viên đơn lẻ của liệu pháp kết hợp.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để điều trị bệnh ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này và lượng hữu hiệu trị liệu của chất trị liệu bổ sung.

Khi kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này được đồng sử dụng với chất trị liệu bổ sung, liều lượng nhỏ hơn liều trị liệu của chế phẩm của hoặc của chất thứ hai, hoặc liều lượng nhỏ hơn liều trị liệu của cả hai, có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng, tốt hơn là đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự truyền tín hiệu tế

bào qua trung gian PD-1. Theo một khía cạnh, chất trị liệu bổ sung có thể được lựa chọn trong danh mục không toàn diện bao gồm chất alkyl hoá, chất ức chế sinh mạch, kháng thể, cụ thể là kháng thể nhằm đích kháng khối u, chất chống chuyển hoá, chất chống phân bào, chất chống tăng sinh, chất chống virus, chất ức chế aurora kinaza, chất thúc đẩy sự chết theo chương trình (ví dụ, chất ức chế họ Bcl-2), chất hoạt hoá con đường thụ thể gây chết, chất ức chế Bcr-Abl kinaza, kháng thể BiTE (chất tuyển mộ tế bào T lưỡng đặc hiệu), thể liên hợp kháng thể thuốc, chất cải biến đáp ứng sinh học, chất ức chế Bruton tyrosin kinaza (BTK), chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin, chất ức chế chu trình tế bào, chất ức chế xyclooxygenaza-2, DVDs, chất ức chế thụ thể chất đồng đẳng gen gây ung thư của virus bệnh bạch cầu (ErbB2), chất ức chế yếu tố tăng trưởng, chất ức chế protein sốc nhiệt (HSP)-90, chất ức chế histon deacetylaza (HDAC), liệu pháp hormon, chất miễn dịch, chất ức chế của chất ức chế protein chết theo chương trình (IAPs), kháng sinh xen vào giữa, chất ức chế kinaza, chất ức chế kinesin, chất ức chế Jak2, đích ở động vật có vú của chất ức chế rapamycin, microARN, chất ức chế kinaza được điều tiết bởi tín hiệu ngoại bào được hoạt hoá bởi chất gây phân bào, protein liên kết đa hoá trị, thuốc chống viêm phi steroid (NSAIDs), chất ức chế poly ADP (adenosin diphosphat)-riboza polymeraza (PARP), chất hoá trị liệu platin, chất ức chế kinaza tương tự polo (Plk), chất ức chế phosphoinositid-3 kinaza (PI3K), chất ức chế proteasom, chất tương tự purin, chất tương tự pyrimidin, chất tương tự tyrosin kinaza thụ thể, retinoid/deltaoit alkaloid của cây, axit ribonucleic ức chế nhỏ (siRNA), chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế ubiquitin ligaza, chất giảm methyl hoá, chất ức chế điểm kiểm soát, vắc xin peptit và chất tương tự, epitop hoặc neoepitop từ kháng nguyên khối u, cũng như tổ hợp của một hoặc nhiều chất trong số các chất này.

Ví dụ, chất trị liệu bổ sung có thể được chọn trong nhóm gồm có hoá trị liệu, liệu pháp xạ trị, liệu pháp nhằm đích, kháng thể nhằm đích kháng khối u, chất chống sinh mạch, chất giảm methyl hoá, vắc xin ung thư, epitop hoặc neoepitop từ kháng nguyên khối u, chất ức chế điểm kiểm soát dạng tuỷ, liệu pháp miễn dịch khác, và chất ức chế HDAC.

Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu bổ sung là được chọn từ nhóm gồm có chất hoá trị liệu, chất của liệu pháp xạ trị, chất trị liệu miễn dịch, chất của liệu pháp tế bào (như là tế bào CAR-T), kháng sinh và probiotic.

Chất trị liệu miễn dịch nêu trên cũng có thể là kháng thể nhằm đích kháng nguyên

khối u, cụ thể là được chọn từ nhóm gồm có kháng Her2, kháng EGFR, kháng CD20, kháng CD19 và kháng CD52. Kháng thể này có thể là kháng thể gây độc tế bào nhằm đích tế bào khối u hoặc kháng thể gây cảm ứng hoạt tính phân giải tế bào của tế bào miễn dịch (như là tế bào NK, tế bào T hoặc đại thực bào) chống lại tế bào khối u. Danh mục không toàn diện của các kháng thể này bao gồm rituximab, pertuzumab, alemtuzumab, atezolizumab, bevacizumab, cetuximab, herceptin, panitumumab, necitumumab, dinutuximab, ramucirumab, olaratumab, ipilimumab, cemiplimab, tremelimumab, CS1001, relatlimab, naxitamab, margetuximab, BAT8001, KN035, isatuximab, andecaliximab, bemarituzumab, trastuzumab, kháng thể kháng PD1, kháng PDL-1, kháng thể kháng CD47, và kháng thể kháng SIRPa. Theo một khía cạnh rất cụ thể, kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế được sử dụng kết hợp với rituximab.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến liệu pháp kết hợp như được xác định ở trên, trong đó chất trị liệu bổ sung cụ thể được chọn từ nhóm gồm có vắc xin trị liệu, chất phong bế hoặc chất hoạt hoá điểm kiểm soát miễn dịch, cụ thể là của tế bào miễn dịch đáp ứng (lympho bào T và B) và thể liên hợp kháng thể-thuốc. Tốt hơn là, chất thích hợp để sử dụng cùng với kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó hoặc với dược phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể liên kết với thụ thể đồng kích thích (ví dụ, OX40, CD40, ICOS, CD27, HVEM hoặc GITR), chất gây cảm ứng chết tế bào miễn dịch (ví dụ, chất hoá trị liệu, chất xạ trị liệu, chất chống tạo mạch, hoặc chất của liệu pháp nhằm đích), chất ức chế phân tử điểm kiểm soát (ví dụ, CTLA4, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, BTLA, hoặc TIGIT), vắc xin ung thư, chất cải biến enzym ức chế miễn dịch (ví dụ, IDO1 hoặc iNOS), chất nhằm đích tế bào T_{reg}, chất của liệu pháp tế bào đáp ứng, hoặc chất điều biến tế bào dạng tuỷ.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến liệu pháp kết hợp như được xác định ở trên, trong đó chất trị liệu thứ hai là chất phong bế điểm kiểm soát miễn dịch hoặc chất hoạt hoá của tế bào miễn dịch đáp ứng (lympho bào T và B) được chọn từ nhóm gồm có kháng CTLA4, kháng CD2, kháng CD28, kháng CD40, kháng HVEM, kháng BTLA, kháng CD160, kháng TIGIT, kháng TIM-1/3, kháng LAG-3, kháng 2B4, và kháng OX40, chất chủ vận kháng CD40, CD40-L, chất chủ vận TLR, kháng ICOS, ICOS-L và chất chủ vận thụ thể tế bào B.

Theo một phương án, chất trị liệu bổ sung hoặc thứ hai là kháng thể nhằm đích kháng nguyên khối u, cụ thể là được chọn từ nhóm gồm có kháng Her2, kháng EGFR,

kháng CD20, kháng CD19 và kháng CD52.

Ví dụ cụ thể về chất trị liệu được đề xuất trong WO 2018/053106, các trang từ 36 đến 43, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Liệu pháp kết hợp cũng có thể dựa vào việc kết hợp sử dụng kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh kháng thể của nó với phẫu thuật, hoá trị liệu (ví dụ như là docetaxel hoặc decarbazin), liệu pháp xạ trị, liệu pháp miễn dịch (ví dụ như là kháng thể nhắm đích CD40, CTLA-4), chất nhắm đích gen và chất điều biến gen và/hoặc chất khác như là chất điều biến miễn dịch, chất ức chế sinh mạch và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Sử dụng trong chẩn đoán

Theo phương án nhất định, kháng thể kháng PD1 được đề xuất ở đây hữu ích để phát hiện sự có mặt của PD1 trong mẫu sinh phẩm. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm phát hiện định tính hoặc định lượng. Theo phương án nhất định, mẫu sinh phẩm bao gồm tế bào hoặc mô, như là tế bào miễn dịch hoặc thâm nhiễm tế bào T.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp chẩn đoán *in vitro* hoặc *ex vivo*, cụ thể là phương pháp chẩn đoán để sử dụng trong y học cá thể hoá, cụ thể hơn là trong chẩn đoán đồng hành, trong đó kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được sử dụng để phát hiện tế bào dương tính PD-1 trong mẫu, tốt hơn là thu được trước đó từ đối tượng và tùy ý để định lượng mức biểu hiện PD-1.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của kháng nguyên PD-1 của người trong mẫu, hoặc đo lượng kháng nguyên PD-1 của người, bao gồm bước cho mẫu và mẫu đối chứng tiếp xúc với kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế, trong điều kiện cho phép tạo thành phức hợp giữa kháng thể hoặc phần của nó và PD-1 của người. Sau đó phát hiện sự tạo thành phức hợp, trong đó sự tạo thành phức hợp khác biệt giữa mẫu so với mẫu đối chứng là chỉ thị cho sự có mặt của kháng nguyên PD-1 của người trong mẫu. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Kháng thể có thể là thể liên hợp miễn dịch bao gồm phần có thể phát hiện thích hợp như được mô tả ở trên. Thử nghiệm này có thể là hữu ích, ví dụ, để đánh giá sự có mặt và/hoặc tiến hoá của bệnh như là bệnh ung thư.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng, cụ thể là *in vitro* hoặc *ex vivo*, kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế trong phương pháp trong đó PD-1 được sử dụng làm chất đánh dấu sinh học mà chỉ báo cho đáp ứng với điều trị ở đối tượng, cụ thể là ở đối tượng mắc bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp dự báo *in vitro* hoặc *ex vivo* đáp ứng của đối tượng ung thư với điều trị, cụ thể là với kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, bao gồm các bước:

- xác định mức biểu hiện của PD-1 trong mẫu khối u, tốt hơn là trước đó thu được từ đối tượng, tốt hơn là với kháng thể kháng PD-1 của người được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được liên kết với phần có thể phát hiện, và

- so sánh mức biểu hiện của PD-1 với giá trị đại diện của mức biểu hiện của PD-1 ở quần thể đối tượng không đáp ứng,

trong đó mức biểu hiện cao hơn của PD-1 trong mẫu khối u của đối tượng là chỉ báo là đối tượng sẽ đáp ứng với điều trị, tốt hơn là điều trị chống ung thư bằng cách sử dụng kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm bao gồm nó.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp chẩn đoán, trong đó kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó được sử dụng để chọn lọc đối tượng thích hợp với liệu pháp bằng kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người, ví dụ trong đó PD-1 là chất đánh dấu sinh học để chọn lọc bệnh nhân, hoặc trong đó PD-1 được biểu hiện quá mức.

Bộ kit

Kháng thể hoặc chế phẩm bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này có thể được bao gồm trong bộ kit được đề xuất bởi sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất bộ kit để sử dụng trong việc tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc điều trị bệnh (ví dụ bệnh ung thư và bệnh do virus) có liên quan đến sự truyền tín hiệu PD-1.

Cụ thể là, bộ kit theo sáng chế có thể bao gồm:

- kháng thể kháng hPD1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong bản mô tả này,

- phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể này,

- vectơ bao gồm phân tử axit nucleic hoặc phân tử axit nucleic này, và/hoặc

- tế bào bao gồm vectơ, phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic này.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “bộ kit” nghĩa là hai hoặc nhiều thành phần (một trong số chúng tương ứng với phân tử kháng thể kháng hPD-1 được làm tương thích với người, phân tử axit nucleic, vectơ hoặc tế bào theo sáng chế) được đóng gói trong vật đựng, vật tiếp nhận hoặc theo cách khác. Bộ kit do đó có thể bao gồm, trong vật đựng thích hợp, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người, và/hoặc tế bào chủ theo sáng chế, và/hoặc vectơ mã hoá phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic theo sáng chế, và/hoặc phân tử axit nucleic hoặc nhóm phân tử axit nucleic hoặc chất thử liên quan của sáng chế. Bộ kit do đó có thể được mô tả là bộ sản phẩm và/hoặc công cụ mà đủ để đạt được mục đích nhất định, mà có thể đưa ra thị trường dưới dạng đơn vị đơn nhất.

Theo phương án nhất định, phương tiện lấy mẫu từ cá thể và/hoặc thử nghiệm mẫu có thể được đề xuất. Theo phương án nhất định, bộ kit bao gồm tế bào, chất đệm, môi trường tế bào, vectơ, đoạn môi, enzym giới hạn, muối, và v.v. Bộ kit cũng có thể bao gồm phương tiện để chứa chất đệm được dụng vô khuẩn và/hoặc chất pha loãng khác.

Vật đựng có thể là liều dùng đơn vị, bao gói lượng lớn (ví dụ, bao gói nhiều liều dùng) hoặc liều dùng dưới đơn vị. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến bộ kit như được xác định ở trên cho một đơn vị sử dụng liều dùng đơn nhất. Bộ kit theo sáng chế có thể chứa vật tiếp nhận thứ nhất bao gồm kháng thể được làm khô/đông khô và vật tiếp nhận thứ hai bao gồm chế phẩm trong nước. Theo phương án nhất định của sáng chế, bộ kit có chứa xi-lanh một khoang và xi-lanh đa khoang (ví dụ, xi-lanh chất lỏng và xi-lanh bột đông khô) được đề xuất.

Bộ kit theo sáng chế là trong bao gói thích hợp. Bao gói thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở ống, lọ, chai, bình, bao gói linh hoạt (ví dụ, túi Mylar hoặc chất dẻo hàn kín), và bao gói tương tự. Cũng dự định là bao gói để sử dụng kết hợp với

dụng cụ chuyên dụng, như là dụng cụ xông, dụng cụ sử dụng qua đường mũi (ví dụ, máy phun) hoặc dụng cụ tiêm truyền như là bơm mini. Bộ kit có thể có miệng tiếp cận vô khuẩn (ví dụ vật đựng có thể là túi truyền tĩnh mạch hoặc lọ có nắp có thể xuyên thủng bằng kim tiêm dưới da). Vật đựng cũng có thể có miệng tiếp cận vô khuẩn (ví dụ vật đựng có thể là túi dung dịch truyền tĩnh mạch hoặc lọ có nắp có thể xuyên thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất là một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được mô tả trong bản mô tả này.

Chế phẩm được bao gồm trong bộ kit theo sáng chế cũng có thể được bào chế thành chế phẩm tương hợp xi-lanh. Trong trường hợp này, vật đựng bản thân nó có thể là xi-lanh, pipet, và/hoặc dụng cụ tương tự khác, mà từ đó chế phẩm có thể được áp dụng cho vùng bị nhiễm của cơ thể, và/hoặc thậm chí áp dụng cho và/hoặc phối trộn với thành phần khác của bộ kit. Thành phần của bộ kit theo cách khác có thể được cung cấp dưới dạng bột khô. Khi thuốc thử và/hoặc thành phần được cung cấp dưới dạng bột khô, chế phẩm có thể hoà tan có thể được hoàn nguyên bằng cách thêm dung môi thích hợp. Dự tính là dung môi cũng có thể được cung cấp trong một vật đựng khác và là thích hợp để sử dụng.

Theo một số phương án, bộ kit còn bao gồm chất bổ sung để điều trị bệnh ung thư hoặc bệnh nhiễm trùng, và chất bổ sung này có thể kết hợp với kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người, hoặc thành phần khác của bộ kit theo sáng chế hoặc có thể được cung cấp riêng rẽ trong bộ kit. Cụ thể là, bộ kit được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung như là chất được mô tả trong mục “Liệu pháp kết hợp” được mô tả ở trên. Bộ kit có thể được chế tạo theo yêu cầu của một bệnh ung thư cụ thể cho một cá thể và bao gồm liệu pháp ung thư thứ hai tương ứng cho cá thể đó như được mô tả ở trên.

