



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C07K 16/28; C07K 16/40; C07K 16/30; (13) B
A61P 35/00



1-0052656

-
- (21) 1-2021-05964 (22) 20/03/2020
(86) PCT/US2020/023857 20/03/2020 (87) WO2020/198009 01/10/2020
(30) 62/822,124 22/03/2019 US
(45) 27/10/2025 451 (43) 25/02/2022 407A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road Tarrytown, NY 10591, USA
(72) SKOKOS, Dimitris (US); MURPHY, Andrew, J. (US); YANCOPOULOS, George,
D. (US); HABER, Lauric (FR); LIN, Chia-Yang (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)
-

- (54) PHÂN TỬ LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA NÓ

(21) 1-2021-05964

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể đa đặc hiệu liên kết với EGFR và CD28 (EGFRxCD28) cũng như kháng thể kháng EGFR. Kháng thể này có thể được kết hợp với chất trị liệu khác như kháng thể kháng PD1. Kháng thể EGFRxCD28 theo sáng chế thể hiện phương thức trị liệu miễn dịch hướng đích khối u với sự ức chế PD-1. Các kháng thể đặc hiệu kép này liên kết kháng nguyên đặc hiệu khối u (TSA) (EGFR) với một nhánh và thụ thể đồng kích thích, CD28, trên tế bào T với một nhánh khác. Kết hợp các nhóm kháng thể đặc hiệu kép đồng kích thích CD28 với việc điều trị kháng PD1 có hiệu quả lâm sàng tạo ra liệu pháp kháng thể dung nạp tốt với hiệu quả chống khối u được tăng cường.

Đơn sáng chế liên quan

Sáng chế đề cập đến và hưởng quyền ưu tiên của đơn sáng chế đầu tiên nộp tại Hoa Kỳ số 62/822,124, nộp ngày 22/03/2019. Toàn bộ nội dung của đơn sáng chế trên được đưa vào bản mô tả này bằng cách tham khảo.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể có thể liên kết với thụ thể EGF và CD28 và phương pháp sử dụng chúng, ví dụ, để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư.

Danh mục trình tự

Đơn đăng ký sáng chế này bao gồm Danh sách trình tự đã được nộp bằng theo đường điện tử ở định dạng ASCII và đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ. Bản sao ASCII này, được tạo vào 19/03/2020, có tên là 118003-10620_SL.txt, và có kích thước 63.481 bit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khả năng của tế bào T trong việc nhận biết và tiêu diệt tế bào đích của chúng - chẳng hạn như tế bào bị nhiễm virus hoặc tế bào khối u - phụ thuộc vào một loạt các tương tác phối hợp. Quan trọng nhất trong số này là sự nhận biết và liên kết tế bào đích bằng phức hợp thụ thể tế bào T (TCR) (bao gồm chuỗi CD3 γ , δ , ϵ và ζ kết hợp), và tương tác này được gọi là “tín hiệu 1” để hoạt hóa tế bào T. TCR nhận biết peptit của virus hoặc khối u được trình diện trên rãnh của protein MHC được biểu hiện trên bề mặt của tế bào đích. Bởi vì sự liên kết này thường có ái lực thấp, sự kích hoạt thành công “tín hiệu 1” cần sự tụ hợp của nhiều phức hệ TCR dọc theo mặt phân cách giữa tế bào T và tế bào đích của nó; mặt phân cách này được gọi là “khớp thần kinh miễn dịch”. Sự hoạt hóa tế bào T có thể còn được thúc đẩy hơn nữa bằng các tương tác bổ sung. Ví dụ, tế bào T có phân tử được gọi là CD28 trên bề mặt của chúng, có thể tạo ra “tín hiệu 2” đồng kích thích để tăng sự hoạt hóa thông qua phức hệ TCR. Khi tế bào T nhận biết tế bào đích của nó thông qua phức hệ TCR của nó, và sau đó cũng nhận biết “tín hiệu 2” thông qua CD28 liên kết với (các) phối tử cùng

nguồn gốc trên tế bào đích, thì sự hoạt hóa tế bào T được tăng cường; như với “tín hiệu 1”, “tín hiệu 2” qua trung gian CD28 được cho là xảy ra thông qua sự cùng tụ hợp tại khớp thần kinh miễn dịch.

mAb kháng CD28 chủ vận có thể được áp dụng trong việc mở rộng *ex vivo* bền vững tế bào T được nuôi cấy; tuy nhiên, sử dụng kháng thể kháng CD28 đã không được khuyến khích do một loạt các tác dụng phụ cấp tính và nghiêm trọng trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I, giai đoạn mà mAb kháng CD28 siêu chủ vận đã được thử nghiệm một cách hệ thống (Hünig, Nature Reviews Immunology). 2012;12:317–318). Có thể sử dụng mAb kháng CD28 khu trú hoặc hướng đích với ít nguy cơ tăng khả năng miễn dịch chống khối u hơn. Jung *et al.*, Int J Cancer. 2001 Jan 15;91(2):225-30.

Các họ khác nhau của các yếu tố tăng trưởng và các thụ thể yếu tố tăng trưởng đã được chứng minh là có liên quan đến sự phát triển tự miễn của tế bào ung thư. Trong số này, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) và họ EGF của yếu tố tăng trưởng peptit có vai trò trung tâm trong quá trình sinh bệnh và tiến triển của các loại ung thư biểu mô khác nhau. EGFR thuộc về họ các thụ thể bao gồm ba protein bổ sung, ErbB-2, ErbB-3 và ErbB-4. Các protein này và các yếu tố tăng trưởng của họ EGF tạo thành một hệ thống tích hợp trong đó tín hiệu chạm vào một loại thụ thể riêng lẻ thường được truyền đến các thụ thể khác cùng họ.

Kháng thể đơn dòng (mAb) nhằm mục đích tăng cường hoạt hóa tế bào T đang được phát triển lâm sàng như một phương pháp điều trị chống khối u. Tuy nhiên, phần lớn các phương pháp điều trị hiện nay đều gặp khó khăn trong việc khắc phục tính chất ức chế của môi trường vi mô của khối u, do đó không thể tạo ra hiệu quả hoạt hóa tế bào T đặc hiệu khối u và tiêu diệt tế bào khối u sau đó. Một số mAb phong bế định hướng kháng lại các chất ức chế điểm kiểm soát như CTLA-4 (protein liên kết với tế bào lympho T gây độc tế bào) và tế bào chết theo chương trình 1 (PD-1)/phối tử tế bào chết theo chương trình 1 (PD-L1) đã được phê duyệt lâm sàng cho khối u ác tính, ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư phổi không tế bào nhỏ và ung thư biểu mô tế bào vảy di căn tiến triển ở da. Việc phong bế PD-1 giải phóng sự phá vỡ hoạt hóa tế bào T, nhưng hiệu quả của nó giống như một tác nhân đơn lẻ thường không đủ để loại bỏ khối u và các phản ứng kháng khối u lâu dài.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương thức điều trị miễn dịch sử dụng kháng thể đặc hiệu kép kháng lại tụ hợp của cụm biệt hóa 28 (CD28) và thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFRxCD28 hoặc CD28xEGFR) rằng, khi được kết hợp với kháng thể phong bế PD-1, gây ra miễn dịch kháng khối u lâu dài và thúc đẩy mạnh sự hoạt hóa tế bào T bên trong khối u mà không có tín hiệu tiết cytokin hệ thống, ở cả mô hình ghép cùng loài và ghép ngoại lai khối u của người. Nghiên cứu độc tính ở chuột đủ miễn dịch được nhân hóa về mặt di truyền và ở khi đuôi dài chứng minh rằng các đặc hiệu kép này có một số hoạt tính tác nhân đơn lẻ và không gây độc đối với chính nó hoặc kết hợp với kháng thể kháng PD-1. Nói chung, các dữ liệu này cho thấy rằng việc kết hợp nhóm chất đặc hiệu kép trên cơ sở CD28 này với sự ức chế PD-1 có thể đem lại các giải pháp an toàn, sinh học với hoạt tính chống khối u được tăng cường rõ rệt, đặc hiệu và hợp lực.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép phân lập bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết CD28 của người với K_D nhỏ hơn khoảng $10^{-6}M$ như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở $25^\circ C$; và miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì của người (EGFR) trên tế bào khối u đích, với K_D nhỏ hơn khoảng $10^{-9}M$ như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở $25^\circ C$.

Theo một khía cạnh khác, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép phân lập thể hiện tác dụng đồng kích thích khi được sử dụng cùng với kháng thể đặc hiệu kép kháng Mucin 16 (MUC16) X CD3 và được thử nghiệm trên các tế bào đích biểu hiện EGFR. Theo một phương án, tác dụng đồng kích thích được thể hiện bởi một hoặc nhiều dấu hiệu sau: (a) khả năng hoạt hóa và định hướng tế bào T của người để tiêu diệt tế bào đích biểu hiện EGFR; (b) khả năng điều hòa tăng PD-1 trên tế bào T; (c) khả năng tăng sự giải phóng của cytokin IFN gamma và TNF từ PBMC; (d) khả năng làm suy yếu tế bào khối u; hoặc (f) khả năng tăng cường thanh thải khối u. Theo một phương án khác, tác dụng đồng kích thích còn được thể hiện bởi một hoặc nhiều dấu hiệu sau: (g) hoạt hóa hoạt tính NF κ B ở thử nghiệm báo cáo trên cơ sở tế bào T/APC luciferaza; hoặc (h) đo lượng sản xuất IL-2 cytokin sử dụng thử nghiệm chức năng tế bào T CD4⁺/APC.

Sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết EGFR và CD28 bao gồm: (1) nhánh liên kết EGFR bao gồm: (a) chuỗi globulin miễn dịch bao gồm HCDR của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong thành phần được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 30, 40 và 50, hoặc biến thể của chúng; và/hoặc (b) chuỗi globulin miễn dịch bao gồm LCDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc biến thể của chúng;

và nhánh liên kết CD28; hoặc (2) nhánh liên kết CD28 bao gồm: (c) chuỗi globulin miễn dịch bao gồm HCDR của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong thành phần được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 59 và 63, hoặc biến thể của chúng; và/hoặc (d) chuỗi globulin miễn dịch bao gồm LCDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong thành phần được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16 và 67, hoặc biến thể của chúng; và nhánh liên kết EGFR.

Ví dụ, theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết EGFR và CD28 bao gồm: (1) nhánh liên kết EGFR bao gồm: (a) globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 24, 30, 40 và 50, hoặc biến thể của chúng; và/hoặc (b) globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 và 28, hoặc biến thể của chúng; và nhánh liên kết CD28; hoặc (2) nhánh liên kết CD28 bao gồm: (c) globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, 26, 59 và 63, hoặc biến thể của chúng; và/hoặc (d) globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, 28, và 67, hoặc biến thể của chúng; và nhánh liên kết EGFR.

Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết EGFR và

CD28 bao gồm: (1) nhánh liên kết EGFR bao gồm: (a) globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 30, 40 hoặc 50, và tương đồng trình tự axit amin ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 30, 40 hoặc 50, tương ứng; và/hoặc globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, và tương đồng trình tự axit amin ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, tương ứng; và nhánh liên kết CD28; hoặc (2) nhánh liên kết CD28 bao gồm: (c) globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, 59 hoặc 63, và tương đồng trình tự axit amin ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10, 59 hoặc 63, tương ứng; và/hoặc (d) globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc 67, và tương đồng trình tự axit amin ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc 67, tương ứng; và nhánh liên kết EGFR.

Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết EGFR và CD28 bao gồm:

(1)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GDSIITFY (SEQ ID NO: 4; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IYYSGIT (SEQ ID NO: 6; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: ARVSEDSYFHYGMDV (SEQ ID NO: 8; hoặc biến thể của chúng); và

CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng); CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm:

CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GGSISSYY (SEQ ID NO: 12; hoặc biến

thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IYYSGIT (SEQ ID NO: 6; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 14; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng);

CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng);

(2)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GFTFSTFI (SEQ ID NO: 32; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: ISSNGGTI (SEQ ID NO: 34; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: TRGGDFWSGYYPFDY (SEQ ID NO: 36; hoặc biến thể của chúng); CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng);

CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GGSISSYY (SEQ ID NO: 12; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IYYSGIT (SEQ ID NO: 6; hoặc biến thể của chúng); CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 14; hoặc biến thể của chúng);

và CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng); CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng);

(3)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GFSFRDAW (SEQ ID NO: 42; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IRNKIDGGTT (SEQ ID NO: 44; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: TTDIWNVLFYYYGLDV (SEQ ID NO: 46; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18;

hoặc biến thể của chúng); CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng) và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GGSISSYY (SEQ ID NO: 12; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IYYSGIT (SEQ ID NO: 6; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 14; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng); CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng);

(4)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: DDSIISYY (SEQ ID NO: 52; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IYYSVRT (SEQ ID NO: 54; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: ARVSEDSYYHYGMDV (SEQ ID NO: 56; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng); CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin: GGSISSYY (SEQ ID NO: 12; hoặc biến thể của chúng); CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin: IYYSGIT (SEQ ID NO: 6; hoặc biến thể của chúng); và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 14; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18; hoặc biến thể của chúng); CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin: GAS (SEQ ID NO: 20; hoặc biến thể của chúng); và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22; hoặc biến thể của chúng).

Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết EGFR và CD28 bao gồm:

(1)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng); và nhánh liên kết CD28 bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng);

(2)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng);

(3)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng);

(4)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 (hoặc biến thể của chúng).

Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà

liên kết EGFR và CD28 bao gồm:

(1)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng); và nhánh liên kết CD28 bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng);

(2)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng); và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng);

(3)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng);

và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng);

(4)

nhánh liên kết EGFR bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng);

và

nhánh liên kết CD28 bao gồm: chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (hoặc biến thể của chúng); và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 (hoặc biến thể của chúng).

Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu

(ví dụ, đặc hiệu kép) (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) là REGN7075 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb7075); REGN6321 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6321); REGN6322 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6322); REGN6323 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6323). Kháng thể đặc hiệu kép khác có thể được tổng hợp sử dụng kháng thể EGFR mẹ được mô tả trong bản mô tả này ở bảng 9A, 9B và 9C, theo đó trình tự của nhánh HCVR của kháng thể mẹ EGFR kháng thể có thể được tìm thấy trong WO2014/004427 và trình tự axit amin HCVR của kháng thể CD28 mẹ có thể được tìm thấy trong **Bảng 3** trong bản mô tả này. Nhánh HCVR EGFR bất kỳ có thể được ghép cặp với nhánh HCVR CD28 được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề cập đến protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) liên kết đặc hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì bao gồm: (i) globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, 24, 30, 38, 40, 48, 50 hoặc 58; hoặc biến thể của chúng; và/hoặc (ii) globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của nó bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 hoặc 28; hoặc biến thể của chúng. Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên là đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép).

Sáng chế còn đề cập đến protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu nêu trong bản mô tả này được liên kết với polypeptit EGFR hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, trên bề mặt của tế bào khối u) và polypeptit CD28 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, trên bề mặt của tế bào miễn dịch như tế bào T).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) nêu trong bản mô tả này bao gồm các bước: (a) đưa một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa chuỗi globulin miễn dịch của protein liên kết kháng nguyên đã nêu vào tế bào chủ (ví dụ, tế bào CHO); (b) nuôi cấy tế bào chủ dưới điều kiện thích hợp để biểu hiện polynucleotit; và (c) tùy ý, phân lập protein liên kết kháng nguyên hoặc chuỗi globulin miễn dịch từ tế bào chủ và/hoặc môi trường trong đó tế bào chủ được nuôi. Bất kỳ protein liên kết kháng nguyên hoặc chuỗi globulin miễn dịch nào là sản phẩm của phương pháp này đều là một phần của

sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hóa một hoặc nhiều trong số chuỗi globulin miễn dịch của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) theo sáng chế. Vector chứa polynucleotit theo sáng chế cũng là một phần của sáng chế cũng như tế bào chủ (ví dụ, CHO) bao gồm polynucleotit, vector hoặc protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm hoặc kit bao gồm một hoặc nhiều trong số protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều chất hoặc mục khác, tùy ý, kết hợp với chất trị liệu khác (ví dụ, chất ức chế PD-1, kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chất ức chế PD-L1, kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chất hóa trị chống ung thư bạch kim, paclitaxel, docetaxel, vincristin, cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, kháng thể chống ung thư hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, pembrolizumab, nivolumab, trastuzumab, cetuximab, bevacizumab và/hoặc cemiplimab). Dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế và chất mang hoặc tá dược được dụng và, tùy ý, chất trị liệu khác cũng là một phần của sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến bình và thiết bị tiêm (ví dụ, ống tiêm, ống tiêm được làm đầy trước hoặc ống tiêm tự động) bao gồm protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu, chế phẩm và/hoặc dạng bào chế theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp dùng protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế, chế phẩm hoặc dược phẩm của nó cho đối tượng (ví dụ con người) bao gồm bước tiêm protein liên kết kháng nguyên đã nêu, chế phẩm hoặc dược phẩm vào cơ thể của đối tượng, ví dụ, với ống tiêm, ống tiêm được làm đầy trước hoặc ống tiêm tự động. Tùy ý, chất trị liệu khác (ví dụ, cemiplimab, pembrolizumab hoặc nivolumab) cũng được dùng cho đối tượng.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư biểu hiện EGFR), ở đối tượng (ví dụ, con người) có nhu cầu dùng phương pháp này, bao gồm bước dùng (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ) lượng có hiệu quả của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu hoặc chế phẩm hoặc dược phẩm, tùy ý kết hợp với chất trị liệu khác (ví dụ, cemiplimab, pembrolizumab hoặc nivolumab). Theo phương án của sáng chế, bệnh ung thư biểu

hiện EGFR là bệnh ung thư biểu mô thực quản, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy phổi, bệnh ung thư tuyến phổi, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy cổ, bệnh ung thư tuyến nội mạc tử cung, bệnh ung thư biểu mô niệu mạc bàng quang, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tế bào vảy đầu và cổ, bệnh ung thư não, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày-thực quản, bệnh ung thư tuyến dạ dày-thực quản, bệnh ung thư tuyến tiền liệt hoặc bệnh ung thư buồng trứng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A – 1E cho thấy rằng, trong các dòng tế bào ung thư có TSA nội sinh, kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 (REGN7075) làm tăng khả năng hoạt hóa tế bào T khi có sự kích thích của TCR bởi TSAxCD3 (MUC16xCD3). Ở Fig. 1A và 1B, phân tích đếm tế bào theo dòng chảy cho thấy rằng kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 liên kết với các tế bào CD28 + và EGFR +. (Fig. 1A) tế bào Jurkat (tế bào CD28+). (Fig. 1B) tế bào PEO1 (tế bào EGFR+). Ở Fig. 1C – 1E, tế bào T của người được nuôi cấy với tế bào đích ung thư biểu hiện MUC16 và EGFR nội sinh (dòng tế bào ung thư buồng trứng PEO1) và đặc hiệu kép được nêu trong 96 giờ. (Fig. 1C) tiêu diệt tế bào khối u, % tế bào sống. (Fig. 1D) tần suất của tế bào T CD25⁺ (% của CD2). (Fig. 1E) Chất nổi bề mặt từ thử nghiệm gây độc tế bào được phân tích bằng bộ Cytometric Bead Array (CBA). Sự giải phóng IFN được vẽ biểu đồ dưới dạng pg/ml