Hướng dẫn sử dụng phân tử kháng thể hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này nói chung bao gồm thông tin về liều lượng, lịch biểu liều dùng, đường dùng cho điều trị dự định, cách hoàn nguyên kháng thể và/hoặc cách pha loãng kháng thể theo sáng chế. Hướng dẫn sử dụng được cung cấp trong bộ kit của sáng chế thường là hướng dẫn sử dụng bằng văn bản trên nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng (ví dụ, tờ giấy được bao gồm trong bộ kit ở dạng tờ rơi hoặc cầm nang hướng dẫn sử dụng). Theo phương án nhất định, bộ kit có thể bao gồm hướng dẫn để sử dụng theo phương pháp bất kỳ được

mô tả trong bản mô tả này. Hướng dẫn sử dụng được bao gồm có thể bao gồm mô tả cách sử dụng được phẩm bao gồm kháng thể để làm tăng cường đáp ứng miễn dịch và/hoặc để điều trị bệnh như được mô tả trong bản mô tả này. Bộ kit có thể còn bao gồm mô tả cách lựa chọn cá thể thích hợp cho điều trị dựa vào nhận dạng xem cá thể này có bệnh liên quan đến tín hiệu PD-1, ví dụ, bệnh được mô tả trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hình vẽ và ví dụ dưới đây được đưa ra để cung cấp cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này mô tả đầy đủ làm thế nào để thực hiện và sử dụng sáng chế, và không nhằm để giới hạn phạm vi mà các tác giả cho là sáng chế cũng như không định cam đoan là thử nghiệm dưới đây là tất cả hoặc thử nghiệm duy nhất đã thực hiện. Trong khi sáng chế đã được mô tả có dẫn chiếu đến phương án cụ thể của nó, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được là thay đổi khác nhau có thể thực hiện và phương án tương đương có thể được thay thế mà không tách rời với bản chất và phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, nhiều cải biến có thể được thực hiện để thích ứng tình huống, chất, hợp chất, quy trình, bước hoặc các bước của quy trình cụ thể với mục đích, bản chất và phạm vi của sáng chế. Tất cả cải biến này là dự định bao gồm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Ghép CDR với dòng tế bào mầm của người (khung của người)

Bước thứ nhất để làm cho kháng thể tương thích với người là ghép vùng CDR kháng PD-1 của chuột vào dòng tế bào mầm của người. Ba chuỗi nặng dòng tế bào mầm của người (IGHV7-4-1*02, IGHV1-46*01, IGHV3-20*01) và hai dòng tế bào mầm cho chuỗi nhẹ (IGKV2-30*02, IGKV3-11*01) được thử nghiệm. Như thể hiện trong Bảng 1, chuỗi nặng IGHV7-4-1*02 dòng tế bào mầm và IGKV2-30*02 có % độ tương thích với người cao nhất, cao hơn mức 85% cần thiết để kháng thể được coi là tương thích với người.

Ghép CDR	Dòng tế bào mầm của người IMGT	% độ tương thích với người vùng thay đổi
Chuỗi nặng	IGHV7-4-1	89,8
	IGHV1-46*01	79,6
	IGHV3-20*01	82,7
Chuỗi nhẹ	IGKV2-30*02	89

	IGKV3-11*01	80
--	-------------	----

Bảng 1: điểm nhân tính T20 được xác định bằng cách sử dụng Cơ sở dữ liệu ngưỡng của người. <http://abAnalyzer.lakepharma.com>: nói chung, trình tự độ dài đầy đủ mà có ngưỡng trên 85 được xem là tương tự như của người.

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đồng chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào COS bám dính. Nồng độ của kháng thể được đánh giá trong dịch nổi của tế bào COS bằng cách sử dụng ELISA kẹp (kháng thể của lừa kháng Fc của người được cố định để phát hiện và đánh giá kết quả bằng cách sử dụng kháng thể của chuột kháng kappa của người + kháng thể của dê kháng chuột được liên hợp peroxidaza). Tính toán nồng độ bằng cách sử dụng chất chuẩn IvIgG của người (ng/ml). Như thể hiện trong Bảng 2, thu được năng suất tốt ở tế bào COS đối với dòng tế bào mầm IGHV7-4-1 và IGKV2-30*02 (tổ hợp có % độ tương thích với người cao nhất), trong khi đó tổ hợp với dòng tế bào mầm IGHV3-20*01 và IGKV3-11*01 làm giảm đáng kể năng suất của kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người. Ngoài ra, lưu ý là tổ hợp khác cũng cho năng suất tốt.

(ng/ml)	VH Kiểu hoang khảm	VH IGHV7-4-1	VH IGHV1-46*01	VH IGHV3-20*01
VL kiểu hoang khảm	3459,4	1377,2	1400,9	586,7
VL IGKV2- 30*02	2459,4	1959,0	2743,2	1888,7
VL IGKV3- 11*01	3166,0	1713,4	2368,7	735,0

Bảng 2: Nồng độ của kháng thể kháng PD1 được sản xuất trong dịch nổi của tế bào động vật có vú COS.

Phân tích liên kết của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người được thực hiện đối với protein PD1 của người bằng ELISA. hPD1 tái tổ hợp (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung quốc; reference 10377-H08H) được cố định trên chất dẻo ở 0,5 µg/ml trong đệm cacbonat (pH9,2) và dịch nổi của tế bào COS được thêm vào ở nhiều nồng độ để đo hiệu lực liên kết. Sau khi ủ và rửa, IgG của lừa kháng người được đánh dấu peroxidaza (Jackson ImmunoResearch; Mỹ; reference 709-035-149) được thêm

vào và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường.

ED50 (ng/ml)	VH kiểu hoang khảm	VH IGHV7-4-1	VH IGHV1-46*01	VH IGHV3-20*01
VL kiểu hoang khảm	6,9	7,9	6,3	9,0
VL IGKV2- 30*02	8,5	8,2	6,7	7,0
VL IGKV3- 11*01	7,4	6,4	5,1	5,7

Bảng 3: xác định ED50 chỉ ra nồng độ cần thiết để đạt được 50% tín hiệu trong thử nghiệm này đối với mỗi kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người. Kháng thể kháng PD-1 chưa được tinh chế do tế bào COS sản xuất được sử dụng trong thử nghiệm này.

Tất cả dòng tế bào được ghép CDR có khả năng liên kết tương tự với PD-1 so với kháng thể khảm (VHwt+VLwt), khẳng định tính chất sinh học của kháng thể PD-1 (Bảng 3). Khung IGHV7-4-1 và VL-CDR với khung IGKV2-30*02 được lựa chọn do % độ tương thích với người cao, lần lượt là 89,8% và 89% (2) trình tự bổ trợ cao hơn so với trình tự gốc của kháng thể, (3) bảo toàn hoạt tính sinh học *in vitro* và (4) năng suất tốt ở tế bào động vật có vú.

Bước làm tương thích với người thứ hai gồm có gây đột biến trình tự CFS thu được từ chuột để làm tăng % độ tương thích với người cao và loại bỏ vị trí khử amin hoặc glycosyl hoá ở chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà có thể làm mất ổn định kháng thể trong quá trình sản xuất. Nhiều trình tự được đột biến được liệt kê trong Bảng 4 đã được tạo ra và được thử nghiệm về khả năng sản xuất và hoạt tính sinh học của chúng. Trình tự chuỗi nhẹ cũng trình diện vị trí glycosyl hoá ở CDR1 (trình tự “NG”), mà có thể làm giảm độ ổn định của sản phẩm trong quá trình sản xuất. Để loại bỏ vị trí glycosyl hoá này, axit amin G29 được thay thế vào axit amin T dẫn đến chuỗi “LD” (vị trí axit amin được xác định theo cách đánh số Kabat tương ứng với G34 trong SEQ ID NO:37). Kháng thể HCLD là ứng cử viên tốt nhưng trình diện vị trí khử amin (trình tự DS) trong vùng CDR3 của chuỗi nặng. Trình tự này có thể làm giảm độ ổn định của sản phẩm trong quá trình sản xuất. Để loại bỏ trình tự DS này, các tác giả sáng chế đã tạo ra trình

tự thay thế HE, HG, HH, HI, HJ, HK, HL, bằng cách thay thế axit amin D105 hoặc axit amin S106.

Seq ID	Tên	Trình tự axit amin
29	HC	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>S</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
30	HE	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>T</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
31	HG	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>E</u> <u>S</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
32	HH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>H</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDP

		EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
33	HI	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>A</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
34	HJ	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>Y</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
35	HK	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>N</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
36	HL	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREREPGM <u>D</u> <u>E</u> WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP

		EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
37	LC	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHAN <u>NG</u> NTYLEWYQQRPGQSPRLLIY KVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGTHVPNTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
38	LD	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHAN <u>NT</u> NTYLEWYQQRPGQSPRLLIY KVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGTHVPNTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

Bảng 4: Trình tự axit amin của biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người được sử dụng trong ví dụ dưới đây.

Ví dụ 2: Phân tích liên kết của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đối với protein PD1 của người bằng Blitz, ELISA và đếm tế bào dòng chảy.

hPD1 tái tổ hợp (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) được cố định trên chất dẻo ở 0,5 µg/ml trong đệm cacbonat (pH=9,2) và kháng thể đã tinh chế được thêm vào để đo mức liên kết. Sau khi ủ và rửa, IgG của lừa kháng người được đánh dấu peroxidaza (Jackson ImmunoResearch; Mỹ; reference 709-035-149) được thêm vào và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường.

	ED50 ng/ml
Khảm	16,79
HCLD	12,66
HELD	19,23
HGLD	14,75
HHL D	16,39
HILD	11,55
HJLD	13,44
HKLD	11,42
HLLD	16,58

Bảng 5: Xác định ED50 từ Fig. 1A chỉ nồng độ cần thiết để đạt được 50% tín hiệu trong thử nghiệm này đối với kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người. Kháng thể đã tinh chế kháng PD-1 được sản xuất bởi tế bào HEK được sử dụng trong thử nghiệm này.

	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
Khảm	1,29	2,26e5	2,91e-4
HCLD	1,34	3,19e5	4,29e-4
HELD	1,14	4,43e5	5,07e-4
HGLD	1,28	2,74e5	3,52e-4
HHLĐ	0,84	4,05e5	3,43e-4
HILD	0,93	4,58e5	4,27e-4
HJLD	1,05	4,1e5	4,32e-4
HKLD	0,75	3,51e5	2,62e-4
HLLD	1,25	4,41e5	5,54e-4

Bảng 6: Phân tích ái lực tổng (avidity) của kháng thể kháng PD1 với protein tái tổ hợp PD1 của người được đo bằng Blitz.

Ab	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
Khảm	1,01 ^E -9	2,43 ^E 5	2,45 ^E -4
HKLD	4,1 ^E -9	3,24 ^E 5	0,05137
KEYTRUDA	4,42 ^e -9	4,5 ^e 5	0,00428

Bảng 7: Phân tích ái lực của kháng thể kháng PD1 với protein tái tổ hợp PD1 của người được đo bằng Biacore.

	pM
HGLD	1543,68523
HHLĐ	133,273506
HILD	118,262072
HJLD	241,404054
HKLD	187,312713
HLLD	223,473437

HELD	401,699408
HCLD	278,261503
Khảm	611,914193

Bảng 8: Xác định ED50 từ Fig. 1C chỉ ra nồng độ cần thiết để đạt được 50% tín hiệu trong thử nghiệm này đối với mỗi kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người.

Tên	Seq ID	T20
VH_đồng thuận	17	90,86
HC	18	91,28
HE	19	91,06
HG	20	90,3
HH	21	90,94
HI	22	91,06
HJ	23	91,2
HK	24	91,07
HL	25	91,28
VL_đồng thuận	26	89,5
LC	27	89,55
LD	28	88,7

Bảng 9: T20 % nhân tính được xác định bằng cách sử dụng Cơ sở dữ liệu ngưỡng của người: <http://abAnalyzer.lakepharma.com>: Nói chung, trình tự độ dài đầy đủ mà điểm trên 85 được coi là kháng thể tương tự của người.

Điểm T20	VH	VL
Keytruda	75,7	82,7
HKLD	91,07	88,7

Bảng 10: T20 % nhân tính được xác định bằng cách sử dụng Cơ sở dữ liệu ngưỡng của người: <http://abAnalyzer.lakepharma.com>: Nói chung, trình tự độ dài đầy đủ mà điểm trên 85 được coi là tương tự của người.

Kết quả: Sau các giai đoạn làm tương thích với người cho kháng thể của chuột kháng PD1 của người (được gọi trong bản mô tả này là kháng thể khảm), một vài kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người được chọn lọc về khả năng liên kết tốt của chúng với PD1 của người (protein tái tổ hợp cũng như PD1 được biểu hiện bề mặt tế bào) so với kháng thể khảm. Fig. 1 (A) và Bảng 5 cho thấy bằng phương pháp khác nhau kháng thể HKLD có hoạt tính liên kết tốt nhất trong số kháng thể biến thể và khả năng liên kết được cải thiện so với kháng thể khảm. Fig. 1B khẳng định khả năng liên kết tương tự đối với tế bào của người khi kháng thể được kết hợp với biến thể chuỗi nhẹ LC. Chỉ số ái lực tổng trong Bảng 6 chỉ ra là HKLD cho KD tốt nhất trong số các kháng thể biến thể và KD được cải thiện so với kháng thể khảm. Bảng 7 so sánh chỉ số đo ái lực với PD1 của kháng thể khảm, HKLD và kháng thể PD1 khác tương tự Keytruda, kháng thể kháng PD-1 đã được cho phép sử dụng trên lâm sàng, và chứng tỏ là HKLD biến thể có ái lực tương tự so với Keytruda. Trong thử nghiệm này, ái lực của kháng thể được đo bằng cách cố định kháng thể kháng Fc, cho phép đo ái lực của một hoá trị của kháng thể PD-1, trái với thử nghiệm Blitz mà sử dụng PD-1 cố định và kháng thể hoà tan. Mặc dù ái lực của kháng thể biến thể kháng PD-1 cho ái lực/ái lực tổng tương tự đối với protein PD-1, trong hệ dựa trên tế bào, tác giả sáng chế bất ngờ nhận thấy là HKLD liên kết PD-1+ tế bào T tốt hơn so với dạng khảm của kháng thể, như thể hiện trên Fig. 1C và Bảng 8. Mặt khác, biến thể HGLD mất khả năng liên kết so với dạng khảm kháng PD-1. Ngoài HGLD, các tác giả sáng chế cũng cho thấy là, trong quá trình làm tương thích với người, một vài đột biến gây cảm ứng mất khả năng liên kết PD1. Fig. 2 (từ A đến E) cho thấy là axit amin được đánh số bằng phương pháp Kabat 96 và 97 trên miền thay đổi chuỗi nặng và axit amin được đánh số Kabat 28, 34, 94 trên miền thay đổi chuỗi nhẹ là quan trọng đối với khả năng liên kết PD1 và do đó không cần được gây đột biến. Bảng 9 trình bày mức độ tương thích với người (điểm nhân tính T20) đối với mỗi miền thay đổi đã chọn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Xác định T20 chỉ ra điểm nhân tính rất mạnh đối với mỗi miền thay đổi của kháng thể biến thể đã chọn, cụ thể là từ 88 đến 91,28%. Bảng 10 cho thấy là điểm T20 của kháng PD-1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) là tốt hơn so với Keytruda chuẩn, trình tự kháng PD-1 đã được mô tả và phê duyệt trên lâm sàng (chuỗi nặng 75,7 so với 91,07% và chuỗi nhẹ 82,7 so với 88,7%).

Ví dụ 3: Năng suất kháng thể sau khi chuyển nhiễm tạm thời ở tế bào CHO và COS của động vật có vú

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đồng chuyển nhiễm tạm thời vào tế bào COS bám dính hoặc tế bào CHO. Nồng độ của kháng thể được đánh giá trong dịch nổi của tế bào COS và CHO bằng cách sử dụng ELISA kẹp (kháng thể của lừa kháng Fc của người được cố định để phát hiện và hiện kết quả bằng kháng thể của chuột kháng kappa của người + kháng thể của dê kháng chuột được liên hợp peroxidaza). Xác định nồng độ bằng chất chuẩn IvIgG của người. Năng suất được tính là lượng kháng thể đã tinh chế trên một lít dịch nổi nuôi cấy đã thu gom.

	CHO sản xuất (mg/L)	COS sản xuất (mg/L)
Khảm	4,6	1,67
HCLD	9,58	7,21
HELD	11,71	4,03
HGLD	12,15	6,91
HHLD	12,80	4,48
HILD	11,41	5,81
HJLD	12,67	5,80
HKLD	14,08	6,35
HLLD	14,35	4,85

Bảng 11: Hiệu suất cao khi được sản xuất ở tế bào động vật có vú (COS và CHO). Năng suất cao hơn của dạng được làm tương thích với người của kháng thể so với kháng thể khảm.

	Ngày 0		Ngày 7 sau khi ủ ở 37°C	
	% dạng monome	% dạng kết tụ	% dạng monome	% dạng kết tụ
HCLC	94,8	2,5	96,1	1,1
HCLD	91,4	6,6	90,5	7
HELC	98,7	1,3	98,8	1,2
HELD	97,2	2,1	96,4	2,4
HGLD	97,45	2,55	96,57	3,43
HHLD	97,32	2,68	97,82	2,18
HILD	96,16	3,84	96,14	3,86
HJLD	97,74	2,26	98,28	1,72
HKLD	96,9	3,1	97,12	2,88
HLLD	96,98	3,02	96,73	3,27

Bảng 12: Độ ổn định của kháng thể kháng PD-1 sau khi ủ ở 37°C trong 7 ngày. Kháng

thể được ủ trong 7 ngày ở 4°C hoặc 37°C. Từ sắc ký khuếch tán loại trừ, đánh giá % dạng monome và dạng kết tụ. Ngày 0 được sử dụng làm đối chứng dương tính trong các thử nghiệm này.

Kết quả: các biến thể khác nhau được sản xuất ở tế bào động vật có vú như là CHO hoặc COS và kết quả được trình bày trong bảng 11 bất ngờ cho thấy là kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người có hiệu suất tốt hơn (mg/L) so với kháng thể khảm ở cả hai loại tế bào. HKLD cho hiệu suất tốt nhất. Trong tế bào CHO, hiệu suất đối với kháng thể này tăng 3 lần và gần như 4 lần ở tế bào COS. Song song, độ ổn định của phân tử được đánh giá *in vitro*, như thể hiện trong Bảng 12, tất cả biến thể cho độ ổn định tốt ở 4°C và 37°C với mức kết tụ thấp. Kết quả đó chỉ ra là kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người theo sáng chế cho khả năng sản xuất rất tốt, điều này rất quan trọng cho bước tiếp theo của phát triển trên lâm sàng và ứng dụng trị liệu.