Fig. 2A đến 2D cho thấy rằng sự biểu hiện của phối tử CD28 (CD86) trên tế bào khối u kết hợp với điều trị kháng PD1 để tạo ra miễn dịch chống khối u phụ thuộc CD8. Tế bào khối u MC38 được chuyển nạp với phối tử cho CD28, CD86 (MC38 / CD86), hoặc đối chứng vector trống (MC38 / EV). Chuột WT C57BL6 ban đầu được cấy với 1×10^6 tế bào khối u trên mỗi con chuột và được điều trị bằng đối chứng tương đương PD-1 mAb hoặc rIgG2a ở 5mg/kg vào ngày 0, 3, 7, 10 và 14 sau khi cấy ghép khối u. Fig. 2A. Khối lượng khối u trung bình theo thời gian. Thanh sai số là +/- SEM. Ý nghĩa thống kê được xác định với các kiểm tra nhiều so sánh ANOVA hai chiều và Tukey. Fig. 2B. Tỷ lệ sống sót theo thời gian (tỷ lệ phần trăm chuột có khối u < 2000mm³). Ý nghĩa thống kê ở ngày thứ 60 sau khi cấy đã được xác

định bằng kiểm tra Log-rank (Mantel-Cox). Fig. 2C. Chuột được điều trị kháng thể làm suy giảm CD8 (CD8 bị suy giảm) hoặc đối chứng tương đương (không suy giảm). Thể tích khối u trung bình theo thời gian với sự suy giảm CD8 (đường chấm) và không suy giảm (đường liền nét) được thể hiện là $\pm$ SEM. Ý nghĩa thống kê được xác định với các kiểm tra nhiều so sánh ANOVA hai chiều và Tukey. Fig. 2D. Cây khối u thứ cấp (thử thách lại) của chuột không có khối u được cấy MC38/CD86 và được điều trị bằng PD1 mAb. Đối với Fig. 2A đến 2D, dữ liệu được thể hiện từ 1 thí nghiệm với 10 con chuột mỗi nhóm. Dữ liệu đại diện cho ít nhất 4 thí nghiệm riêng biệt. Ý nghĩa thống kê được chỉ ra (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ và **** $p < 0,0001$).

Fig. 3A và 3B thể hiện mô hình khối u ghép ngoại lai của người A431. Dữ liệu tương ứng với Fig. 4 và 5. Fig. 3A cho thấy sự kết hợp tế bào CD45 + của con người trong máu ngoại vi, trước khi điều trị. Fig. 3B thể hiện phân tích A431 FACS. Chỉ thị quan tâm được chỉ định cho mỗi ô.

Fig. 4 và 5 cho thấy EGFRxCD28 (REGN7075) phối hợp với điều trị kháng PD1 (cemiplimab) để tạo ra miễn dịch chống khối u ở chuột VH được ghép với tế bào gan CD34+ của bào thai người. Cụ thể, ở Fig. 4 và 5, tế bào khối u ung thư biểu mô dạng biểu bì A431 (thu được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở $SIRPA^{h/h}$ $TPO^{h/m}$ $Rag2^{-/-}$ $Il2rg^{-/-}$ mà được ghép với tế bào gan thai CD34+. Chuột được phân thành 4 nhóm điều trị được nêu dựa trên người hiến gan bào thai, tần suất hình thành tế bào miễn dịch của con người và giới tính. Chuột được phân thành các nhóm điều trị được chỉ định dựa trên người hiến gan cho bào thai, tần suất hình thành tế bào miễn dịch của người và giới tính. Liều cho kháng PD-1 là 10 mg/kg và EGFRxCD28 hoặc PSMAxCD28, 5 mg/kg. Dữ liệu được thể hiện là thể tích khối u A431 trung bình cho mỗi nhóm điều trị ($mm^3 \pm SEM$) được vẽ dựa vào các ngày sau khi thử nghiệm khối u. So sánh ANOVA hai chiều, so sánh Tukey: ** $P < 0,01$, **** $P < 0,001$. ($n = 10 \sim 12$ con chuột trên nhóm).

Fig. 4 thể hiện cụ thể thể tích khối u A431 trung bình cho mỗi nhóm điều trị ($mm^3 \pm SEM$) (kiểu tương đương, đơn trị liệu chống PD1 (cemiplimab), đơn trị liệu EGFRxCD28 (REGN7075) hoặc EGFRxCD28 (REGN7075) + liệu pháp kết hợp chống PD1) được lập biểu đồ theo các ngày sau khối u trong VH chuột được ghép bằng tế bào CD34 + của người. So sánh ANOVA hai chiều, so sánh Tukey: ** $P < 0,01$,

**** $P < 0,0001$.

Fig. 5 cho thấy thể tích khối u trung bình A431 đối với nhóm chứng ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) (kiểu tương đương, đơn trị liệu chống PD1 (cemiplimab), đơn trị liệu PSMAxCD28 hoặc liệu pháp kết hợp PSMAxCD28 + chống PD1) được lập biểu đồ dựa trên các ngày sau khối u ở chuột VH được ghép với tế bào CD34 + của người. So sánh ANOVA hai chiều, so sánh Tukey: ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

Fig. 6 cho thấy xác nhận của việc thiếu biểu hiện PSMA trên tế bào khối u A431. Dòng tế bào khối u chuột MC38 được thiết kế để biểu hiện PSMA ở người được sử dụng làm đối chứng dương.

Fig. 7A và 7B. Thể tích khối u A431 trung bình cho mỗi nhóm điều trị ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) nhận EGFRxCD28 (REGN7075) được vẽ biểu đồ dựa trên các ngày sau khi thử thách khối u ở chuột NSG hoặc được điều trị phòng ngừa Fig. 7A) hoặc điều trị (Fig. 7B). So sánh ANOVA hai chiều, so sánh Tukey: **** $P < 0,0001$.

Fig. 8. Khối lượng khối u A549 trung bình cho mỗi nhóm điều trị ($\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) (kiểu tương đương hoặc EGFRxCD28 (REGN7075) @ 1 mg / kg hoặc 10 mg/kg) được vẽ biểu đồ dựa trên các ngày sau thử thách khối u ở chuột NSG. So sánh ANOVA hai chiều, so sánh Tukey: * kiểu tương đương so với EGFRxCD28 1 mg/kg ($P < 0,05$), ****: $P < 0,0001$; \$ kiểu tương đương so với EGFRxCD28 10 mg/kg ($P < 0,05$), \$\$\$: $P < 0,001$, \$\$\$\$: $P < 0,0001$; @ EGFRxCD28 1 mg/kg so với 10 mg/kg ($P < 0,05$).

Fig. 9A-9D. EGFRxCD28 (REGN7075) hợp lực với điều trị kháng PD1 (cemiplimab) để tạo ra miễn dịch chống khối u ở chuột VH được ghép với tế bào gan CD34+ của bào thai người. (Fig. 9A) MFI của cụm tế bào T CD8 + khối u được chọn được xác định bằng phân tích CITRUS (xác định cụm, mô tả đặc điểm và hồi quy); (Fig. 9B) Tần suất của các tế bào trong mỗi cụm từ các nhóm điều trị được chỉ định; (Fig. 9C) MFI của các cụm tế bào T CD4 + khối u được chọn được xác định bằng phân tích CITRUS; (Fig. 9D) Tần suất của các tế bào trong mỗi cụm từ các nhóm điều trị được chỉ định. Fig. 9B và 9D chứng minh rằng EGFRxCD28 hợp lực với điều trị kháng PD1 để tạo ra miễn dịch chống khối u ở chuột VH được ghép với tế bào gan CD34 + của bào thai người.

Fig. 10A-10C. EGFRxCD28 (REGN7075) đơn lẻ hoặc kết hợp với liệu pháp kháng PD1 (cemiplimab) không gây ra sự hoạt hóa tế bào T toàn thân so với chất

siêu chủ vận CD28 ở khi đuôi dài. Khi đuôi dài được điều trị bằng một liều kháng thể đặc hiệu sinh học duy nhất với liều lượng chỉ định (mg/kg). Thời gian được chỉ định sau liều (giờ) (Fig. 10A) cytokin trong huyết thanh (IFN γ , IL-2, IL-6, IL-8 và IL-10) (Fig. 10B) số lượng tế bào T trong máu ngoại vi tương đối (Fig. 10C) tế bào T Ki67 + và ICOS + (% CD3). Giá trị thể hiện trung bình $\pm$ SEM. N=3 con vật trên nhóm. Giá trị P được tính bằng ANOVA 2 chiều so với đối chứng tương đương (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ và ****, $p < 0,0001$).

Fig. 11 cho thấy đáp ứng chống khối u phụ thuộc vào liều lượng theo thời gian được trung gian bởi kháng thể kháng EGFR X-CD28 (REGN7075) khi kết hợp với kháng thể PD-1 (REGN2810, được mô tả là H2M7798N hoặc H4H7798N ở US20150203579).

Fig. 12 cho thấy đáp ứng chống khối u phụ thuộc vào liều lượng được trung gian bởi kháng thể kháng EGFR X-CD28 (REGN7075) khi kết hợp với kháng thể PD-1 (REGN2810).