Trong thử nghiệm thứ hai sử dụng phương pháp sản xuất tế bào CHO, năng suất của biến thể HKLD được so sánh với năng suất của Keytruda và kháng thể kháng PD-1 khảm. Như thể hiện trên Fig. 6, các tác giả sáng chế nhận thấy năng suất gia tăng với biến thể HKLD so với khung khảm và khung của Keytruda. Trong thử nghiệm này, năng suất được kiểm tra ở quy mô nhỏ (đĩa 12 giếng, chuyển nhiễm tạm thời trên tế bào bám dính) và trong bình phản ứng sinh học (sản xuất ở tế bào CHO được nạp liệu theo mẻ không được tối ưu hoá). Thu được hiệu suất cao 2g/L đối với biến thể HKLD, khẳng định năng suất cao của kháng thể trong quá trình sản xuất quy mô lớn.

Ví dụ 4: Thử nghiệm cạnh tranh để đo hoạt tính chất đối kháng của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đối với tương tác PD-PDL1 và PD1-PDL2:

	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
Không có kháng thể	1,83 e-7	3,68 E4	6,71 E-3
HCLD	7,15 E-3	10,1	7,2 E-2
HELD	5,91 E-3	14,9	1,04 E4
HGLD	9,8 E-3	28,3	5,34 E-2
HHLD	8,54 E-3	112,2	1,04 E-1

HILD	1,12 E-3	790	88,8 E-1
HJLD	2,79 E-3	65,4	5,67 E4
HKLD	4,59 E-3	18,8	8,62 E-2
HLLD	2,15 E-3	99,6	2,14 E-1

Bảng 13: Xác định bằng Blitz mức ức chế tương tác PD1-PDL1 khi có mặt kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người khác nhau: đo ka (1/Ms), kd (1/s) và KD (nM).

	IC50 ng/mL
Khảm	253,15
HCLD	196,11
HELD	196,43
HGLD	177,57
HHLD	201,4
HILD	175,4
HJLD	193,95
HKLD	205,32
HLLD	155,72

Bảng 14: Khả năng chất đối kháng của kháng thể PD-1 phong bế liên kết PD-L1. Xác định IC50 (ng/ml) thu được với kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người khác nhau từ Fig. 4C.

Phân tích sự truyền tín hiệu PD-1 bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học dựa trên tế bào DiscoverX

Đánh giá khả năng của kháng thể kháng PD-1 phong bế tín hiệu PD-1/pSHP-1 bằng thử nghiệm tín hiệu DiscoverX PathHunter® Jurkat PD-1 (SHP1) (reference 93-1104C19). Trong thử nghiệm này, tế bào T Jurkat biểu hiện ổn định thụ thể PD-1 khảm được dung hợp với mảnh Beta-gal (ED) và SHP1 được tạo ra bằng công nghệ di truyền được dung hợp với mảnh Beta-gal bổ trợ (EA). Đồng nuôi cấy tế bào Jurkat với tế bào trình diện PD-L1 dẫn đến phosphoryl hoá PD-1, tuyển mộ SHP-1 được tạo ra bằng công nghệ di truyền và sự bổ trợ của mảnh ED và EA tạo ra enzym Beta-gal hoạt tính và tín hiệu phát quang sinh học sau khi thêm cơ chất vào. Độ hoá phát quang là tỷ lệ với mức hoạt hoá truyền tín hiệu PD-1. Thử nghiệm được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản

xuất. Vấn tất là, tế bào PD-1+ Jurkat được ủ với nồng độ khác nhau của kháng thể kháng PD-1 trong 1 giờ, tiếp đó đồng nuôi cấy với tế bào PD-L1+ thêm một giờ nữa. Thuốc thử phát hiện được thêm tín hiệu phát quang được đọc 180 phút sau khi sử dụng thiết bị đọc đĩa TecanTM. Kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người được thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau. Dữ liệu được biểu thị bằng RLU (Tín hiệu phát quang tương đối). IC50 (ng/mL) chỉ nồng độ cần thiết để đạt được 50% mức ức chế tín hiệu.

	IC50 ng/mL
Khảm	16,79
HCLD	12,66
HELD	19,23
HGLD	14,75
HHL D	16,92
HILD	11,55
HJLD	13,44
HKLD	11,42
HLLD	16,58

Bảng 15: Khả năng chất đối kháng của kháng thể PD-1 phong bế tín hiệu ức chế qua trung gian PD-1: Xác định IC50 (ng/mL) mà chỉ ra nồng độ cần thiết để đạt được 50% mức ức chế tín hiệu từ Fig. 7A.

Ví dụ 5: Thử nghiệm hoạt hoá tế bào sử dụng thử nghiệm sinh học dựa vào tế bào Promega

Khả năng của kháng thể kháng PD-1 khôi phục hoạt hoá tế bào T được thử nghiệm bằng cách sử dụng bộ kit Promega PD-1/PD-L1 (Reference J1250). Hai dòng tế bào được sử dụng là (1) tế bào T hiệu ứng (Jurkat biểu hiện ổn định PD-1, luxiferaza được gây cảm ứng NFAT) và (2) tế bào đích hoạt hoá (tế bào CHO K1 biểu hiện ổn định PDL1 và protein tế bào được thiết kế để kích thích TCR cùng nguồn theo cách độc lập với-kháng nguyên. Khi tế bào được đồng nuôi cấy, tương tác PD-L1/PD-1 ức chế sự hoạt hoá qua trung gian TCR nhờ đó phong bế sự hoạt hoá NFAT và hoạt tính luxiferaza. Việc bổ sung thêm kháng thể kháng PD-1 phong bế tín hiệu ức chế qua trung gian PD-1 dẫn đến hoạt hoá NFAT và tổng hợp luxiferaza và phát tín hiệu phát quang sinh học. Thử nghiệm được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Dịch pha loãng theo bậc của kháng thể PD-1 được thử nghiệm. Bốn giờ sau khi đồng nuôi cấy PD-L1+ tế bào đích, tế bào hiệu ứng PD-1 và kháng thể kháng PD-1, cơ chất BioGloTM luciferin được

thêm vào giếng và đọc đĩa bằng cách sử dụng máy đo phát quang Tecan™. Độ phát quang đã do sử dụng máy đo phát quang phản ánh mức hoạt hoá tế bào T. Dịch pha loãng theo bậc của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người được thử nghiệm. ED50 (ug/mL) chỉ nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được 50% độ phát quang tối đa.

	ED50 ug/mL
Khảm	0,29
HCLD	0,41
HELD	0,46
HGLD	1,16
HHLD	0,54
HILD	0,40
HJLD	0,90
HKLD	0,69
HLLD	0,89

Bảng 16: kháng thể kháng PD-1 làm tăng tiềm lực hoạt hoá tế bào T in vitro: Xác định ED50 (µg/mL) mà chỉ ra nồng độ của kháng thể cần thiết để đạt được 50% độ phát quang tối đa từ Fig. 8.

Kết quả: Sau khi đo khả năng liên kết của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người khác nhau với PD1, khả năng ức chế của mỗi kháng thể biến thể phong bế tương tác PD1-PDL1 được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp khác nhau (Biacore, Blitz và ELISA). Fig. 4A thể hiện đáp ứng ức chế của biến thể: kháng thể HCLC, HCLD và HELC, HELD so với kháng thể khảm đối với tương tác PD1-PDL1. Fig. 4B thể hiện đáp ứng ức chế của các biến thể kháng thể HCLD, HELD, HGLD, HILD, HJLD, HKLD và HLLD đối với khả năng liên kết của PDL1 với PD1. Bảng 13 cho thấy sự có mặt của tất cả kháng thể biến thể ức chế liên kết của PDL1 với PD1. Kết quả thu được với HCLC và HELC là tương tự kết quả trình bày trong bảng 13 (dữ liệu không được thể hiện). Fig. 4C cho thấy hiệu lực cạnh tranh của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người ở các nồng độ khác nhau dẫn đến xác định IC50 cho mỗi biến thể (Fig. 4C và bảng 14). PD1 có khả năng liên kết một phối tử khác được biểu hiện trên bề mặt tế bào: PDL2. Fig. 5A và B cho thấy là kháng thể biến thể kháng

PD-1 HELC, HELD và HKLD cũng phong bế tương tác PD1-PDL2, như được đo bằng thử nghiệm Biacore và ELISA PD-L2/PD-1 chất đối kháng.

Để khẳng định kết quả đó, thử nghiệm sinh học đánh giá sự phosphoryl hoá của SHP1, protein tín hiệu từ con đường PD-1 được thực hiện. Fig. 7A và B, thể hiện đáp ứng-liều dùng ức chế thu được bằng kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đối với sự phosphoryl hoá SHP1. Bảng 15 trình bày IC50 đối với mỗi kháng thể biến thể cho thấy hiệu lực ức chế tương tự đối với tất cả các biến thể lên sự hoạt hoá PD1. Tuy nhiên, hai biến thể gọi là biến thể HCLD và biến thể HKLD là hiệu quả hơn khi ức chế tín hiệu P-SHP1 so với ví dụ biến thể HELD. Đường đồ thị ức chế cho thấy ức chế tốt hơn với HCLD và HKLD gần với khung khảm, trong khi đó biến thể được làm tương thích với người HLLD hoặc HJLD mất khả năng chất đối kháng nhất định. Song song, hoạt hoá tế bào T được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học phát quang sinh học NFAT để so sánh hiệu lực ức chế của tất cả kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đã chọn trong ức chế tương tác PD1-PDL1 dẫn đến hoạt hoá tế bào T (ức chế tương tác điểm kiểm tra ức chế). Fig. 8 cho thấy là tất cả biến thể được thử nghiệm có khả năng hoạt hoá tín hiệu NFAT qua trung gian TCR nhưng có độ hiệu lực và hiệu quả khác nhau. Tín hiệu RLU tối đa thu được ở pha ổn định phản ánh hiệu lực. Tác giả sáng chế nhận thấy là biến thể HCLD, biến thể HKLD có hiệu lực tốt hơn ví dụ so với biến thể HELD hoặc biến thể HLLD. Hiệu lực này được xác định bằng EC50 (Bảng 16). Kháng thể khảm và tất cả các biến thể là có hiệu lực hoạt hoá NFAT và các biến thể HCLD, HILD, HKLD, HHLD, HELD và HKLD là hiệu quả nhất trong hoạt hoá tế bào T.

Ví dụ 6: Bài tiết IFNg bởi tế bào T của người

Để chứng tỏ hiệu quả của biến thể HKLD trong kích thích sự bài tiết xytokin hiệu ứng bởi tế bào T của người, tác giả sáng chế đã thực hiện thử nghiệm phản ứng bạch cầu hỗn hợp bằng cách đồng nuôi cấy tế bào tua và tế bào T cùng loài. Như thể hiện trên Fig. 9, biến thể HKLD làm tăng bài tiết của xytokin IFNg theo cách phụ thuộc liều dùng.

Tất cả các kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đã chọn có khả năng ức chế liên kết của PD1 với PDL1 và PDL2 theo cách ít nhất là tốt như kháng thể khảm. Tất cả các biến thể đều có khả năng hoạt hoá tế bào T. Trong thử nghiệm sinh học, giống như ức chế P-SHP1 hoặc hoạt hoá NFAT thông qua tín hiệu

PD1, tác giả sáng chế nhận thấy là ba biến thể là hiệu quả hơn biến thể còn lại, đó là HCLD, HKLD và HILD. Biến thể này thể hiện tín hiệu tương tự như kết quả của kháng thể khảm và phong bế PD1 được cải thiện so với biến thể còn lại. So với biến thể còn lại, biến thể HILD và HKLD chứng tỏ tính chất tốt nhất với khả năng sản xuất cao và năng suất ở hệ thống sản xuất dựa vào tế bào động vật có vú đồng thời bảo toàn hoạt tính sinh học: ái lực cao đối với PD-1, khả năng chất đối kháng đối với PD-L1 và PD-L2 và khả năng khôi phục hoạt hoá tế bào T (ức chế đối với pSH-P-1, hoạt hoá NFAT, thúc đẩy sự bài tiết xytokin hiệu ứng IFN γ).

Ví dụ 7: Hiệu quả in vivo của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người

Hiệu quả của kháng thể kháng PD-1 của người được đánh giá trong nhiều mô hình in vivo ở chuột có thẩm quyền miễn dịch được biến đổi gen để biểu hiện PD-1 của người (exon 2). Cho mô hình u trung biểu mô, tế bào trung biểu mô AK7 được tiêm trong màng phổi (3×10^6 tế bào/chuột) sau đó được điều trị vào ngày 5/8/12/15 bằng đối chứng kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) ở 1 mg/kg. Tế bào AK7 đã tiêm biểu hiện ổn định luxiferaza cho phép phát sinh tín hiệu phát quang sinh học in vivo sau khi tiêm trong màng bụng D-luciferin ($3 \mu\text{g}$ /chuột, GoldBio, Saint Louis MO, Mỹ, Reference 115144-35-9). 10 phút sau khi tiêm luciferin, tín hiệu phát quang sinh học được đo bằng Biospace Imager ở lưng và bụng của chuột trong 1 phút. Phân tích dữ liệu theo photon/giây/cm² mỗi steradian và biểu thị trung bình của tín hiệu ở lưng và bụng. Mỗi nhóm biểu thị trung bình $\pm$ SEM của từ 5 đến 7 con/nhóm. Với mô hình MC38, tế bào ung thư đại tràng MC38 được tiêm dưới da bằng 5×10^5 tế bào ở bên sườn và thể tích khối u được tính toán bằng công thức $0,52 \times (\text{chiều dài} \times \text{chiều rộng})$. Chuột được điều trị khi khối u đạt đến kích thước 40-80mm³ bằng 10mg/kg kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) 3 lần một tuần trong 3 tuần. Cho mô hình caxinom gan đúng vị trí, $2,5 \times 10^6$ tế bào Hepa1.6 được tiêm vào tĩnh mạch cửa. Chuột được điều trị bằng 3mg/kg IgG4 đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) vào ngày 4/7/11/14/18/21 sau khi tiêm khối u.

Kết quả: Fig. 10 cho thấy sự phát triển khối u u trung biểu mô sau khi điều trị bằng kháng thể kháng PD1 đối chứng làm đối chứng dương tính hoặc bằng một trong số kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người (HKLD), đối chứng âm tính được chứng tỏ bằng cách điều trị chuột bằng PBS. Kháng PD1 được làm tương

thích với người của sáng chế chứng tỏ hiệu quả rất tốt trong kiểm soát sự phát triển khối u. Kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người (HKLD) có thể tiết trừ khối u u trung biểu mô AK7 như thể hiện trên Fig. 10A với mức 77% (10 trong số 13 chuột) hoặc 100% (7 chuột) so với đáp ứng hoàn toàn, tương ứng bằng 1 hoặc 3 mg/kg kháng thể (Fig. 10B). Hiệu lực *in vivo* được khẳng định trên 2 mô hình chuột còn lại. Ở caxinom đại tràng lạc chỗ MC38, kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người (HKLD) cải thiện đáng kể mức sống sót trung vị và thúc đẩy 50% mức đáp ứng hoàn toàn (5 trong số 10 chuột) (Fig. 11A và B). Tương tự, ở mô hình HCC đúng vị trí, kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người (HKLD) cải thiện mức sống sót của chuột ở mức 42% mức đáp ứng hoàn toàn (3 trong số 10 con chuột) (Fig. 12).

Ví dụ 8: Dược động học và dược lực học của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người *in vivo*

Dược động học và dược lực học của sản phẩm được đánh giá ở khỉ cynomolgus và chuột sau khi tiêm liều duy nhất. Để đánh giá dược động học ở chuột, BalbcRJ (giống cái 6-9 tuần) được tiêm trong ổ mắt hoặc tiêm dưới da liều duy nhất (5mg/kg) dạng khản, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) hoặc kháng thể Keytruda. Nồng độ kháng thể trong huyết tương được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng kháng thể chuỗi nhẹ kháng người đã cố định (clon NaM76-5F3) huyết thanh đã pha loãng có chứa kháng thể kháng PD-1 được thêm vào. Phát hiện bằng IgG của lừa kháng người được đánh dấu peroxidaza (Jackson ImmunoResearch; Mỹ; reference 709-035-149) được thêm vào và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường.

Khỉ Cynomolgus được tiêm trong tĩnh mạch kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) ở liều 1 hoặc 5mg/kg. Máu toàn phần và huyết thanh được thu gom ở nhiều thời điểm hoặc định lượng kháng thể kháng PD1 trong huyết thanh bằng ELISA. Kháng thể kháng PD-1 trong huyết thanh của khỉ, protein tái tổ hợp PD-1 được cố định và huyết thanh được pha loãng có chứa kháng thể kháng PD-1 được thêm vào. Phát hiện bằng kháng thể kappa kháng người được gắn nhãn sulfo và hiện kết quả bằng cách sử dụng công nghệ MSD.