Fig. 13A-13C mô tả sự liên kết của các kháng thể kháng EGFR X kháng CD28 với các tế bào khác nhau, bao gồm cả tế bào T của người và khi đuôi dài và tế bào Jurkat (tế bào tác động CD28 +) (Fig. 13A); nhiều tế bào đích khối u khác bao gồm tế bào u ác tính A375, tế bào tuyến tiền liệt 22RV1, tế bào buồng trứng PEO1, tế bào tuyến tụy CAPAN, tế bào tụy SW1990 và tế bào phổi H292 (Fig. 13B và 13C). Đối chứng tương đương I và II lần lượt là kháng thể liên kết với Mers và EGFRvIII.

Fig. 14A và 14 B cho thấy rằng kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 tăng cường hiệu lực gây độc tế bào của kháng thể đặc hiệu kép chống khối u (TSA) X kháng CD3. Nghiên cứu bao gồm kháng thể kháng EGFR X kháng CD28 được kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép kháng STEAP2 X kháng CD3 (Fig. 14A) hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng PSMA X kháng CD3 (Fig. 14B). Kháng thể kháng STEAP2xkháng CD3 được mô tả trong WO2018/058001A. Kháng thể kháng PSMAxkháng CD3 được mô tả trong WO2017/053856A1.

Fig. 15A, B, C và D cho thấy rằng kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR X chống CD28 tăng cường hiệu lực gây độc tế bào của kháng nguyên đặc hiệu chống khối u (TSA) X kháng thể đặc hiệu kép chống CD3 (kháng MUC16 X kháng CD3) trên các dòng tế bào khác nhau, bao gồm cả tế bào PEO1 (Fig. 15A), tế bào CAPAN2 (Fig. 15B), tế bào SW1990 (Fig. 15C) và tế bào H292 (Fig. 15D).

Mô tả chi tiết sáng chế

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

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

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

Sự ức chế điểm kiểm soát với mAb phong bế PD-1 được biết là giải phóng sự phá vỡ hoạt hóa tế bào T, nhưng hiệu quả của chúng chỉ là một tác nhân đơn lẻ thường không phải lúc nào cũng đủ để loại bỏ khối u và đáp ứng chống khối u lâu dài trong nhiều bệnh ung thư. Một số cách tiếp cận để cải thiện tỷ lệ đáp ứng với sự ức chế PD-1 hiện đang được đánh giá. Thật vậy, việc xác định chỉ thị sinh học để dự đoán khả năng đáp ứng với PD-1 mAb, các liệu pháp kết hợp hướng đích không phải khối u sử dụng ức chế PD-1 cùng với cảm thụ thể kích thích cảm ứng đối kháng để cải thiện hoạt hóa tế bào T, hoặc với hóa trị hoặc xạ trị hiện đang được tiến hành xét nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. Tuy nhiên, thách thức là nhiều trong số các sự kết hợp này thường dựa trên sự sẵn có của các loại thuốc đã có từ trước và cơ sở lý luận sau khi học để kết hợp các liệu pháp, thay vì một cách tiếp cận thực sự dựa trên giả

thuyết, mà trong một số trường hợp đã dẫn đến kết quả tồi tệ hơn cho bệnh nhân. Rõ ràng là sự ức chế điểm kiểm soát và hoạt hóa lại hệ miễn dịch có khả năng thuyên giảm lâu dài ở một số bệnh nhân, do đó, các phương pháp để cải thiện hơn nữa hoặc tăng cường hoạt động của tế bào T để thúc đẩy các phản ứng lâu dài hơn được đảm bảo. Ở đây, để cải thiện hiệu quả chống khối u của PD-1 mAb, khái niệm sử dụng kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 để tăng cường tín hiệu và hoạt hóa tế bào T được đưa ra. Thật vậy, liệu pháp miễn dịch kết hợp mới này đã chứng minh rằng kháng thể đặc hiệu kép đồng kích thích CD28 hợp lực với PD-1 mAb để không chỉ đem lại sự hoạt hóa tế bào T mạnh mẽ mà còn tạo ra các phản ứng chống khối u bền vững mà không gây độc toàn thân. Do đó, liệu pháp kết hợp hướng đích vào khối u này đem lại lợi ích đáng kể so với các phương pháp tiếp cận không hướng đích được mô tả trước đây. Sử dụng kháng thể đặc hiệu kép CD28, không trực tiếp hoạt hóa CD28 trừ khi được tập hợp lại trên bề mặt tế bào khối u, đem lại khả năng chỉ thúc đẩy sự đồng kích thích tại vị trí khối u, tránh độc tính toàn thân của kháng thể hoạt hóa CD28 thông thường, độc tính thường được quan sát thấy với sự kết hợp của CLTA-4 và phong bế PD-1 hoặc kháng thể hóa trị hai chủ vận đồng kích thích khác. Các nghiên cứu về độc tính trên chuột có khả năng miễn dịch được nhân hóa về mặt di truyền, cũng như ở khỉ đuôi dài, cho thấy rằng các chất đặc hiệu kép này không biểu hiện độc tính như các tác nhân đơn lẻ hoặc kết hợp với PD-1 mAb. Đặc tính an toàn cùng với sự tăng cường tương tự về hiệu quả chống khối u của EGFRxCD28 với mAb kháng PD-1 trên các mô hình hợp lực và ghép ngoại lai cho thấy rằng phương thức điều trị này là mạnh mẽ, không giới hạn ở một mô hình khối u cụ thể và có thể có ứng dụng rộng rãi hơn như nhóm kết hợp mới cho liệu pháp miễn dịch.

Để tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T, các phương pháp tiếp cận hướng đích khối u đang được phát triển. Thật vậy, kháng thể đặc hiệu kép dựa trên CD3 đại diện cho nhóm kháng thể mới nổi có thể hoạt hóa hiệu quả sự hoạt hóa tế bào T, bằng cách liên kết tế bào T với tế bào khối u và hoạt hóa TCR/CD3, do đó bắt chước “tín hiệu 1” bình thường. Tuy nhiên, bất chấp hiệu quả lâm sàng đầy hứa hẹn của chúng, kháng thể đặc hiệu kép CD3 có thể liên quan đến hội chứng giải phóng cytokin (CRS) do hoạt hóa tế bào T trực tiếp và thiếu tính đặc hiệu của khối u. Hơn nữa, sự hoạt hóa TCR/CD3 trong trường hợp không có sự đồng kích thích (“tín hiệu 2”) có thể dẫn đến chết tế bào do hoạt hóa hoặc suy nhược

(AICD), có thể hạn chế hoặc làm giảm tác dụng chống khối u tiềm ẩn của các thuốc thử này. Trong sáng chế này, liệu pháp kết hợp mAb đặc hiệu kép EGFRxCD28 và kháng PD-1 lần đầu tiên được chứng minh là gây ra sự hoạt hóa tế bào T đặc hiệu của khối u. Như được trình bày trong bản mô tả này, kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 có hoạt tính hạn chế hoặc không có hoạt tính khi không có “tín hiệu 1” và sự phong bế PD-1 dựa trên phản ứng của tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên nội sinh đối với các peptit của khối u. Do đó, kháng thể đặc hiệu kép CD28 cùng với sự phong bế PD-1 có thể thúc đẩy phản ứng tế bào T phụ thuộc TCR/CD3 nội sinh, thúc đẩy các phản ứng chống khối u lâu dài.

Hoạt tính chống khối u của PD-1 mAb phụ thuộc vào CD28 và sự ức chế PD-1 hoạt hóa tế bào T làm giảm tín hiệu thông qua TCR/CD3 và / hoặc CD28 có thể ảnh hưởng đến sự định vị không gian của các phân tử đó. Dữ liệu ở đây đã chứng minh rằng PD-1 được tích lũy tại synap thần kinh miễn dịch khi PD-L1 được biểu hiện bởi tế bào đích và sự tích tụ của nó có liên quan đến việc giảm CD28 tại khớp thần kinh, cho thấy rằng PD-1 có thể thực hiện ức chế tế bào T, bằng cách ngăn chặn việc khu trú của CD28 ở synap thần kinh. Ngoài ra, người ta thấy rằng sự phong bế PD-1 đã ngăn chặn sự khu trú ở synap thần kinh PD-1 trong khi sự tích tụ CD28 tại synap thần kinh được tăng lên, cho phép các kháng thể đặc hiệu kép của EGFRxCD28 tăng cường rõ rệt khả năng của PD-1 mAb trong việc thúc đẩy hoạt hóa tế bào T. Đây có thể là một trong những cơ chế mà kháng thể ngăn chặn PD-1 thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T. Nhìn chung, việc làm hiển thị sự khu trú PD-1 và CD28 trong synap thần kinh miễn dịch sau tương tác PD-1-PD-L1 và/hoặc ức chế PD-1, giúp chúng ta có thể hiểu rõ hơn về tác dụng của sự phong bế PD-1 đối với sự hoạt hóa tế bào T, cũng như sức mạnh hợp lực giữa EGFRxCD28 và PD-1 mAb ở cấp độ synap thần kinh miễn dịch.