Kết quả: Fig. 13A, B và C cho thấy là kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người có profin dược động học thuận lợi *in vivo* ở chuột và khỉ với đường đồ thị

động học tuyến tính. Ở chuột, dạng được làm tương thích với người kháng PD-1 (HKLD) với isotyp IgG1 N298A và IgG4 S228P có profin tương tự Keytruda, một kháng thể kháng PD-1 đã sử dụng trên lâm sàng và lưu hành trên thị trường. Ở khỉ cynomolgus, nhận thấy có tương quan tốt giữa liều dùng so với nồng độ trong máu vì lượng cao hơn trong huyết thanh của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người được phát hiện ở liều dùng 5mg/kg so với 1mg/kg. Dữ liệu này cho thấy kháng PD-1 được làm tương thích với người có profin được động học thuận lợi in vivo.

Ví dụ 9: Kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người làm tăng hiệu lực thực bào tế bào khối u qua trung gian đại thực bào thông qua phong bế tương tác PD-1/PD-L1 đối với tế bào này.

Biểu hiện PD-1 không chỉ giới hạn ở tế bào T, ví dụ, PD-1 cũng có thể được biểu hiện trên đại thực bào kèm theo khối u. Biểu hiện PD-L1 trên tế bào khối u có thể khơi mào tín hiệu ức chế trans ở đại thực bào phong bế tác dụng thực bào của chúng (Gordon et al., Nature. 2017 May 25;545(7655):495-499). Tuy nhiên, không được mô tả là liệu pháp phong bế PD-1/PD-L1 có thể tăng cường thực bào tế bào khối u âm tính PD-L1 hay không. Do đại thực bào M1 biểu hiện cả hai thụ thể trên bề mặt của chúng, có thể là PD-1 và PD-L1 liên kết trên cùng tế bào này và khơi mào sự truyền tín hiệu điều hoà âm tính ở đại thực bào. Ở đây, tác giả sáng chế đã chứng tỏ là kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người có thể khôi phục chức năng thực bào của đại thực bào kháng lại tế bào khối u âm tính PD-L1 thông qua phong bế tương tác PD-1/PD-L1 trên tế bào này.

Kết quả: Fig. 14A thể hiện biểu hiện của PD-1 và PD-L1 trên đại thực bào M0, M1 và tế bào Raji. Chỉ có đại thực bào M1 biểu hiện cả hai thụ thể PD-1 và PD-L1 và đại thực bào M0 biểu hiện PD-1 mức cao và không biểu hiện PD-L1, tế bào Raji không biểu hiện PD-L1. Fig. 14 B cho thấy là kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người bất ngờ tăng cường sự thực bào khối u âm tính PD-L1 bởi đại thực bào M1. So với kháng thể kháng PD-1 khác (pembrolizumab và nivolumab), kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người thậm chí hiệu quả hơn trong việc thúc đẩy sự thực bào tế bào khối u (Fig. 14 C). Do tế bào khối u không biểu hiện PD-L1 trong thử nghiệm này và đại thực bào M1 biểu hiện cả hai thụ thể PD1 và PDL1, thử nghiệm này gợi ý là kháng thể được làm tương thích với người có thể phong bế tương tác này (tương tác gây ra ức chế thực bào tế bào khối u) giữa PD-L1 và PD-1 trên cùng tế bào. Thực tế là, thử

nghiệm giống như vậy được thực hiện đại thực bào M0 mà không biểu hiện PD-L1 nhưng biểu hiện thụ thể PD-1 (Fig. 14A). Như thể hiện trên Fig. 14 D, kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người tăng cường sự thực bào của đại thực bào M1 trong khi đó không có tác dụng đối với thực bào M0 chứng tỏ là cả hai thụ thể, PD-1/PD-L1, là cần thiết cho tác dụng tăng cường được điều tiết bởi kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người. Dữ liệu này gợi ý là kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người trung hoà tương tác PD-1/PD-L1 trên đại thực bào M1 dẫn đến hoạt hoá lại sự thực bào tế bào khối u.

Tế bào Raji không biểu hiện PD-L2 phối tử khác của PD-1, như được mô tả ở chỗ khác (Andorsky et al, 2011, DOI: 10.1158/1078-0432), chứng tỏ là kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người có thể tăng cường sự thực bào tế bào khối u âm tính PD-L1 cũng như PD-L2.

Mặc dù đã thiết lập là sự phong bế PD-1–PD-L1 hoạt hoá lại tế bào T, ở đây, tác giả sáng chế chứng tỏ một tính chất mới của kháng thể kháng PD-1 thông qua sự tăng cường lại trực tiếp đại thực bào. Tác giả sáng chế đã chứng minh là kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người có thể phong bế tương tác của PD-1/PD-L1 trên cùng đại thực bào kích thích thực bào tế bào khối u âm tính PD-L1. Khía cạnh này được quan tâm đặc biệt trên lâm sàng do bệnh nhân biểu hiện PD-L1 trên bề mặt của tế bào khối u được điều trị bằng liệu pháp PD-1/PD-L1. Dữ liệu được trình bày ở đây cho thấy là ngay cả khối u âm tính PD-L1 có thể hưởng lợi từ kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người bằng cách hoạt hoá lại sự thực bào của đại thực bào.

Nguyên liệu và phương pháp

ELISA liên kết PD1

Cho thử nghiệm ELISA hoạt tính, hPD1 tái tổ hợp (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) được cố định trên chất dẻo ở 0,5µg/ml trong đệm cacbonat (pH=9,2) và kháng thể đã tinh chế được thêm vào để đo mức liên kết. Sau khi ủ và rửa, IgG của lừa kháng người được đánh dấu peroxidaza (Jackson ImmunoResearch; Mỹ; reference 709-035-149) được thêm vào và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường.

Thử nghiệm liên kết PD1 trên tế bào T của người được kích thích bằng đo huỳnh quang
tế bào

PBMC từ người tình nguyện khoẻ mạnh được hoạt hoá bằng kích thích kháng CD3/CD28 để kích thích tế bào T. Để đo mức liên kết của kháng PD1 trên tế bào T được kích thích của người, kháng thể được ủ trong 30 phút ở 4°C, và rửa trước khi nhuộm màu 30 phút ở 4°C bằng IgG-Fc kháng người được đánh dấu-PE (Biolegend; Mỹ; reference 409303). Mẫu được phân tích trên thiết bị đo huỳnh quang tế bào BD LSRII hoặc Canto II cổng tế bào CD3+ (tế bào T).

Đo ái lực tổng đối với PD1 bằng phương pháp Blitz

Ái lực liên kết/ái lực tổng được đo bằng phương pháp Blitz (Forté Bio; Mỹ; reference C22-2 No 61010-1). hPD1 tái tổ hợp-His (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) được cố định ở 10µg/ml bằng đuôi histidin vào bộ cảm biến sinh học Ni-NTA (Forté Bio; Mỹ; reference 18-0029) trong 30 giây. Sau đó, kháng thể kháng PD1 được kết hợp với 20µg/mL trong 120 giây. Phân ly kháng thể kháng PD1 trong đệm động học trong 120 giây. Phân tích dữ liệu bằng phần mềm Blitz pro 1.2, phần mềm này tính hằng số kết hợp (K_a) và hằng số phân ly (K_d) và xác định hằng số ái lực KD (K_a/K_d).

Đo ái lực bằng phương pháp PD1 của Biacore

Thực hiện đo ái lực bằng Biacore trên nền tảng PP2I (Inserm U1194, Université de Montpellier). Kháng thể kháng Fc của người (GEHealthcare) được cố định ở 25µg/ml trong đệm axetat pH=5. Kháng thể kháng PD1 của người (Keytruda, Opdivo, biến thể HKLD, khảm) được thêm vào ở 1,25nM và hPD1 tái tổ hợp His (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) được kết hợp ở các liều dùng khác nhau (từ 6,25nM đến 200nM) để tính toán hằng số kết hợp (K_a) và hằng số phân ly (K_d) và xác định hằng số ái lực KD (K_a/K_d).

Chất đối kháng ELISA: cạnh tranh giữa PDL1 hoặc PDL2 và kháng PD1 được làm tương thích với người

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh được thực hiện bằng cặp thử nghiệm ELISA sàng lọc chất ức chế PD-1:PD-L1 (AcroBiosystems; Mỹ; reference EP-101). Trong thử nghiệm này, hPDL1 tái tổ hợp được cố định trên chất dẻo ở 2µg/ml trong PBS đệm pH=7,4. Kháng thể đã tinh chế (ở các nồng độ khác nhau) được trộn với 0,66µg/ml nồng độ cuối cùng (nồng độ cố định) của PD1 của người được biotin hoá (AcroBiosystems; Mỹ; reference EP-101) để đo mức liên kết cạnh tranh trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi ủ và

rửa, streptavidin được đánh dấu peroxidaza (Vector laboratoring; Mỹ; reference SA-5004) được thêm vào để phát hiện liên kết Biotin-PD-1Fc và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường. Cho thử nghiệm ELISA cạnh tranh PDL-2/PD-1, quy trình tương tự được thực hiện ngoại trừ PD-L2 (Sinobiological, # 10292-H02H) được cố định trên chất dẻo ở 2µg/mL trong đệm PBS pH=7,4 thay vì PD-L1.

Phương pháp Blitz cạnh tranh với PDL1: PD1 + acs + PDL1

Phương pháp này được thực hiện bằng Blitz (Forté Bio; Mỹ; reference C22-2 No 61010-1). HPD1 tái tổ hợp-His (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) được cố định ở 10µg/ml bằng đuôi histidin vào bộ cảm biến sinh học Ni-NTA (Forté Bio; Mỹ; reference 18-0029) trong 30 giây. Trong bước thứ hai, kháng thể kháng PD1 được thêm vào ở 20µg/mL (nồng độ bão hòa) trong 120 giây. Tiếp đó, PDL1 của người (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10084-H02H) được kết hợp ở 100µg/mL, cạnh tranh với kháng thể kháng PD1, trong 120 giây. Phân ly của PDL1 được thực hiện trong đệm động học trong 120 giây. Phân tích dữ liệu bằng phần mềm Blitz pro 1.2, phần mềm này tính toán hằng số kết hợp (k_a) và hằng số phân ly (k_d) và xác định hằng số ái lực KD (k_a/k_d).

Thử nghiệm cạnh tranh bằng Biacore để đo ái lực giữa PDL2 và PD1 kết hợp với kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người

Đánh giá ái lực của protein tái tổ hợp PD-1 bằng Biacore (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) ủ trước với kháng thể kháng PD1 đối với protein tái tổ hợp PD-L2 của người (Sinobiological, 10292-H08H-B). PD-L2 tái tổ hợp của người được cố định trên chip cảm biến sinh học ở nồng độ 200µg/mL. Chip cảm biến sinh học sau đó được xử lý với Etanolamin 1M pH 8,4 trong 10 phút để làm bất hoạt vị trí tự do. Kháng thể phức hợp (200 nM) + PD-1 của người tái tổ hợp (100nM) được thêm vào và đáp ứng tương đối được đo bằng Biacore. Tính toán dữ liệu bằng % mức đáp ứng tương tác tương đối: 100% = đáp ứng tương đối PD-1.

Thử nghiệm cạnh tranh bằng phương pháp Blitz giữa PDL1 và kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người trên PD1.

Phương pháp này được thực hiện với Blitz (Forté Bio; Mỹ; reference C22-2 No 61010-1). HPD1 tái tổ hợp-His (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10377-H08H) được cố định ở 10µg/ml bằng đuôi histidin vào bộ cảm biến sinh học Ni-

NTA (Forté Bio; Mỹ; reference 18-0029) trong 30 giây. Trong bước thứ hai, PD1 được ủ với kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người ở 20µg/mL (nồng độ bão hoà) trong 120 giây. Tiếp đó, PDL1 của người (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; reference 10084-H02H) được kết hợp ở 100µg/mL, cạnh tranh với kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người, trong 120 giây. Phân ly của PDL1 được thực hiện trong đệm động học trong 120 giây. Phân tích dữ liệu bằng phần mềm Blitz pro 1.2, phần mềm này tính toán hằng số kết hợp (k_a) và hằng số phân ly (k_d) và xác định hằng số ái lực KD (k_a/k_d).

Thử nghiệm cạnh tranh bằng ELISA giữa PD1 được kết hợp với nồng độ khác nhau của kháng thể biến thể kháng PD1 được làm tương thích với người đối với PDL1 hoặc PD-L2

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh được thực hiện bằng cặp thử nghiệm ELISA sàng lọc chất ức chế PD-1:PD-L1 (AcroBiosystems; Mỹ; reference EP-101). Trong thử nghiệm này, hPDL1 tái tổ hợp được cố định trên chất dẻo ở 2µg/ml trong đệm PBS pH=7,4. Kháng thể đã tinh chế (ở nồng độ khác nhau) được trộn với 0,66µg/ml nồng độ cuối cùng (nồng độ cố định) của PD1 của người được biotin hoá (AcroBiosystems; Mỹ; reference EP-101) để đo mức liên kết cạnh tranh trong 2 giờ ở 37°C. Sau khi ủ và rửa, streptavidin được đánh dấu peroxidaza (Vector laboratoring; Mỹ; reference SA-5004) được thêm vào để phát hiện liên kết Biotin-PD-1Fc và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường.

Nghiên cứu độ ổn định bằng sắc ký khuếch tán loại trừ

Nghiên cứu độ ổn định bằng sắc ký khuếch tán loại trừ được thực hiện bằng cột loại trừ kích cỡ (GE healthcare; Thụy Điển, Superdex 200 10/300 GL; reference 17-5175-01) trên hệ thống tinh chế AkTA Prime (GE healthcare; Thụy Điển). Kháng thể kháng PD1, được ủ 7 ngày ở 37°C hoặc ở 4°C, được tiêm vào cột này (thể tích 100µl) và rửa giải bằng đệm PBS 30ml. Phân tích bằng phần mềm đánh giá PrimeView ((GE healthcare; Thụy Điển) để phân tích % dạng kết tụ và monome (thời gian lưu $T_m=11,7-12$ ml đối với monome).

Phân tích sự truyền tín hiệu PD-1 bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học dựa vào tế bào DiscoverX

Khả năng của kháng thể kháng PD-1 phong bế tín hiệu PD-1/pSHP-1 được đánh

giá bằng thử nghiệm tín hiệu PD-1 (SHP1) ở tế bào Jurkat DiscoverX PathHunter® (reference 93-1104C19). Trong thử nghiệm này, tế bào Jurkat T biểu hiện ổn định thụ thể PD-1 khả năng dung hợp với mảnh Beta-gal (ED) và SHP1 được tạo ra bằng công nghệ di truyền được dung hợp với mảnh Beta-gal hỗ trợ (EA). Đồng nuôi cấy tế bào Jurkat với tế bào trình diện PD-L1 dẫn đến phosphoryl hoá PD-1, tuyển mộ SHP-1 được tạo ra bằng công nghệ di truyền và sự hỗ trợ của mảnh ED và EA tạo ra enzym Beta-gal hoạt tính và tín hiệu phát quang sinh học sau khi thêm cơ chất vào. Độ hoạt phát quang là tỷ lệ với sự hoạt hoá truyền tín hiệu PD-1. Thử nghiệm được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Vấn đề là, tế bào Jurkat PD-1+ được ủ với nồng độ khác nhau của kháng thể kháng PD-1 trong 1 giờ, sau đó đồng nuôi cấy với tế bào PD-L1+ trong một giờ nữa. Thuốc thử phát hiện Detection được thêm vào, đọc tín hiệu phát quang 180 phút sau đó bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa Tecan™.

Thử nghiệm hoạt hoá tế bào T sử dụng thử nghiệm sinh học dựa vào tế bào Promega

Khả năng của kháng thể kháng PD-1 khôi phục hoạt hoá tế bào T được thử nghiệm bằng cách sử dụng bộ kit Promega PD-1/PD-L1 (Reference J1250). Hai dòng tế bào được sử dụng là (1) tế bào T hiệu ứng (Jurkat biểu hiện ổn định PD-1, luxiferaza được gây cảm ứng bởi NFAT) và (2) hoạt hoá tế bào đích (tế bào CHO K1 biểu hiện ổn định PDL1 và protein bề mặt được thiết kế để kích thích TCR cùng nguồn theo cách không phụ thuộc kháng nguyên. Khi tế bào được đồng nuôi cấy, tương tác PD-L1/PD-1 ức chế hoạt hoá qua trung gian TCR nhờ đó phong bế sự hoạt hoá NFAT và hoạt hoá luxiferaza. Bổ sung kháng thể kháng PD-1 phong bế tín hiệu ức chế qua trung gian-PD-1 dẫn đến hoạt hoá NFAT và tổng hợp luxiferaza và phát tín hiệu phát quang sinh học. Thử nghiệm được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Dịch pha loãng theo bậc của kháng thể PD-1 được thử nghiệm. Bốn giờ sau khi đồng nuôi cấy PD-L1+ tế bào đích, tế bào hiệu ứng PD-1, và kháng thể kháng PD-1, cơ chất BioGlo™ luciferin được thêm vào giếng và đọc đĩa bằng cách sử dụng máy đo phát quang Tecan™.