Mặc dù PD-1 mAb là nhóm liệu pháp miễn dịch mới quan trọng, việc tối ưu hóa hơn nữa hoạt động chống khối u chắc chắn sẽ cần thiết trong nhiều trường hợp. Cũng giống như các phương pháp tiếp cận CAR-T đã sử dụng các thụ thể thể khảm hoạt hóa nhân tạo cả “tín hiệu 1” và “tín hiệu 2” để cải thiện hoạt động chống khối u của chúng, hiện nay nó đã cho thấy lợi ích tiềm năng của việc kết hợp sự ức chế PD-1 với kháng thể đặc hiệu kép CD28 (cung cấp “tín hiệu 2”) để tăng cường hoạt động chống khối u. Cách tiếp cận này có một số lợi ích thiết thực so với các liệu

pháp CAR-T ở chỗ nó không yêu cầu chuẩn bị liệu pháp tế bào tổn kém mà phải được tùy chỉnh riêng cho từng bệnh nhân, cũng như không yêu cầu bệnh nhân phải được “tiêu diệt tế bào lympho” trước đó thông qua hóa trị gây độc thường gây ra các tác dụng phụ để họ không thể chấp nhận liệu pháp tế bào. Cách tiếp cận cụ thể này mang lại tiềm năng tăng hiệu quả cũng như tăng tính an toàn thông qua tính đặc hiệu của tác dụng. Nói chung, dữ liệu ở đây gợi ý rằng việc kết hợp thuốc đặc hiệu kép dựa trên CD28 với PD-1 mAb đã được xác nhận lâm sàng, chẳng hạn như cemiplimab, có thể đem lại các giải pháp sinh học, dung nạp tốt với hoạt tính chống khối u được tăng cường rõ rệt và hợp lực.

Định nghĩa

“EGFR” và “mảnh EGFR,” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ protein EGFR của người hoặc mảnh của nó trừ khi được chỉ ra cụ thể là từ loài không phải con người (ví dụ, “EGFR của chuột” “mảnh EGFR của chuột,” “EGFR của khỉ” “mảnh EGFR của khỉ” v.v.). Theo phương án của sáng chế, EGFR của người bao gồm trình tự axit amin nêu trong đăng ký NCBI số NP_005219.2. Theo một phương án, EGFR của người (axit amin L25-A647 có số đăng ký 005228.4) được thể hiện với quyết định kháng nguyên CPGG.myc đầu C quyết định kháng nguyên (E1-L10).GlyGly.myc đuôi (E1-L10).SerGly.6XHis.SSG (SEQ ID NO: 69).

“CD28,” như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ protein CD28 của người đã được biết đến rộng rãi mà được biểu hiện trên tế bào T làm thụ thể đồng kích thích trừ khi được chỉ ra là từ loài không phải con người. Theo phương án của sáng chế, CD28 của người bao gồm trình tự axit amin như nêu trong đăng ký NCBI số NP_006130.1.

Protein liên kết kháng nguyên được phân lập (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó), polypeptit, polynucleotit và vectơ, ít nhất một phần không có các phân tử sinh học khác từ tế bào hoặc mẫu nuôi cấy tế bào mà chúng được tạo ra. Các phân tử sinh học như vậy bao gồm axit nucleic, protein, các kháng thể khác hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên, lipid, cacbohydrat hoặc vật liệu khác như mảnh vụn tế bào và môi trường tăng trưởng. Protein liên kết kháng nguyên phân lập có thể ít nhất một phần không có thành phần hệ biểu hiện như phân tử sinh học từ tế bào chủ hoặc môi trường tăng trưởng của nó. Nói chung, thuật ngữ “phân lập”

không có mục đích dùng để chỉ sự vắng mặt cạnh tranh của các phân tử sinh học này hoặc sự vắng mặt của nước, đệm, hoặc muối hoặc các thành phần của dược phẩm mà chứa protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên).

Các tài liệu tham khảo sau đề cập đến các thuật toán BLAST thường được dùng để phân tích trình tự. THUẬT TOÁN BLAST: Altschul *et al.* (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S. F., *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T. L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S. F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J. C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J. M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; HỆ THỐNG CHẤM ĐIỂM SẮP HÀNG Dayhoff, M. O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Schwartz, R. M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3." M. O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.; Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D. J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S. F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; PHÂN TÍCH SỰ SẮP HÀNG: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; and Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, N.Y.

Sáng chế bao gồm polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; 8; 10; 12; 14; 24; 34; 36; 38; 44; 46; 48; 54; 56 và/hoặc 58.

"Kháng thể" là phân tử globulin miễn dịch bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (HC) và hai chuỗi nhẹ (LC) được liên kết bên trong bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng (HC) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt trong bản mô tả này là HCVR hoặc V_H) và vùng hằng định chuỗi nặng (ví dụ, IgG, IgG1 hoặc IgG4). Vùng hằng định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, C_{H1}, C_{H2} và

C_H3 . Mỗi chuỗi nhẹ (LC) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt trong bản mô tả này là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (ví dụ, lamda hoặc kappa). Vùng hằng định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền (C_{L1}). Vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định hỗ trợ (CDR), nằm xen kẽ với các vùng bảo thủ hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Chuỗi nặng CDR có thể được đề cập là HCDR và chuỗi nhẹ CDR có thể được đề cập là LCDR. Theo các phương án khác của sáng chế, FR của kháng thể (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với trình tự dòng mầm ở người, hoặc có thể được biến đổi tự nhiên hoặc nhân tạo.

Nhánh liên kết kháng nguyên của IgG hình chữ Y (ví dụ, CD28 hoặc nhánh liên kết EGFR) dùng để chỉ phần cấu trúc của kháng thể mà đem lại tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên. Ví dụ, nhánh liên kết kháng nguyên của kháng thể IgG có chuỗi nặng (HC) kết hợp với chuỗi nhẹ (LC).

Kháng thể mà, ví dụ, là đặc hiệu kép bao gồm nhánh mà liên kết với kháng nguyên thứ nhất và nhánh khác mà liên kết với kháng nguyên thứ hai. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 bao gồm một nhánh liên kết EGFR và nhánh khác liên kết với CD28.

Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) có thể có nhánh tác động mà liên kết với kháng nguyên thứ nhất và nhánh hướng đích mà liên kết với kháng nguyên thứ hai. Nhánh tác động có thể là miền liên kết kháng nguyên thứ nhất (ví dụ, kháng thể kháng CD28) mà liên kết với kháng nguyên trên bề mặt tế bào tác động (ví dụ, tế bào T). Nhánh hướng đích có thể là miền liên kết kháng nguyên thứ hai (ví dụ, kháng thể kháng EGFR) mà liên kết với kháng nguyên trên tế bào đích (ví dụ, tế bào khối u). Theo các phương án ví dụ nhất định, nhánh tác động liên kết với CD28 và nhánh hướng đích liên kết với EGFR.

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp được, hoặc được thiết kế di truyền mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hệ. Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể liên

kết với nhiều kháng nguyên (ví dụ, hai kháng nguyên khác nhau nếu mảnh là đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra, ví dụ, từ phân tử kháng thể hoàn chỉnh bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như thủy phân protein hoặc kỹ thuật biến đổi gen tái tổ hợp bao gồm kỹ thuật thao tác trên gen và biểu hiện ADN mã hóa vùng biến đổi và vùng hằng định tùy ý của kháng thể. Ví dụ về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); và (vi) mảnh dAb.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ, theo phương án của sáng chế, bao gồm ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước bất kỳ hoặc có cấu tạo từ axit amin và sẽ thường chứa ít nhất một CDR, mà liền kề hoặc nằm trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh liên kết kháng nguyên có vùng V_H liên kết với vùng V_L , các vùng V_H và V_L có thể được sắp xếp theo thứ tự thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L monome.

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền hằng định. Ví dụ về cấu hình của miền hằng định và miền biến đổi mà có thể được tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) V_H - CH_1 ; (ii) V_H - CH_2 ; (iii) V_H - CH_3 ; (iv) V_H - CH_1 - CH_2 ; (v) V_H - CH_1 - CH_2 - CH_3 ; (vi) V_H - CH_2 - CH_3 ; (vii) V_H - CL ; (viii) V_L - CH_1 ; (ix) V_L - CH_2 ; (x) V_L - CH_3 ; (xi) V_L - CH_1 - CH_2 ; (xii) V_L - CH_1 - CH_2 - CH_3 ; (xiii) V_L - CH_2 - CH_3 ; và (xiv) V_L - CL . Trong bất kỳ cấu tạo của miền biến đổi và miền hằng định, bao gồm cấu hình ví dụ bất kỳ được liệt kê trên đây, miền biến đổi và miền hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bởi toàn bộ hoặc một phần vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định liền kề trong một phân tử polypeptit. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa đồng dime hoặc dị dime (hoặc multime khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình của vùng hằng định và vùng biến đổi được liệt kê trên đây liên kết không cộng hóa trị với một vùng

khác và/hoặc với một hoặc nhiều vùng V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Thuật ngữ protein liên kết kháng nguyên “tái tổ hợp” đề cập đến kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được tạo ra, được biểu hiện, được phân lập hoặc được thu hồi bằng các kỹ thuật hoặc các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật công nghệ ADN tái tổ hợp bao gồm, ví dụ, sự biểu hiện gen chuyển và cắt nối ADN. Thuật ngữ này bao gồm kháng thể biểu hiện trong động vật có vú không phải con người (bao gồm các động vật chuyển gen không phải con người, ví dụ, chuột chuyển gen), hoặc tế bào vật chủ (ví dụ, tế bào buồng trứng của chuột lang Trung Quốc (CHO) hoặc hệ biểu hiện tế bào hoặc được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp tái tổ hợp. Sáng chế bao gồm protein tái tổ hợp liên kết kháng nguyên như nêu trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “liên kết một cách đặc hiệu” dùng để chỉ các protein liên kết kháng nguyên này (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có ái lực liên kết với kháng nguyên, như EGFR hoặc CD28 protein, được biểu thị bằng K_D , nhỏ hơn khoảng 10^{-6} M (ví dụ, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M hoặc 10^{-12} M), như được xác định bởi thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn, ví dụ, ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, cảm biến sinh học Octet® HTX, hoặc bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, hoặc bằng ELISA dung dịch-ái lực. “Kháng EGFR” dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên (hoặc phân tử khác như nhánh liên kết kháng nguyên), ví dụ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với EGFR và “kháng CD28” dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên (hoặc phân tử khác như nhánh liên kết kháng nguyên), ví dụ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với CD28. “EGFRxCD28” dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên (hoặc phân tử khác), ví dụ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với EGFR và với CD28 (và, tùy ý, với một hoặc nhiều kháng nguyên khác).

Sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên EGFR và CD28 giống nhau như protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế (ví dụ REGN7075 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb7075) ; REGN6321 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6321); REGN6322 (còn được đề cập trong

bản mô tả này là bsAb6322); REGN6323 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6323). Protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR X kháng CD28 khác có thể tìm thấy ở bảng 9A, 9B và 9C. Trình tự axit amin của nhánh EGFR HCVR của kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này có thể được tìm thấy trong Bảng 1, trong khi trình tự axit amin của nhánh CD28 HCVR của kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này có thể được tìm thấy trong Bảng 3. Kháng thể mẹ EGFR khác để sử dụng trong sáng chế được mô tả trong WO2014/004427. Trình tự axit amin cho nhánh EGFR HCVR và nhánh CD28 HCVR của REGN7075, REGN6321, REGN6322 và REGN6323 được tìm thấy ở Bảng 6. Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chung được mô tả trong sáng chế cũng được tìm thấy ở Bảng 6.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” dùng để chỉ vùng xác định kháng nguyên (ví dụ, trên EGFR hoặc CD28) mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, vùng biến đổi của phân tử kháng thể, được biết đến là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, kháng thể khác có thể liên kết với các vùng khác trên kháng nguyên và có thể tạo ra tác dụng sinh học khác. Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” có thể dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà ở đó tế bào B và/hoặc T phản ứng và/hoặc vùng kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể. Quyết định kháng nguyên có thể được xác định dựa theo cấu trúc hoặc chức năng. Quyết định kháng nguyên chức năng thường là nhóm nhỏ các quyết định kháng nguyên chức năng và chứa các gốc làm tăng ái lực tương tác một cách trực tiếp. Quyết định kháng nguyên cũng có thể có cấu trúc mạch thẳng hoặc cấu trúc bậc ba, cấu tạo từ các axit amin mạch không thẳng. Theo một số phương án, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các nhóm phân tử bề mặt hoạt động hóa học như axit amin, chuỗi bên đường, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl, và theo một số phương án, có thể có các đặc tính cấu trúc không gian ba chiều, và/hoặc các đặc tính điện tích cụ thể.

Phương pháp xác định quyết định kháng nguyên của protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh hoặc polypeptit, bao gồm phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm peptit (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), phân tích cắt peptit, nghiên cứu tinh thể và phân tích NMR. Ngoài ra, các phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, chiết quyết định kháng nguyên và sửa đổi đặc tính hóa học của kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496).

Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh hoặc polypeptit) tương tác là phương pháp trao đổi hydro/deuteri được phát hiện bằng khối phổ. Ví dụ, xem Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh liên kết với CD28 và EGFR với protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ, (ví dụ REGN7075 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb7075); REGN6321 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6321); REGN6322 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6322); REGN6323 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6323), cũng như protein được mô tả ở bảng 9A, 9B và 9C. Thuật ngữ “cạnh tranh” như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết với kháng nguyên và ức chế hoặc phong bế liên kết của protein liên kết kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) với kháng nguyên. Trừ khi được chỉ ra là khác, thuật ngữ này còn bao gồm sự cạnh tranh giữa hai protein liên kết kháng nguyên ví dụ, kháng thể, theo cả hai hướng, tức là, kháng thể thứ nhất mà liên kết kháng nguyên và phong bế liên kết bằng kháng thể thứ hai và ngược lại. Do đó, theo phương án của sáng chế, sự cạnh tranh xảy ra ở một hướng như vậy. Theo các phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên thứ nhất (ví dụ, kháng thể) và protein liên kết kháng nguyên thứ hai (ví dụ, kháng thể) có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên giống nhau. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai (ví dụ, kháng thể) có thể liên kết với quyết định kháng nguyên khác, tuy nhiên, ví dụ, gồi lên nhau hoặc không gồi lên nhau, trong đó sự liên kết của một ức chế hoặc phong bế sự liên kết của kháng thể thứ hai, ví dụ, thông qua cản trở lập thể. Sự cạnh tranh giữa các protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể) có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn, thời gian thực. Ngoài ra, sự cạnh tranh giữa các protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể đơn dòng (mAb)) có thể được xác định sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn, thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.).

Thông thường, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế

được biến đổi theo một số cách giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với EGFR và CD28, ví dụ, giữ lại ít nhất 10% hoạt tính liên kết EGFR và CD28 (khi so sánh với kháng thể mẹ) khi hoạt tính này được biểu thị trên cơ sở mol. Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế giữ lại ít nhất 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 100% hoặc nhiều hơn ái lực liên kết EGFR và CD28 so với kháng thể mẹ. Sáng chế cũng dự tính rằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể bao gồm sự thay thế axit amin bảo thủ hoặc không bảo thủ (còn được đề cập là "biến thể bảo thủ" hoặc "biến thể bảo toàn chức năng" của kháng thể) mà không thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của nó.

"Biến thể" của polypeptit, như chuỗi globulin miễn dịch (ví dụ, REGN7075 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb7075); REGN6321 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6321); REGN6322 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6322); REGN6323 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6323) V_H , V_L , HC hoặc LC hoặc CDR của nó bao gồm trình tự axit amin nêu cụ thể trong bản mô tả này), dùng để chỉ polypeptit bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất khoảng 70-99,9% (ví dụ, ít nhất 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 hoặc 99,9%) tương đồng hoặc tương tự với trình tự axit amin tham chiếu được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, bất kỳ trong số SEQ ID NO: 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22; 24; 26; 28; 30; 32; 34; 36; 38; 40; 42; 44; 46; 48; 50; 52; 54; 56; hoặc 58-67); khi sự so sánh được thực hiện bởi thuật toán BLAST trong đó các thông số của thuật toán được lựa chọn để đưa ra ghép cặp lớn nhất giữa các trình tự tương ứng trên toàn bộ chiều dài của trình tự tham chiếu tương ứng (ví dụ, ngưỡng mong đợi: 10; kích thước từ: 3; ghép cặp tối đa trong khoảng truy vấn: 0; ma trận BLOSUM 62; chi phí chênh lệch: tồn tại 11, mở rộng 1; điều chỉnh ma trận điểm thành phần có điều kiện).

Ngoài ra, biến thể của polypeptit có thể bao gồm polypeptit như chuỗi globulin miễn dịch (ví dụ, REGN7075 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb7075); REGN6321 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6321); REGN6322 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6322); REGN6323 (còn được đề cập trong bản mô tả này là bsAb6323) V_H , V_L , HC hoặc LC hoặc CDR của nó) mà có thể bao gồm trình tự axit amin của polypeptit tham chiếu có trình tự axit amin được nêu cụ thể trong bản mô tả này trừ đối với một hoặc nhiều đột biến (ví dụ,

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10), ví dụ, một hoặc nhiều đột biến sai lệch (ví dụ, sự thay thế bảo thủ), đột biến vô nghĩa, loại bỏ, hoặc chèn. Ví dụ, sáng chế bao gồm CD28xEGFR protein liên kết kháng nguyên bao gồm biến thể chuỗi nhẹ (hoặc V_L) globulin miễn dịch của nhánh liên kết EGFR bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16 nhưng có một hoặc nhiều trong số các đột biến như vậy và/hoặc biến thể chuỗi nặng (hoặc V_H) globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 nhưng có một hoặc nhiều trong số các đột biến như vậy. Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên CD28xEGFR bao gồm biến thể chuỗi nhẹ globulin miễn dịch bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 trong đó một hoặc nhiều (ví dụ, 1 hoặc 2 hoặc 3) của CDR này có một hoặc nhiều trong số các đột biến như vậy (ví dụ, sự thay thế bảo thủ) và/hoặc biến thể chuỗi nặng globulin miễn dịch bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 trong đó một hoặc nhiều (ví dụ, 1 hoặc 2 hoặc 3) của CDR này có một hoặc nhiều trong số các đột biến như vậy (ví dụ, sự thay thế bảo thủ).

"Biến thể được biến đổi bảo thủ" hoặc "csự thay thế bảo thủ", ví dụ, của chuỗi globulin miễn dịch nêu trong bản mô tả này, dùng để chỉ biến thể trong đó có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong polypeptit với axit amin khác có đặc tính tương tự (ví dụ điện tích, kích thước chuỗi bên, kỵ nước/ưa nước, cấu hình khung và độ cứng, v.v.). Các sự thay đổi này có thể thường xuyên được thực hiện mà không làm gián đoạn đáng kể hoạt tính sinh học của kháng thể hoặc mảnh. Nhìn chung, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật nhận biết được rằng một sự thay thế axit amin trong vùng không thiết yếu của polypeptit không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Ngoài ra, sự thay thế axit amin tương tự về cấu trúc và chức năng ít có khả năng làm gián đoạn hoạt tính sinh học một cách đáng kể. Sáng chế bao gồm EGFRxCD28 và protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR và/hoặc nhánh liên kết bao gồm chuỗi globulin miễn dịch biến thể được biến đổi bảo thủ như vậy.