Thử nghiệm phản ứng bạch cầu hỗn hợp in vitro

Tế bào tua được biệt hoá từ bạch cầu đơn nhân CD14+ được phân lập từ PBMC của người (bộ kit phân lập cổ điển chưa cải biến bạch cầu đơn nhân Miltenyi # 130-117-337) bằng cách nuôi cấy trong 6 ngày với 20 ng/ml yếu tố kích thích quần thể đại thực bào-bạch cầu hạt và 20 ng/ml IL-4, và tiếp đó trộn ở tỷ lệ 1:10 với tế bào T CD4+ cùng

loài được phân lập từ người cho máu khoẻ mạnh (bộ kit phân lập Miltenyi, #130-096-533). Sau 5 ngày đồng nuôi cấy, dịch nổi được thu gom; nồng độ IFN- γ được định lượng bằng ELISA.

PD1 Knock được làm tương thích với người in vivo trên mô hình chuột

Hiệu quả của kháng thể kháng PD-1 của người được đánh giá in vivo trên mô hình chuột u trung biểu mô đúng vị trí ở chuột cạnh tranh miễn dịch được biến đổi gen để biểu hiện PD-1 của người (exon 2). Tế bào trung biểu mô AK7 được tiêm trong màng phổi (3×10^6 tế bào/chuột) tiếp đó được điều trị ở ngày 5/8/12/15 bằng đối chứng kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) ở 1 mg/kg. Tế bào AK7 đã tiêm biểu hiện ổn định luxiferaza cho phép phát ra tín hiệu phát quang sinh học in vivo sau khi tiêm trong màng bụng D-luciferin ($3 \mu\text{g}$ /chuột, GoldBio, Saint Louis MO, Mỹ, Reference 115144-35-9). 10 phút sau khi tiêm luciferin, tín hiệu phát quang sinh học signal được đo bằng Biospace Imager ở lưng và bụng của chuột trong 1 phút. Phân tích dữ liệu theo photon/giây/cm² mỗi steradian và biểu thị giá trị trung bình của tín hiệu ở lưng và bụng. Mỗi nhóm biểu thị giá trị trung bình $\pm$ SEM của từ 5 đến 7 chuột/nhóm. Với mô hình MC38, tế bào ung thư đại tràng MC38 được tiêm dưới da bằng 5×10^5 tế bào ở bên sườn trái. Thể tích khối u được tính toán bằng công thức $0,52 \times (\text{chiều dài} \times \text{chiều rộng})^{1,5}$. Chuột được điều trị khi khối u đạt đến kích thước $80\text{-}100\text{mm}^3$ bằng 10mg/kg kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) 3 lần một tuần trong 3 tuần. Cho mô hình caxinom gan Hepa1.6, $2,5 \times 10^6$ tế bào caxinom gan Hepa1.6 được tiêm vào tĩnh mạch cửa. Chuột được điều trị bằng 3mg/kg IgG4 đối chứng isotyp hoặc kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) vào ngày 4/7/11/14/18/21 sau khi tiêm khối u.

Dược động học và dược lực học của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người ở chuột và khỉ

Khỉ Cynomolgus được tiêm trong tĩnh mạch liều duy nhất của kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD), 1 hoặc 5mg/kg. Máu toàn phần và huyết thanh được thu gom ở nhiều thời điểm để đánh giá mức chiếm chỗ của thụ thể và định lượng kháng thể kháng PD1 trong huyết thanh. Để đánh giá dược động học của kháng thể kháng PD-1 được làm tương thích với người trong huyết thanh của khỉ, protein tái tổ hợp PD-1 (protein tái tổ hợp PD-1 của người-nhân his (Sino Biological, #10377-

H08H) được cố định và huyết thanh thanh pha loãng có chứa kháng thể kháng PD-1 được thêm vào. Phát hiện bằng kháng thể kappa kháng người được gắn nhãn sulflo (clon NaM76-5F3, sulfloTag được nhuộm màu) được thêm vào và hiện màu bằng đệm MSD Gold Read (MSD # R92TG-2 và thiết bị đọc MESO QUICKPLEX SQ 120).

Để đánh giá được động học ở chuột BalbcRJ (giống cái 6-9 tuần) được tiêm trong ổ mắt hoặc tiêm dưới da liều duy nhất (5mg/kg) của dạng khảm, kháng thể kháng PD1 được làm tương thích với người (biến thể HKLD) hoặc kháng thể Keytruda. Xác định nồng độ kháng thể trong huyết tương bằng ELISA bằng cách sử dụng kháng thể chuỗi nhẹ kháng người được cố định (clon NaM76-5F3) huyết thanh pha loãng có chứa kháng thể kháng PD-1 được thêm vào. Phát hiện bằng IgG của lừa kháng người được đánh dấu-peroxidaza (Jackson ImmunoResearch; Mỹ; reference 709-035-149) được thêm vào và hiện kết quả bằng phương pháp thông thường.

Thử nghiệm thực bào

Bạch cầu đơn nhân của người từ người tình nguyện khoẻ mạnh được biệt hoá *in vitro* vào đại thực bào M0 bằng M-CSF (100ng/mL) trong môi trường RPMI toàn vẹn trong 5 ngày. Đại thực bào M0 tiếp đó được nuôi cấy trong 2 ngày với IFNg của người (70ng/mL) để tạo ra M1-đại thực bào. Đại thực bào M0/M1 và dòng tế bào Raji tương ứng được nhuộm màu bằng chất nhuộm màu tăng sinh tế bào eFluor450 (Invitrogen) và chất nhuộm màu tăng sinh tế bào eFluor670 (Invitrogen). Bằng cách sử dụng đĩa đáy tròn 96 giếng gắn siêu thấp (ULA), Raji CPDe670+ được ủ trước với kháng thể và Rituximab trong 1 giờ và đại thực bào M0 hoặc đại thực bào M1 CPDe450+ được thêm vào ở tỷ lệ tế bào hiệu ứng:tế bào đích là 2:1. Cả hai tế bào được ủ trong 1 hoặc 2 giờ. Thực hiện phân tích thực bào bằng đếm tế bào dòng chảy và % mức thực bào được tính bằng % tế bào CPDe670+ trong tế bào CPDe450+ tổng cộng (nghĩa là % tế bào dương tính kép (CPDe670+/CPDe450+)).

Phân tích liên kết ex vivo đối với CD3+ PBMC được kích thích của người bằng đo huỳnh quang tế bào dòng chảy

Để đo mức liên kết của kháng PD1 đối với tế bào T ngoại vi của người, kháng thể được ủ trong 30 phút ở 4°C, và rửa trước khi nhuộm màu 30 phút ở 4°C bằng IgG Fc kháng người được đánh dấu PE (Biolegend; Mỹ; reference 409303) + CD3 kháng người được đánh dấu xanh Pacific (BD Biosciences clone SP34-2 # 558124). Phân tích

mẫu trên thiết bị đo huỳnh quang tế bào Cytoflex (Beckman Coulter) với cổng tế bào CD3+ T.

Bài tiết IFNg bởi tế bào T của người

Khả năng của kháng PD-1 được làm tương thích với người để kích thích bài tiết xytokin hiệu ứng IFNg được đánh giá trong phản ứng bạch cầu cùng loài hỗn hợp. Tế bào tua thu được từ bạch cầu đơn nhân được tạo ra từ bạch cầu đơn nhân máu ngoại vi của người được phân lập CD14+ + GM-CSF và IL-4 và được đồng nuôi cấy với tế bào T của người cùng loài được phân lập CD4+ (tỷ lệ 1:10) và các liều dùng khác nhau của biến thể HKLD hoặc đối chứng isotyp trong 5 ngày. Dịch nổi có chứa xytokin IFNg được thu gom và định lượng bằng ELISA (BD Bioscience, reference 555142 và 555190).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng PD-1-của người đơn dòng được làm tương thích với người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: (a) VH bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; và (b) VL bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là chất đối kháng của liên kết của PD-L1 và/hoặc PD-L2 của người với PD-1 của người.
2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó bao gồm: (a) chuỗi nặng bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 31, và (b) chuỗi nhẹ bao gồm hoặc gồm có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 34.
3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người.
4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng IgG1 của người, tùy ý có thay thế hoặc tổ hợp các thay thế được chọn từ nhóm gồm có T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A và K444A, tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm có N297A tùy ý kết hợp với M252Y/S254T/T256E, và L234A/L235A.
5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm miền ổn định chuỗi nhẹ thu được từ miền ổn định chuỗi nhẹ kappa của người và miền ổn định chuỗi nặng thu được từ miền ổn định chuỗi nặng IgG4 của người, tùy ý có thay thế hoặc tổ hợp các thay thế được chọn từ nhóm gồm có S228P; L234A/L235A, S228P

+ M252Y/S254T/T256E và K444A.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, mà liên kết đặc hiệu với PD-1 của người với hằng số ái lực liên kết (KD) đối với PD-1 của người bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-7} M được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

7. Phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

8. Vector bao gồm phân tử axit nucleic được phân lập hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 7.

9. Tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic được phân lập và/hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 7 và/hoặc vector theo điểm 8.

10. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 9 và tùy ý bước phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên.

11. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và/hoặc phân tử axit nucleic được phân lập và/hoặc nhóm các phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 7 và/hoặc vector theo điểm 8 và/hoặc tế bào chủ theo điểm 9 và chất mang dược dụng.

12. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất trị liệu bổ sung, tốt hơn là được chọn trong nhóm gồm có chất alkyl hoá, chất ức chế sinh mạch, kháng thể, cụ thể là kháng thể nhắm đích kháng khối u, chất chống chuyển hoá, chất chống phân bào, chất chống tăng sinh, chất chống virus, chất ức chế aurora kinaza, chất thúc đẩy sự chết theo chương trình (ví dụ, chất ức chế họ Bcl-2), chất hoạt hoá con đường thụ thể gây chết, chất ức chế Bcr-Abl kinaza, kháng thể BiTE (chất tuyển mộ tế bào T lưỡng đặc hiệu), thể liên hợp kháng thể thuốc, chất cải biến đáp ứng sinh học, chất ức chế tyrosin kinaza Bruton (BTK), chất ức chế kinaza phụ thuộc cyclin, chất ức chế chu trình tế bào, chất ức chế xycloxygenaza-2, DVD, chất ức chế thụ thể chất đồng đẳng gen gây ung thư của virus bệnh bạch cầu (ErbB2), chất ức chế yếu tố tăng trưởng, chất ức chế protein sốc nhiệt (HSP)-90, chất ức chế histon deacetylaza (HDAC), liệu

pháp hormon, chất miễn dịch, chất ức chế của chất ức chế protein chết theo chương trình (IAP), kháng sinh xen vào giữa, chất ức chế kinaza, chất ức chế kinesin, chất ức chế Jak2, đích ở động vật có vú của chất ức chế rapamycin, microARN, chất ức chế kinaza được điều tiết bởi tín hiệu ngoại bào được hoạt hoá bởi chất gây phân bào, protein liên kết đa hoá trị, thuốc chống viêm phi steroid (NSAID), chất ức chế poly ADP (adenosin diphosphat)-riboza polymeraza (PARP), chất hoá trị liệu platin, chất ức chế kinaza tương tự polo (Plk), chất ức chế phosphoinositit-3 kinaza (PI3K), chất ức chế proteasom, chất tương tự purin, chất tương tự pyrimidin, chất tương tự tyrosin kinaza thụ thể, retinoit/deltaoit alkaloit thực vật, axit ribonucleic ức chế nhỏ (siRNA), chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế ubiquitin ligaza, chất giảm methyl hoá, chất ức chế điểm kiểm soát, vắcxin peptit và chất tương tự, epitop hoặc neoepitop từ kháng nguyên khối u, cũng như tổ hợp của một hoặc nhiều chất trong số các chất này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> OSE IMMUNOTHERAPEUTICS

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 CỦA NGƯỜI ĐƯỢC LÀM TƯƠNG THÍCH VỚI NGƯỜI,
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> B2911PC

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HC CDR1

<400> 1

His Tyr Ala Met Asn

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HC CDR2

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HC CDR3

<400> 3

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser

1

5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> HC CDR3

<400> 4

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> HC CDR3

<400> 5

Glu Arg Glu Pro Gly Met Glu Ser
1 5

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

<220>
<223> HC CDR3

<400> 6

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp His
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> HC CDR3

<400> 7

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ala
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> HC CDR3

<400> 8

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Tyr
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HC CDR3

<400> 9

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn
1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HC CDR3

<400> 10

Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Glu
1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> LC CDR1

<400> 11

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> LC CDR1

<400> 12

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LC CDR2

<400> 13

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LC CDR3

<400> 14

Phe Gln Gly Thr His Val Pro Asn Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi HC

<400> 15

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

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

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

85

90

95

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> miễn thay đổi HC

<400> 16

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> miễn thay đổi HC

<400> 17

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Glu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> miền thay đổi HC

<400> 18

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

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

<210>	20
<211>	117
<212>	PRT
<213>	nhân tạo

<220>

<223> miễn thay đổi HC

<400> 20

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miễn thay đổi HC

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

50

55

60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 117
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> Miền thay đổi HC

<400> 22

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi LC

<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền thay đổi LC

<400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala
 20 25 30

Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

```

50              55              60

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

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

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100            105            110

<210>  25
<211>  444
<212>  PRT
<213>  nhân tạo

<220>
<223>  HC

<400>  25

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50            55            60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100           105           110

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

```

385                               390                               395                               400

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435                               440

<210> 26
<211> 444
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> HC

<400> 26

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50                               55                               60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100                               105                               110