Ví dụ về nhóm axit amin mà có chuỗi bên với đặc tính hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên hydroxyl béo: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên có tính bazơ:

lysine, arginine, và histidine; (6) chuỗi bên có tính axit: aspartate và glutamate, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh: cysteine và methionine. Ngoài ra, sự thay thế bảo thủ là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bộc lộ trong Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-45.

Phân tử liên kết kháng nguyên

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

Thuật ngữ "kháng thể kháng CD28" được sử dụng trong bản mô tả này dự tính bao gồm cả kháng thể kháng CD28 đơn đặc hiệu cũng như kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) bao gồm nhánh liên kết CD28 và nhánh thứ hai mà liên kết kháng nguyên đích. Do đó, sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép trong đó một nhánh của globulin miễn dịch liên kết với CD28 của người, và một nhánh khác của globulin miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên đích. Kháng nguyên đích mà nhánh khác của kháng thể đặc hiệu kép CD28 liên kết có thể là kháng nguyên bất kỳ được biểu hiện trên hoặc ở gần tế bào, mô, cơ quan, vi sinh vật hoặc virus, mà đáp ứng miễn dịch hướng đích được mong muốn. Nhánh liên kết CD28 có thể chứa bất kỳ trình tự axit amin trong số các trình tự axit amin của HCVR/LCVR hoặc CDR như được mô tả trong Bảng 3 và 8 trong bản mô tả này. Theo một số phương án nhất định, nhánh liên kết CD28 liên kết với CD28 của người và gây ra sự tăng sinh của tế bào T của người.

Trong phạm vi của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế trong đó một nhánh của kháng thể liên kết CD28 và nhánh khác liên kết với kháng nguyên đích,

kháng nguyên đích có thể là kháng nguyên liên quan đến khối u, như EGFR.

Theo các phương án ví dụ nhất định, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu CD28 và EGFR. Các phân tử này có thể được đề cập trong bản mô tả này là ví dụ, phân tử đặc hiệu kép "kháng CD28/kháng EGFR," hoặc "kháng CD28xEGFR," hoặc "CD28xEGFR" hoặc "EGFRXCD28", hoặc "kháng EGFR/kháng CD28," hoặc "kháng EGFRxCD28," hoặc "EGFRxCD28", hoặc "kháng EGFR X kháng CD28" hoặc "kháng CD28 X kháng EGFR", hoặc các thuật ngữ tương tự.

Theo các phương án ví dụ nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) có thể có nhánh tác động và nhánh hướng đích. Nhánh tác động có thể là miền liên kết kháng nguyên thứ nhất (ví dụ, kháng thể kháng CD28) mà liên kết với kháng nguyên trên bề mặt tế bào tác động (ví dụ, tế bào T). Nhánh hướng đích có thể là miền liên kết kháng nguyên thứ hai (ví dụ, kháng thể kháng EGFR) mà liên kết với kháng nguyên trên tế bào đích (ví dụ, tế bào khối u). Theo các phương án ví dụ nhất định, nhánh tác động liên kết với CD28 và nhánh hướng đích liên kết với EGFR. Kháng thể kháng CD28/EGFR đặc hiệu kép có thể tạo ra tín hiệu đồng kích thích đến tế bào tác động (ví dụ, tế bào T).

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép" có nghĩa là protein, polypeptit hoặc phức hệ phân tử (ví dụ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) bao gồm ít nhất miền liên kết kháng nguyên thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai. Mỗi vùng liên kết kháng nguyên trong phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một CDR độc lập hoặc kết hợp với một hoặc nhiều CDR và/hoặc FR bổ sung, liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên cụ thể. Trong phạm vi của sáng chế, vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (ví dụ là CD28) và vùng

liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác biệt thứ hai (ví dụ là EGFR).

Theo một số phương án ví dụ của sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép là kháng thể đặc hiệu kép. Mỗi vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Miền liên kết kháng nguyên thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai có thể được kết nối trực tiếp hoặc gián tiếp với nhau để tạo thành phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. Ngoài ra, mỗi miền liên kết kháng nguyên thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai có thể được liên kết với miền đa phân hóa riêng biệt. Sự liên kết của một miền đa phân hóa với một miền đa phân hóa khác tạo điều kiện cho sự liên kết giữa hai miền liên kết kháng nguyên, do đó hình thành phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép. Như được sử dụng trong tài liệu này, "miền đa phân hóa" là đại phân tử, protein, polypeptit, peptit hoặc axit amin có khả năng liên kết với miền đa phân hóa thứ hai của cấu trúc hoặc cấu tạo giống hoặc tương tự. Ví dụ, miền đa phân hóa có thể là polypeptit chứa miền C_{H3} globulin miễn dịch. Ví dụ không giới hạn về thành phần đa phân hóa là phần Fc của globulin miễn dịch (bao gồm miền $C_{H2}-C_{H3}$), ví dụ, miền Fc của IgG được lựa chọn từ các isotyp IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, cũng như các allotyp trong mỗi nhóm isotyp.

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

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

Định dạng hoặc kỹ thuật bất kỳ của kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế.

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

Trong phạm vi của các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu theo sáng chế, các vùng đa phân hóa, ví dụ là vùng Fc, có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thay đổi axit amin (ví dụ là chèn, xóa bỏ hoặc thay thế) so với phiên bản kiểu đại, tồn tại trong tự nhiên của vùng Fc. Ví dụ, sáng chế bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm một hoặc nhiều sửa đổi trong vùng Fc dẫn đến vùng Fc được sửa đổi có tương tác liên kết được sửa đổi (ví dụ là tăng cường hoặc làm giảm) giữa Fc và FcRn. Theo một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa sự biến đổi trong vùng CH₂ hoặc CH₃, trong đó (các) biến đổi này làm tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong hạt cơ quan nội bào mà pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Ví dụ không giới hạn về các biến đổi Fc này bao gồm, ví dụ, biến đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); và 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, LN/FIW hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T) và 256 (ví dụ, S/R/Q/EID hoặc T); hoặc biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, UR/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc V); hoặc biến đổi ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, biến đổi bao gồm biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); biến đổi 428L, 2591 (ví dụ, V2591), và 308F (ví dụ, V308F); biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và biến đổi 434 (ví dụ, 434Y); biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, biến đổi T250Q và M428L); và 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc

308P).

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

Theo một số phương án nhất định, vùng Fc có thể là thể khảm, kết hợp các trình tự Fc có nguồn gốc từ nhiều hơn một isotyp globulin miễn dịch. Ví dụ, vùng Fc mã hóa có thể bao gồm một phần hoặc tất cả trình tự C_H2 có nguồn gốc từ IgG1 của người, IgG2 của người hoặc vùng C_H2 của IgG4 của người, và một phần hoặc tất cả trình tự C_H3 có nguồn gốc từ IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Vùng Fc thể khảm cũng có thể chứa vùng bản lề thể khảm. Ví dụ, vùng bản lề khảm có thể chứa trình tự của "vùng bản lề trên" được tạo ra từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được kết hợp với trình tự của "vùng bản lề dưới" được tạo ra từ vùng bản lề IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Một ví dụ cụ thể về vùng Fc thể khảm có thể được bao gồm trong phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được nêu trong tài liệu này bao gồm, từ đầu N đến đầu C: [IgG4 C_H1] - [bản lề trên IgG4 - [bản lề dưới IgG2]] - [IgG4 C_H2] - [IgG4 C_H3]. Một ví dụ khác về vùng Fc thể khảm có thể có trong phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được nêu trong tài liệu này bao gồm, từ đầu N đến đầu C: [IgG1 C_H1] - [bản lề trên IgG1] - [bản lề dưới IgG2] - [IgG4 C_H2] - [IgG1 C_H3]. Các ví dụ này và khác về miền Fc thể khảm có thể bao gồm bất kỳ phân tử liên kết kháng nguyên nào theo sáng chế

được mô tả trong WO2014/022540 A1, miền Fc thể khảm có sắp xếp cấu trúc chung này, và biến thể của chúng, có thể làm thay đổi liên kết thụ thể Fc, do đó ảnh hưởng đến chức năng tác động Fc.

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm chuỗi globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin nêu cụ thể trong bản mô tả này (và biến thể của nó) cũng như các biến đổi tế bào và sau dịch mã *in vitro* đối với kháng thể hoặc mảnh. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EGFR và CD28 bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ nêu trong bản mô tả này cũng như kháng thể và mảnh trong đó một hoặc nhiều gốc asparagin, serin và/hoặc threonin được glycosyl hóa, một hoặc nhiều gốc asparagin được khử amit hóa, một hoặc nhiều gốc (ví dụ, Met, Trp và/hoặc His) được oxy hóa, glutamin đầu N là pyroglutamat (pyroE) và/hoặc lysin đầu C hoặc axit amin khác bị thiếu.

Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR) Phân tử liên kết và nhánh liên kết kháng nguyên kháng EGFR

Sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép), ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, bao gồm một hoặc nhiều nhánh liên kết EGFR cũng như một hoặc nhiều CD28 nhánh liên kết.