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

 <210> 28
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> HC

 <400> 28
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

```

385                               390                               395                               400

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435                               440

<210> 29
<211> 444
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> HC

<400> 29

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50                               55                               60

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

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

Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100                               105                               110

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

 <210> 30
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> HC

 <400> 30
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

 <210> 32
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

 <220>
 <223> HC

 <400> 32
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg Glu Pro Gly Met Asp Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

27

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

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

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

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

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

<210> 34
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LC

<400> 34

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ala
 20 25 30

Asn Thr Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> Miền ổn định HC

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 36
 <211> 107
 <212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> Miền ổn định LC

<400> 36

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

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

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

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

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

<210> 37

<211> 30

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HFR1

<400> 37

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

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

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HFR2

<400> 38

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HFR3

<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> HFR4

<400> 40

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> LFR1

<400> 41

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>
<223> LFR2

<400> 42

Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> LFR3

<400> 43

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

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

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

<220>
<223> LFR4

<400> 44

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1				5					10

<210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> nhân tạo

<220>
<223> peptit tín hiệu

<400> 45

Met	Asp	Trp	Leu	Trp	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser
1				5					10					15	

Ile Gln Ala

<210> 46
<211> 19

<212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> peptit tín hiệu

<400> 46

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 47
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> IgG1m-N298A

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 48
<211> 351
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> VH HK

<400> 48
cagatccagc tgggtgcagag cggctctgag ctgaagaagc caggcgcttc tgtgaagggt 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcaca cactatgcta tgaattgggt gagacaggct 120

ccaggacagg gactggagtg gatgggctgg atcaacacca atacaggcga gcctacctac 180
 gctcagggct ttacaggccg ctctgtgttt tctctggata cctccgtgag cacagcctat 240
 ctgcagatct ccagcctgaa ggctgaggac accgccgtgt actattgtgc tagggagagg 300
 gagccaggaa tggataactg gggacagggc accctgggtga cagtgtcttc c 351

<210> 49
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> VL LD

<400> 49
 gacgtggtca tgacacagag cccactgtct ctgcctgtga ccctgggaca gccagcctct 60
 atctcctgca gatccagcca gtctctgggtg cacgctaaca ccaatacata cctggagtggt 120
 tatcagcaga ggccaggaca gtccccaagg ctgctgatct acaaggtgtc caacagattc 180
 agcggagtg cagaccgctt tagcggatct ggatccggaa ccgacttcac cctgaagatc 240
 tccaggggtg aggctgagga tgtgggctg tactattgtt tccagggcac ccatgtgcct 300
 aatacatttg gccagggcac caagctggag atcaag 336

<210> 50
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CH HK

<400> 50
 cagatccagc tgggtgcagag cggctctgag ctgaagaagc caggcgcttc tgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcaca cactatgcta tgaattgggt gagacaggct 120
 ccaggacagg gactggagtg gatgggctgg atcaacacca atacaggcga gcctacctac 180
 gctcagggct ttacaggccg ctctgtgttt tctctggata cctccgtgag cacagcctat 240
 ctgcagatct ccagcctgaa ggctgaggac accgccgtgt actattgtgc tagggagagg 300
 gagccaggaa tggataactg gggacagggc accctgggtga cagtgtcttc cgctagcacc 360
 aagggcccat cgggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 480
 ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 600

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt	660
ccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttctctggggg gaccatcagt cttcctgttc	720
ccccaaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg	780
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag	840
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc	900
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc	960
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc	1020
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc	1080
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc	1200
ttcttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcagggt ggcaggaggg gaatgtcttc	1260
tcattgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg	1320
tctccgggta aatga	1335

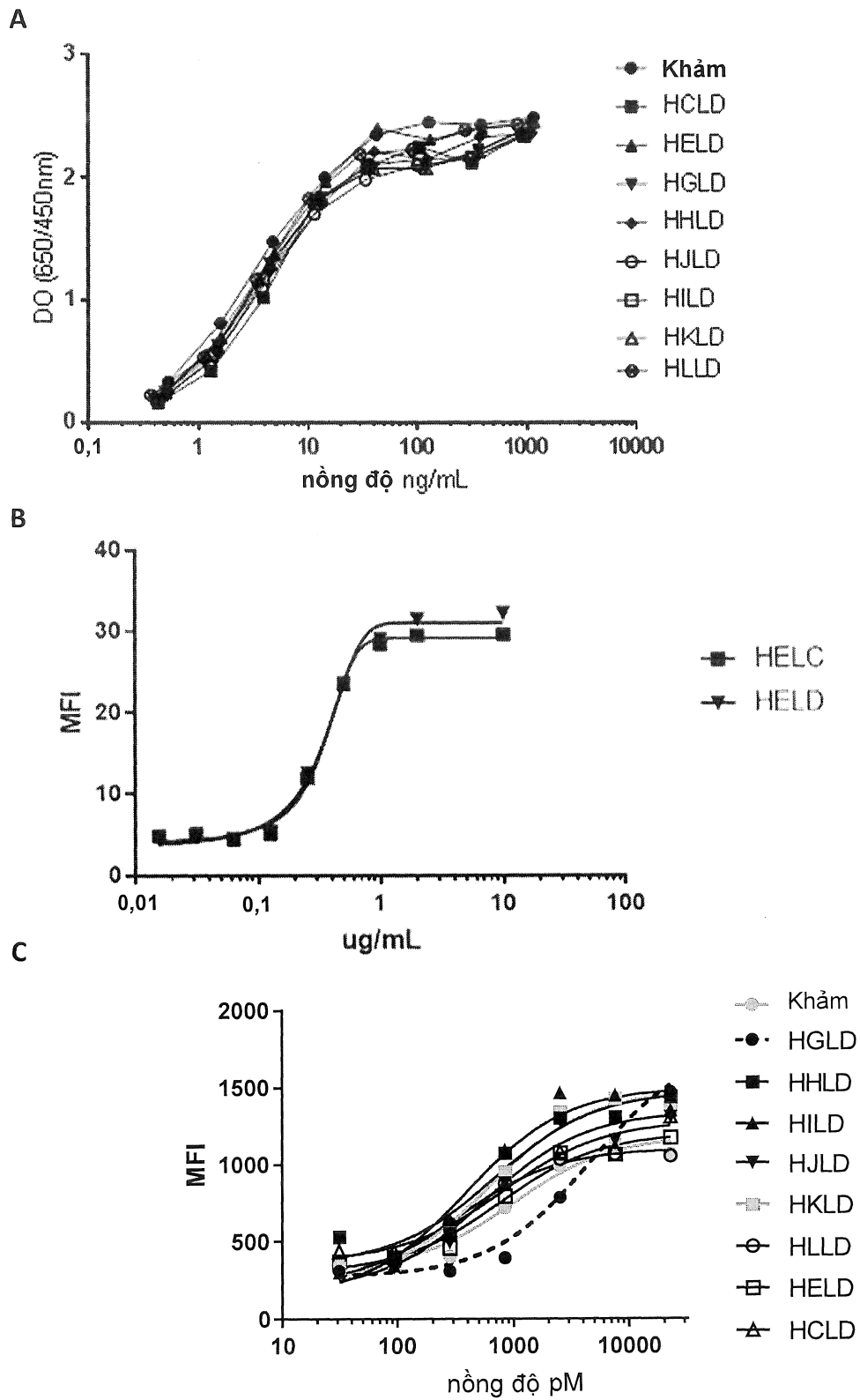
<210> 51
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> CL LD

<400> 51	
gacgtggtca tgacacagag ccactgtct ctgcctgtga ccctgggaca gccagcctct	60
atctcctgca gatccagcca gtctctggtg cacgctaaca ccaatacata cctggagtggt	120
tatcagcaga ggccaggaca gtccccaagg ctgctgatct acaagggtgtc caacagattc	180
agcggagtg cagaccgctt tagcggatct ggatccggaa ccgacttcac cctgaagatc	240
tccaggggtg aggtctagga tgtgggctg tactattgtt tccagggcac ccatgtgcct	300
aatacatttg gccagggcac caagctggag atcaagcgta cgggtggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa	600
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag	660

1/17

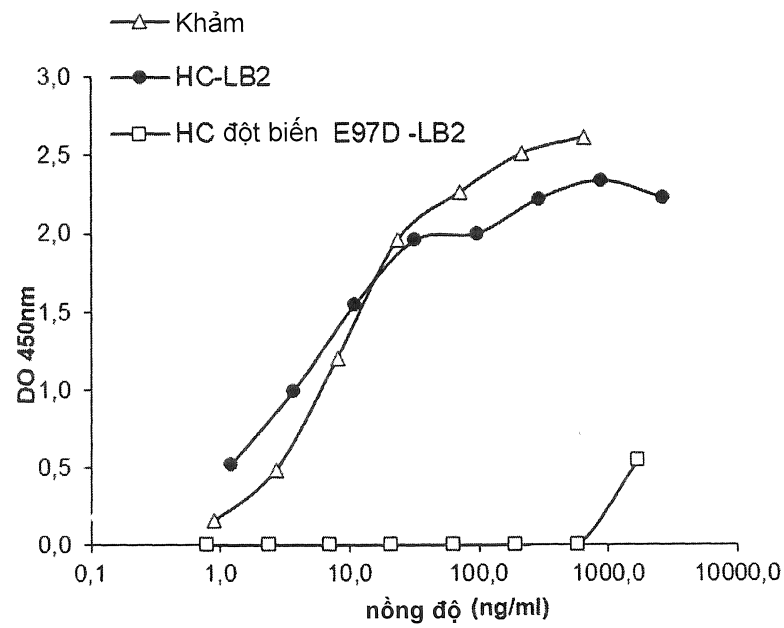
FIG. 1



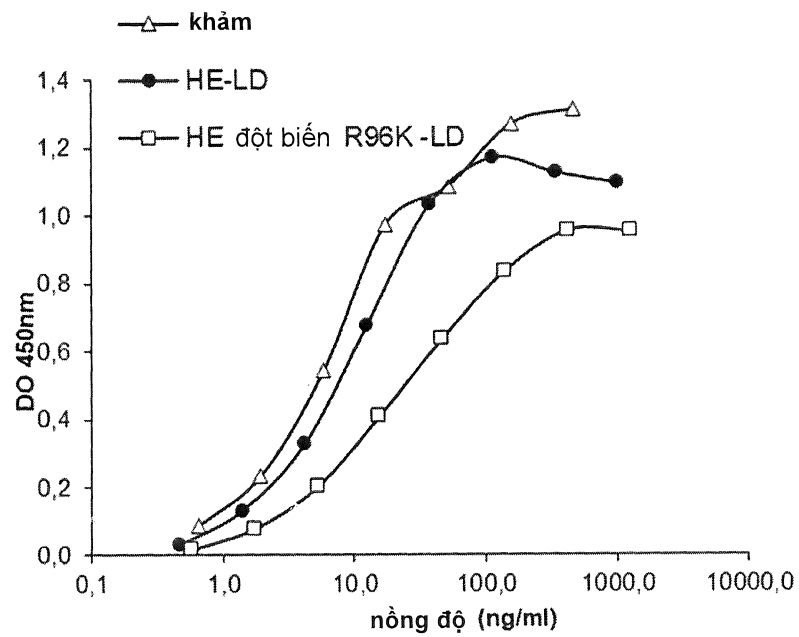
2/17

FIG. 2

A



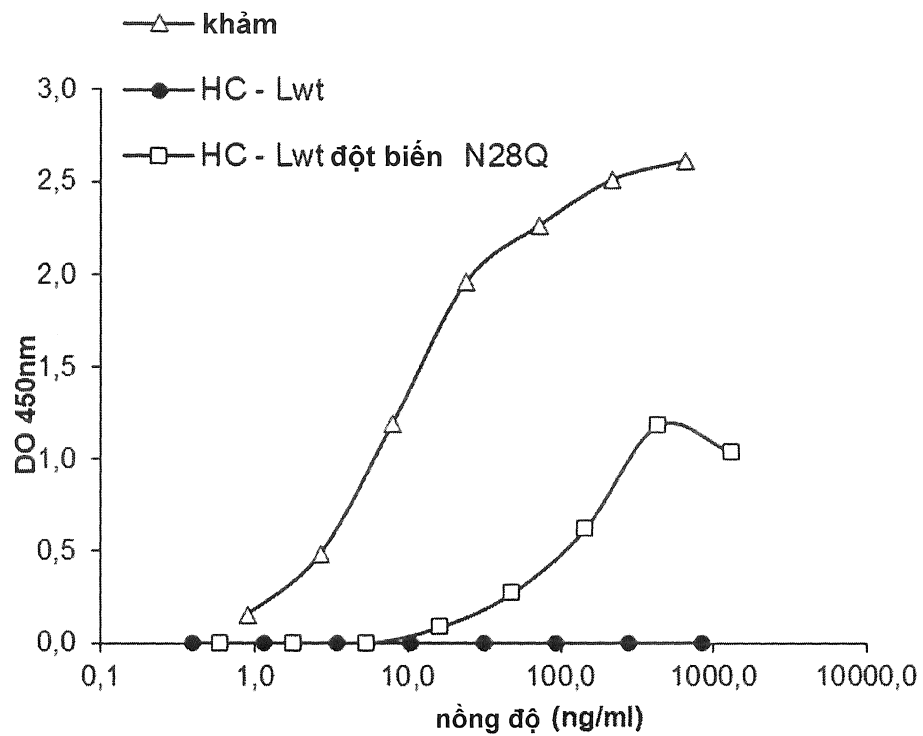
B



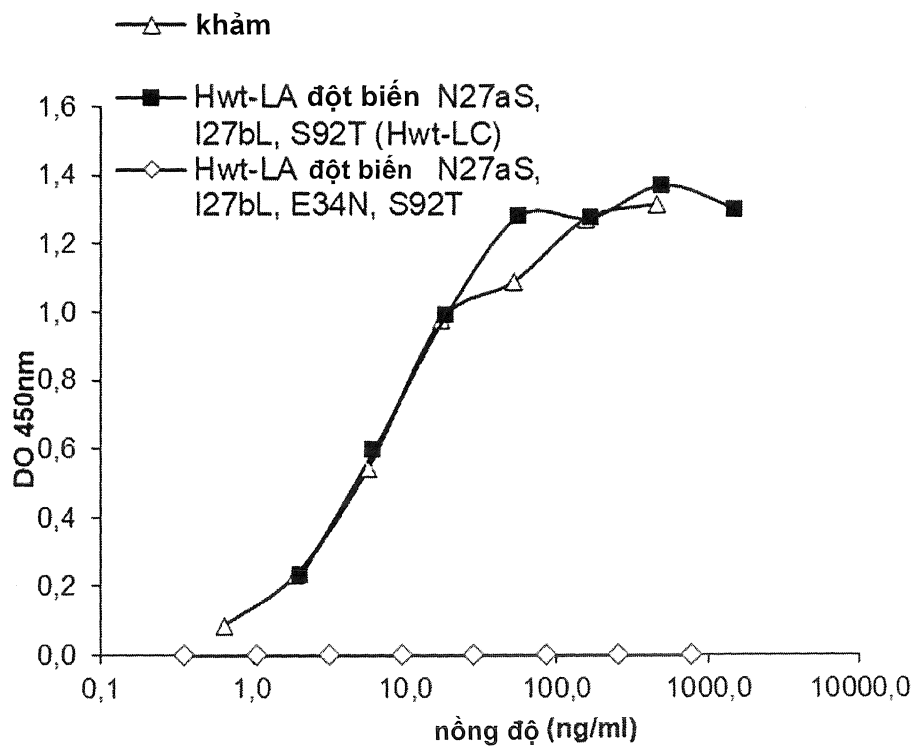
3/17

FIG. 2 - Tiếp

C

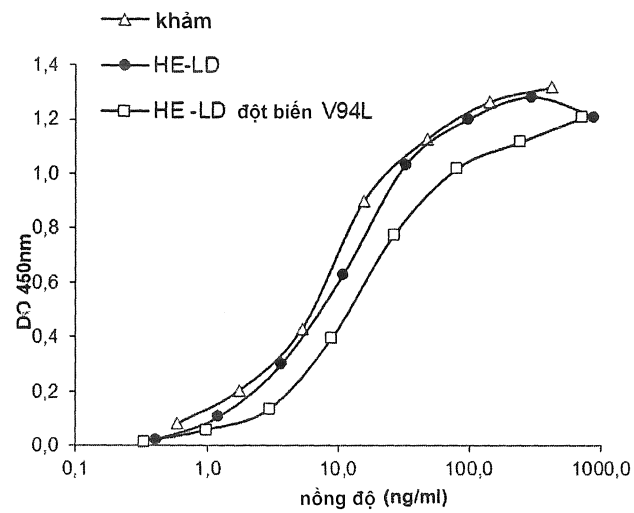


D



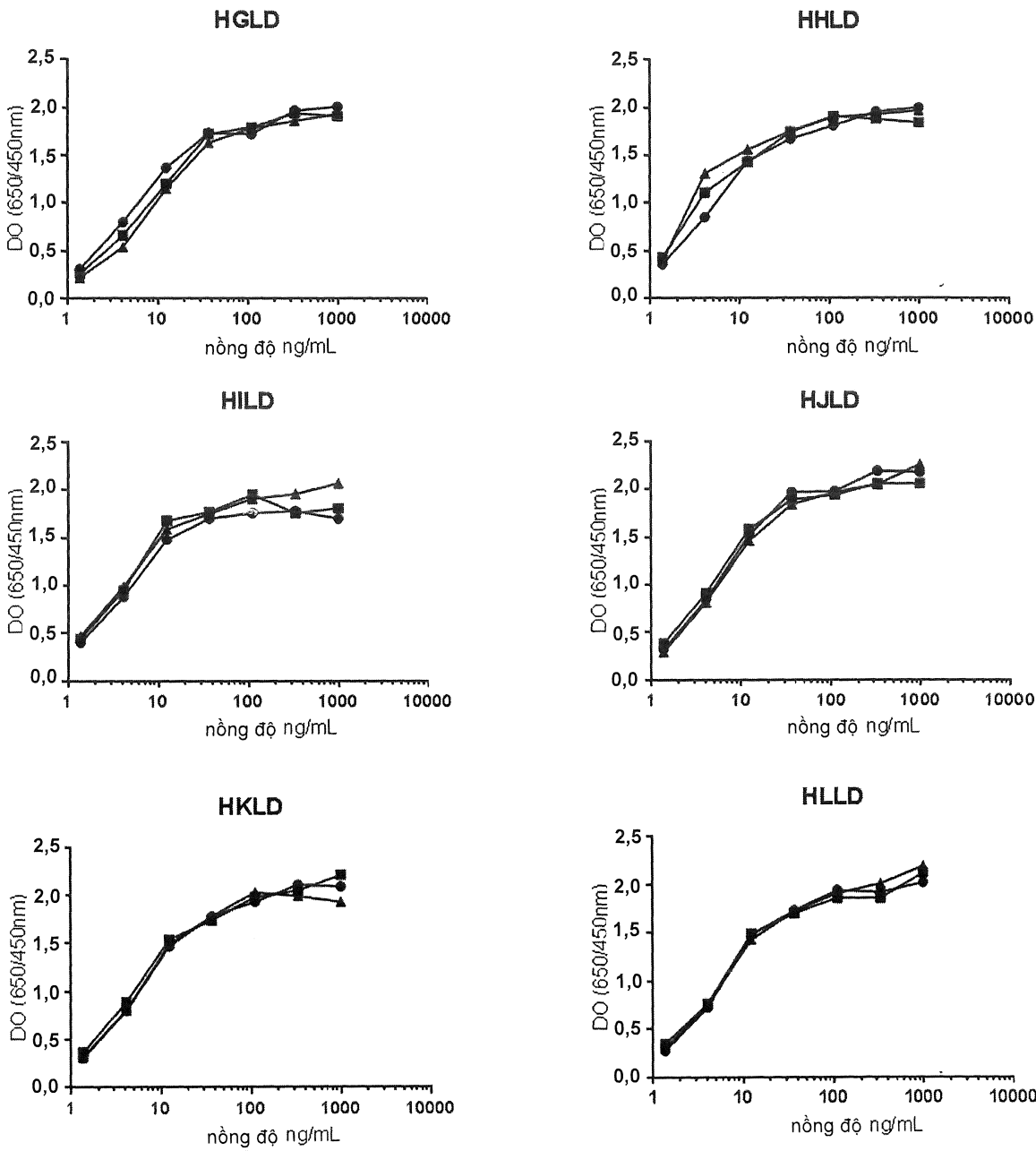
4/17
FIG. 2 - Cuối

E



5/17

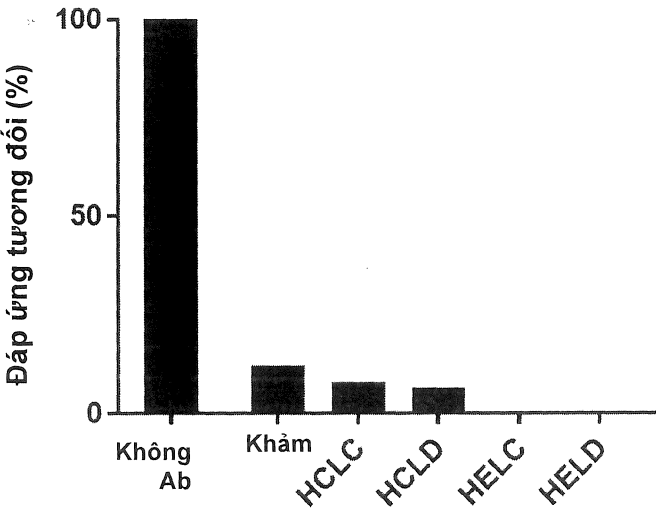
FIG. 3



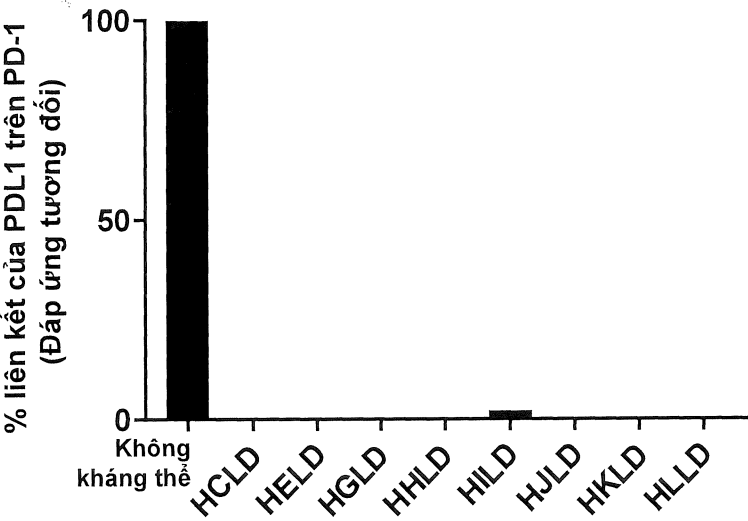
6/17

FIG. 4

A



B



7/17

FIG. 4 - Tiếp

C

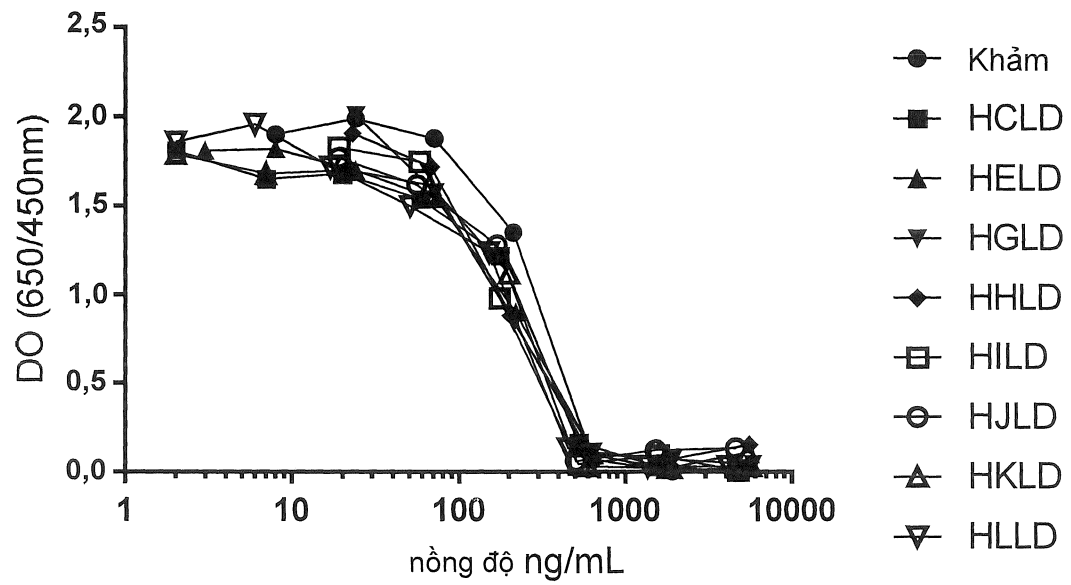
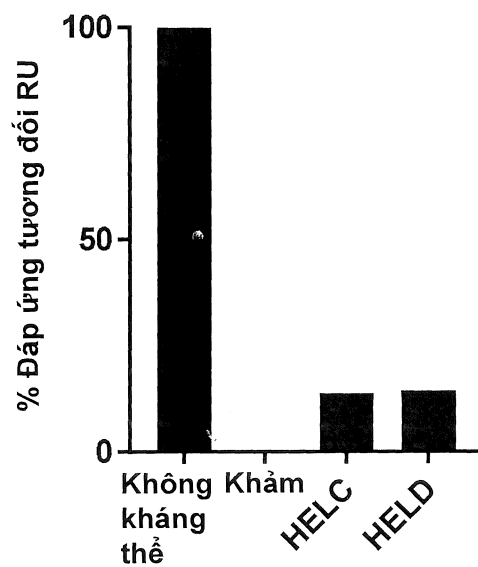


FIG. 5A



8/17

FIG. 5B

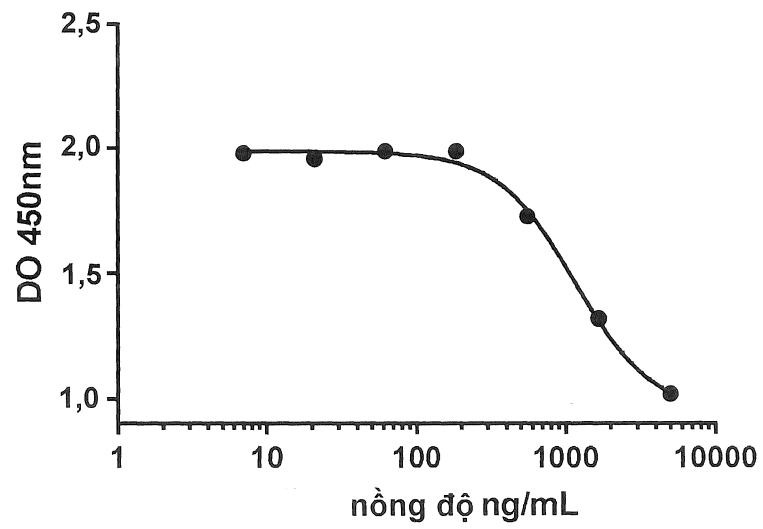
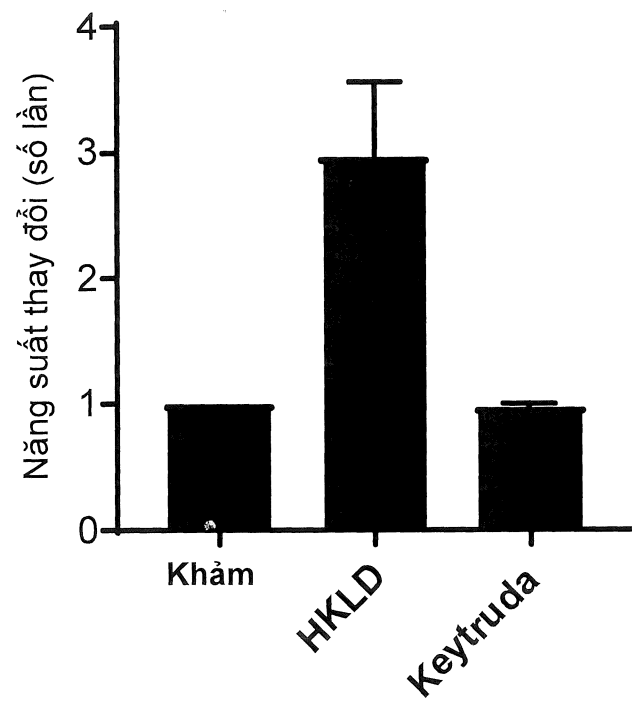


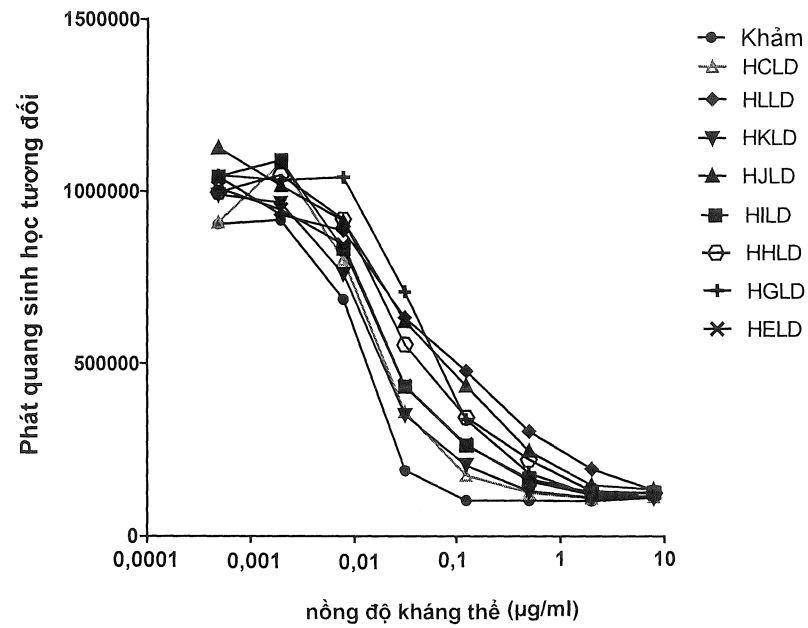
FIG. 6



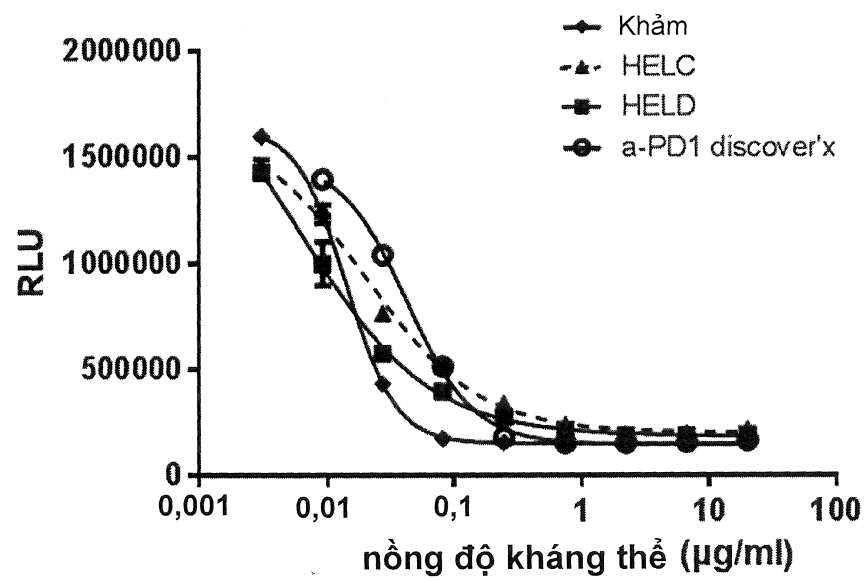
9/17

FIG. 7

A



B



9/17

FIG. 8

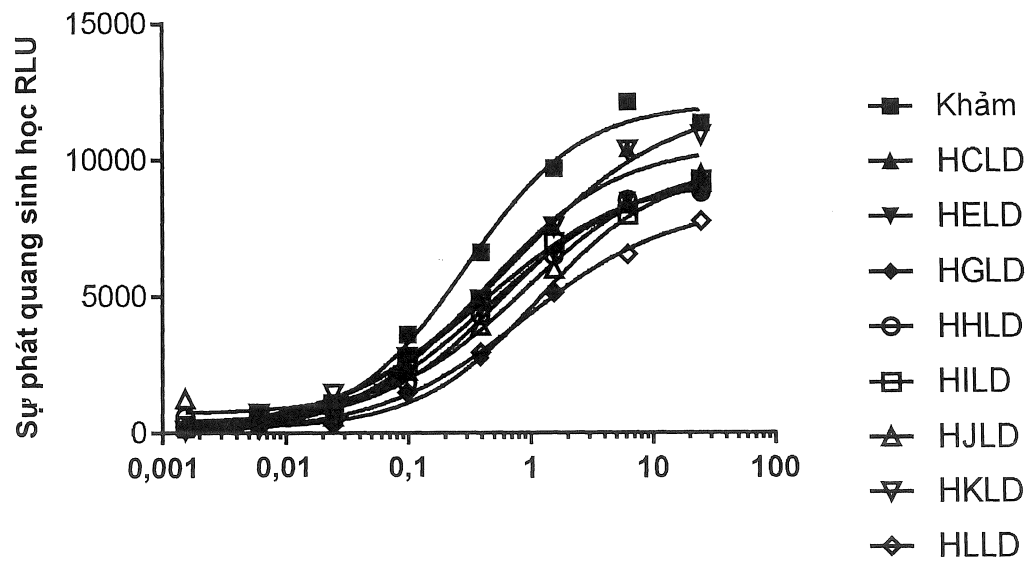
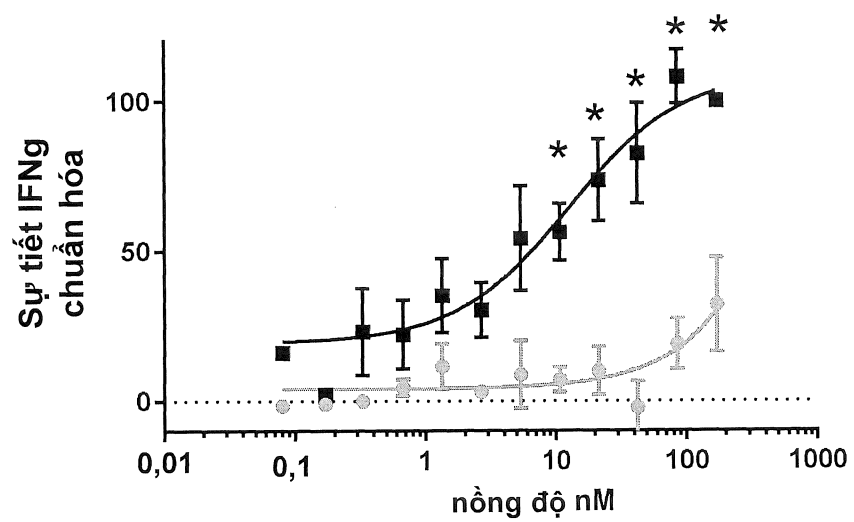


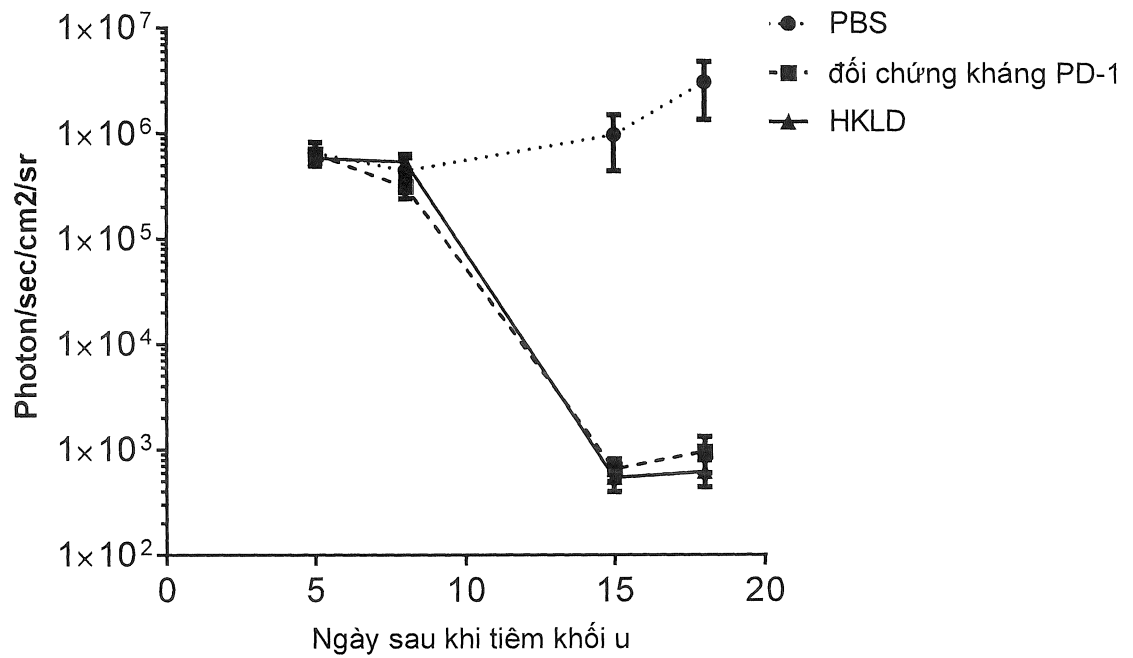
FIG. 9



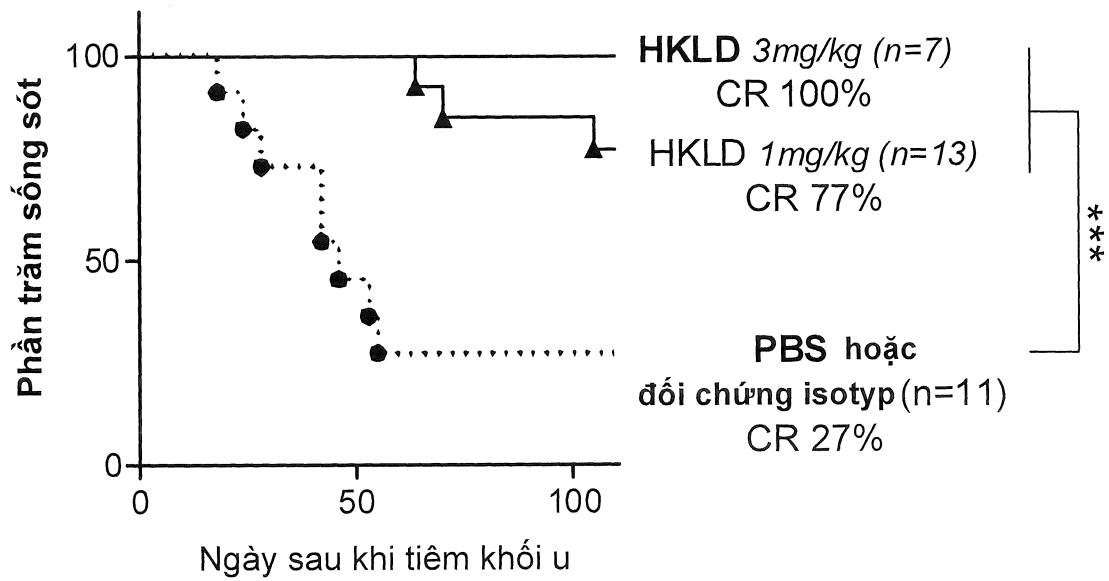
11/17

FIG. 10

A



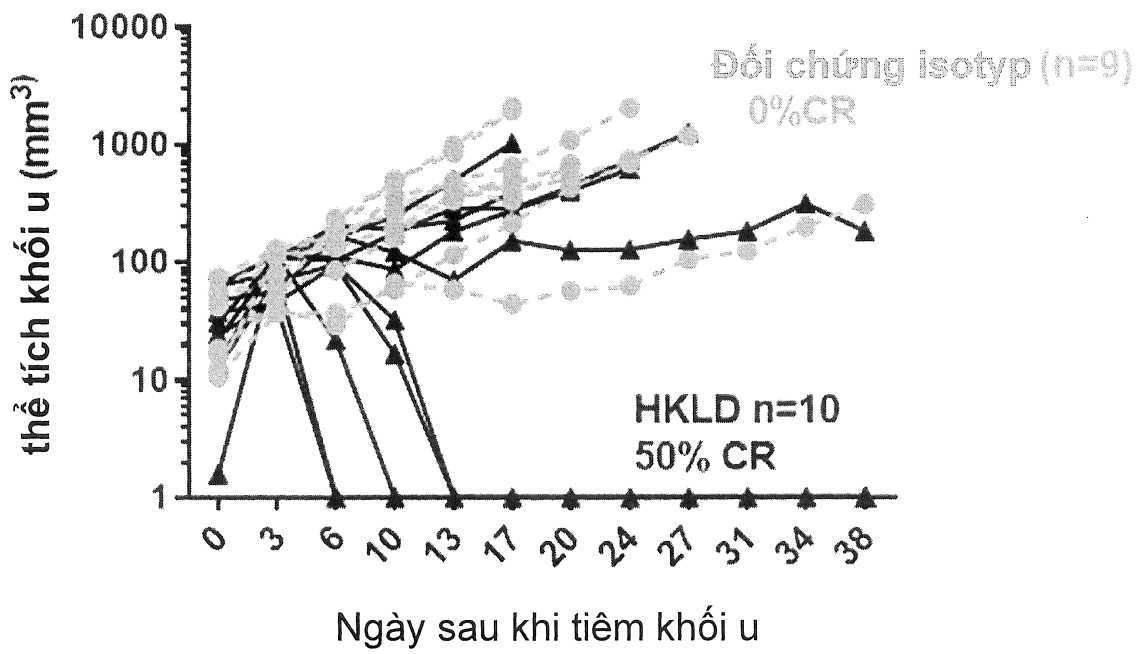
B



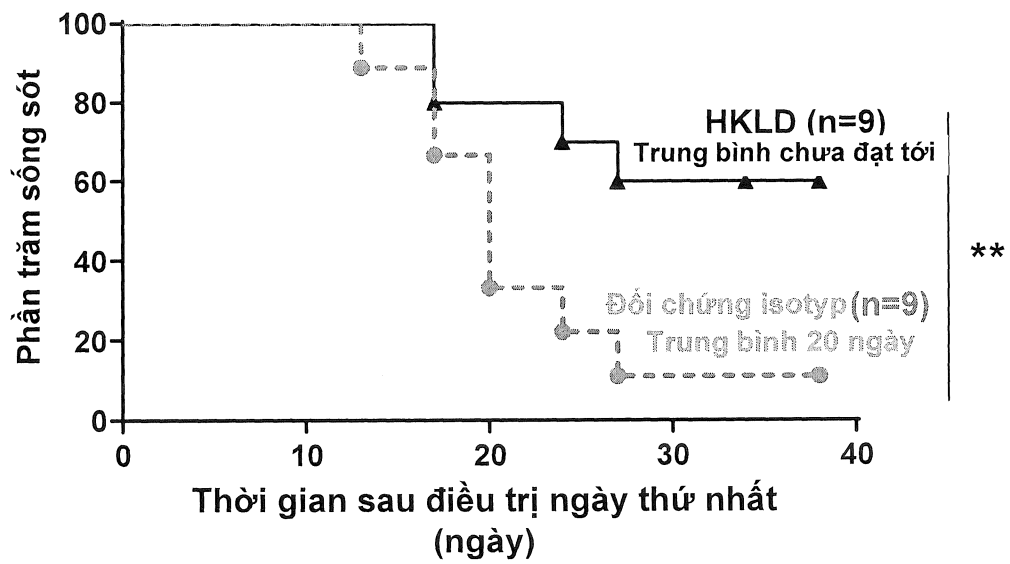
12/17

FIG. 11

A

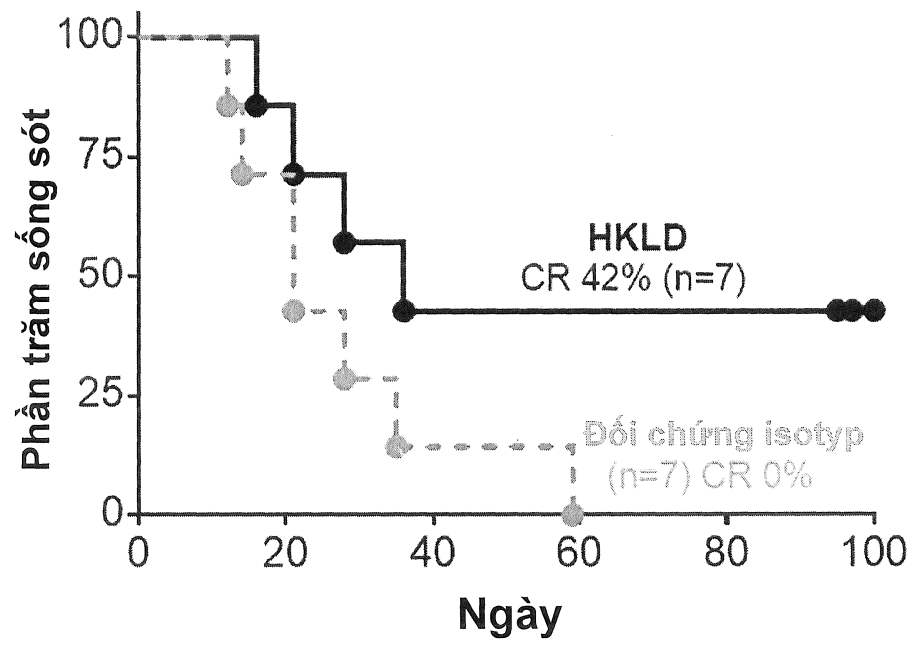


B



13/17

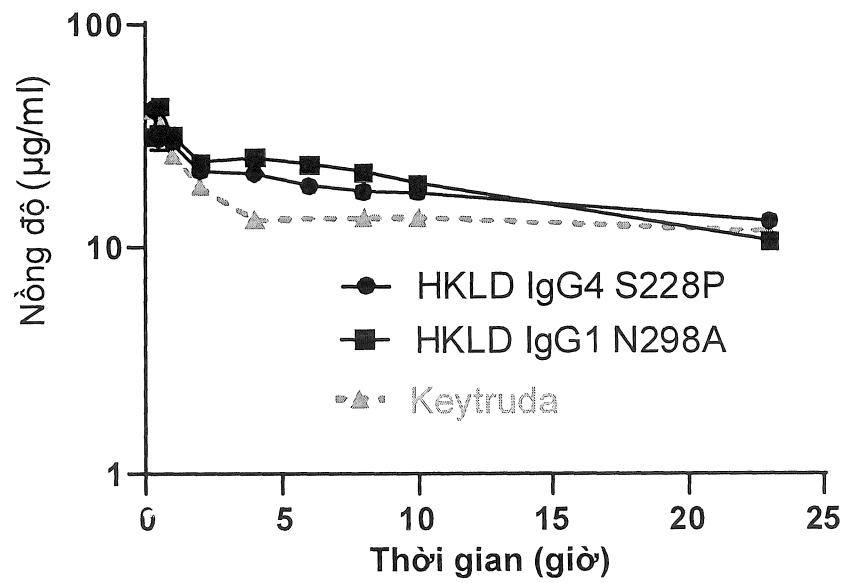
FIG. 12



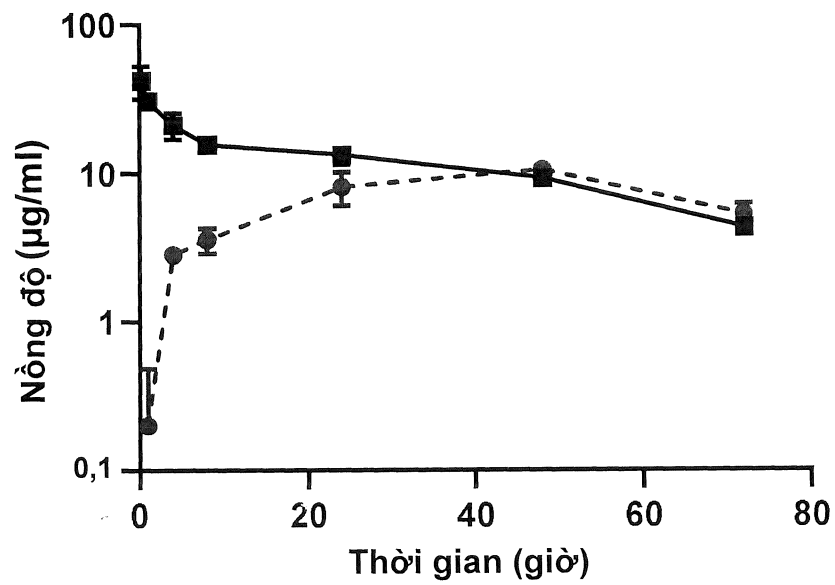
14/17

FIG. 13

A



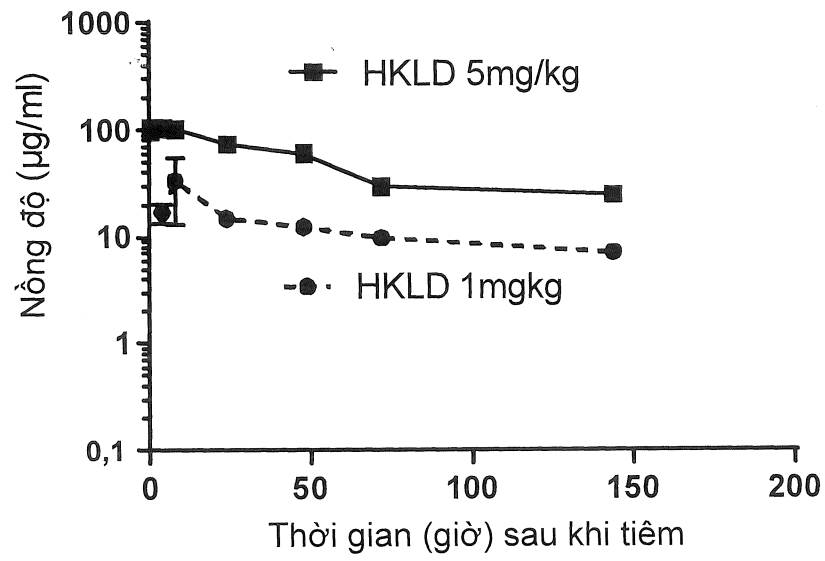
B



15/17

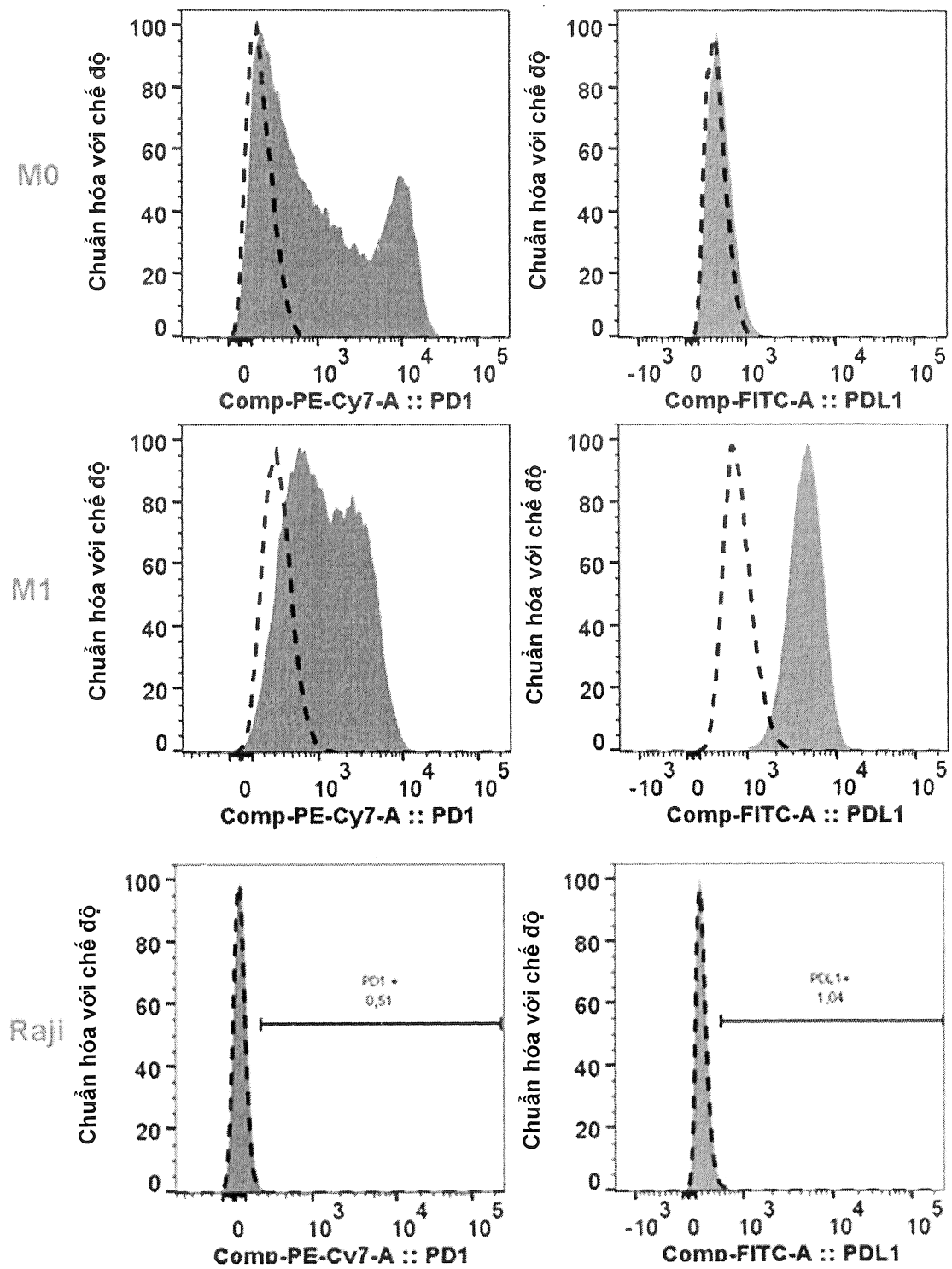
FIG. 13 - Tiếp

C



16/17

FIG. 14A



17/17

FIG. 14B

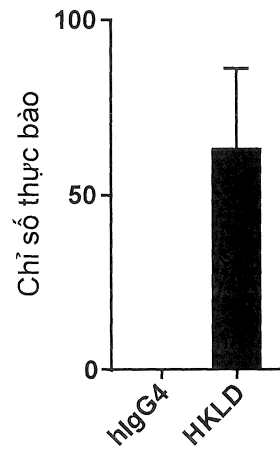


FIG. 14C và D