Nhánh liên kết EGFR là một phần của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu tạo ra liên kết EGFR với protein. Theo phương án của sáng chế, nhánh liên kết EGFR của kháng thể đặc hiệu kép REGN7075, REGN6321, REGN6322 hoặc REGN6323 phong bế sự liên kết EGF với EGFR và in another embodiment theo sáng chế, nhánh liên kết EGFR không phong bế sự liên kết EGF với EGFR. Ví dụ, nhánh liên kết EGFR của kháng thể IgG hình chữ Y dùng để chỉ phần cấu trúc của kháng thể tạo ra liên kết đặc hiệu với EGFR. Ví dụ, theo phương án của sáng chế, nhánh liên kết EGFR bao gồm HCDR1, LCDR1, HCDR2, LCDR2, HCDR3 và LCDR3; HCVR (V_H) và LCVR (V_L) và/hoặc HC và LC mà liên kết đặc hiệu với EGFR.

Theo phương án của sáng chế, nhánh liên kết EGFR bao gồm globulin miễn dịch chuỗi nặng bao gồm V_H bao gồm tổ hợp của chuỗi nặng CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và globulin miễn dịch chuỗi nhẹ tương ứng bao gồm V_L bao gồm tổ hợp của chuỗi nhẹ CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được nêu trong bản

mô tả này hoặc trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/004427.

“085N”; “086N”; “089N”; “102N”; “103N”; “116N”; “134P”; “136P”; “141P”; “142P”; “143P”; “144P”; “145P”; “147P”; “151P”; “153P”; “155P”; “157P”; “158P”; “159P”; “161P”; “163P”; “169P” và “171P” dùng để chỉ số định danh của một số kháng thể đơn đặc hiệu kháng EGFR được mô tả trong WO2014/004427. Nhánh HCVR của các kháng thể này có thể được sử dụng để kết hợp với nhánh kháng CD28 có trình tự axit amin HCVR như được mô tả trong Bảng 3 và chuỗi nhẹ chung với trình tự axit amin như được mô tả trong Bảng 6 để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép để hướng đích tế bào khối u biểu hiện EGFR và tế bào T biểu hiện CD28. “REGN7075”, “REGN6321”, “REGN6322” hoặc “REGN6323” lần lượt được đề cập là “bsAb7075”, “bsAb6321”, “bsAb6322” hoặc “bsAb6323” dùng để chỉ kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhánh liên kết EGFR bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_H) hoặc chuỗi nặng có độ dài đầy đủ (hoặc biến thể của chúng) như nêu trong bản mô tả này ở bảng 1, 6 và 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch tương ứng (V_L) hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ (hoặc biến thể của chúng) nêu trong bản mô tả này ở bảng 1, 6 và 8 hoặc bao gồm V_H bao gồm CDR của nó (HCDR1 (hoặc biến thể của chúng), HCDR2 (hoặc biến thể của chúng) và HCDR3 (hoặc biến thể của chúng)) và V_L tương ứng bao gồm CDR của nó (LCDR1 (hoặc biến thể của chúng), LCDR2 (hoặc biến thể của chúng) và LCDR3 (hoặc biến thể của chúng)), ví dụ, trong đó vùng biến đổi và/hoặc CDR bao gồm trình tự axit amin đặc hiệu được mô tả trong bản mô tả này và không là biến thể. V_H như vậy có thể bao gồm trình tự axit amin biến thể trong đó CDR-H không là biến thể; và/hoặc V_L như vậy có thể bao gồm trình tự axit amin biến thể trong đó CDR-L không là biến thể. Các nhánh liên kết EGFR như vậy có thể được đề cập trong phạm vi của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu EGFRxCD28, ví dụ, 085Nx14226P2. Theo phương án của sáng chế, V_H được liên kết với miền chuỗi nặng hằng định IgG (ví dụ, IgG1 hoặc IgG4 (ví dụ, bao gồm đột biến S228P)) và/hoặc V_L được liên kết với miền chuỗi nhẹ hằng định lamda hoặc kappa.

Sáng chế còn đề cập đến protein liên kết kháng nguyên, như kháng thể (ví dụ, human kháng thể, kháng thể đơn dòng và kháng thể tái tổ hợp) và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với EGFR protein hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, miền ngoại bào của EGFR). Protein liên kết kháng nguyên liên

kết với cùng một quyết định kháng nguyên giống nhau trên EGFR là, hoặc cạnh tranh liên kết với EGFR với bất kỳ trong số các protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này, cũng là một phần của sáng chế.

Kháng thể kháng EGFR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm kháng thể bao gồm CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), V_H hoặc trình tự globulin miễn dịch có độ dài đầy đủ của 085N; 086N; 089N; 102N; 103N; 116N; 134P; 136P; 141P; 142P; 143P; 144P; 145P; 147P; 151P; 153P; 155P; 157P; 158P; 159P; 161P; 163P; 169P; 171P; mAb12999P2, mAb13008P2, mAb35193P2, mAb13006P2, REGN7075, REGN6321, REGN6322 hoặc REGN6323 nhánh liên kết EGFR như nêu trong bản mô tả này hoặc trong WO2014/004427 (hoặc biến thể của chúng); và/hoặc CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3), V_L hoặc trình tự globulin miễn dịch có độ dài đầy đủ của 085N; 086N; 089N; 102N; 103N; 116N; 134P; 136P; 141P; 142P; 143P; 144P; 145P; 147P; 151P; 153P; 155P; 157P; 158P; 159P; 161P; 163P; 169P; 171P; mAb12999P2, mAb13008P2, mAb35193P2, mAb13006P2, REGN7075, REGN6321, REGN6322 hoặc REGN6323 nhánh liên kết EGFR như nêu trong bản mô tả này hoặc trong WO2014/004427 (hoặc biến thể của chúng).

“REGN7075”, “REGN6321”, “REGN6322” hoặc “REGN6323” có thể còn dùng để chỉ kháng thể kháng EGFR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, kháng thể đơn đặc hiệu và mảnh) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_H) hoặc chuỗi nặng có độ dài đầy đủ nêu trong bản mô tả này (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch tương ứng (V_L) hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ nêu trong bản mô tả này (hoặc biến thể của chúng); hoặc bao gồm V_H bao gồm CDR của nó (HCDR1 (hoặc biến thể của chúng), HCDR2 (hoặc biến thể của chúng) và HCDR3 (hoặc biến thể của chúng)) và V_L tương ứng bao gồm CDR của nó (LCDR1 (hoặc biến thể của chúng), LCDR2 (hoặc biến thể của chúng) và LCDR3 (hoặc biến thể của chúng)), ví dụ, trong đó vùng biến đổi và/hoặc CDR bao gồm trình tự axit amin đặc hiệu được mô tả trong bản mô tả này và không là biến thể. V_H như vậy có thể bao gồm trình tự axit amin biến thể trong đó CDR-H không là biến thể; và/hoặc V_L như vậy có thể bao gồm trình tự axit amin biến thể trong đó CDR-L không là biến thể. Theo phương án của sáng chế, V_H được liên kết với miền chuỗi nặng hằng định IgG (ví dụ, IgG1 hoặc IgG4) và/hoặc V_L được liên kết với miền chuỗi nhẹ hằng định lamda hoặc kappa.

Protein liên kết kháng nguyên REGN7075, REGN6321, REGN6322 và REGN6323 là protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có một nhánh HCVR mà liên kết với EGFR (và/hoặc một hoặc nhiều kháng nguyên khác hoặc quyết định kháng nguyên EGFR khác) và có một nhánh HCVR mà liên kết với CD28 trên tế bào T.

Trình tự axit amin của chuỗi globulin miễn dịch của REGN7075, REGN6321, REGN6322 và REGN6323 được nêu dưới đây:

Thành phần EGFR của REGN7075

HCVR của nhánh EGFR từ EGFR mAb12999P2 mẹ):

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSIITFYWSWIRQPPGRGLEWI
GYIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVSE
DSYFHYGMDVWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 2; CDR gạch dưới)

CDR-H1: G D S I I T F Y (SEQ ID NO: 4)

CDR-H2: I Y Y S G I T (SEQ ID NO: 6)

CDR-H3: A R V S E D S Y F H Y G M D V (SEQ ID NO:

8)

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của nhánh EGFR của kháng thể đặc hiệu kép REGN7075

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSIITFYWSWIRQPPGRGLEWI
GYIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARVSE
DSYFHYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(SEQ ID NO: 24)

LCVR của kháng thể mẹ EGFR và CD28 và kháng thể đặc hiệu kép
REGN7075

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA^{WYQQKPGQAPRL}
IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
GTKVEIK

(SEQ ID NO: 16; CDR gạch dưới)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của cả kháng thể mẹ EGFR và CD28 và đặc
hiệu kép

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA^{WYQQKPGQAPRL}
IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 28)

Thành phần EGFR của REGN6321

HCVR của nhánh EGFR từ EGFR mAb13008P2 mẹ

EVQLVESGGGLVPRGGSLRLSCTASGFTFSTFIMFWVRQAPGKGLY
VSSISSNGGTIIYADSVKGRFTISRDN^{SKNTLYLQM}GS^{LRAEDMAVYYCTR}
GGDFWSGYYPFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 30; CDR gạch dưới)

CDR-H1: G F T F S T F I (SEQ ID NO: 32)

CDR-H2: I S S N G G T I (SEQ ID NO: 34)

CDR-H3: T R G G D F W S G Y Y P F D Y (SEQ ID NO:
36)

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của nhánh EGFR của kháng thể đặc hiệu kép
REGN6321

EVQLVESGGGLVRPGGSLRLSCTASGFTFSTFIMFWVRQAPGKGLEY
 VSSISSNGGTIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGS LRAEDMAVYYCTR
 GGDFWSGYYPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK
 TYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
 PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
 FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK

(SEQ ID NO: 38)

LCVR của kháng thể mẹ EGFR và CD28 và kháng thể đặc hiệu kép
 REGN6321

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLL
 IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
 GTKVEIK

(SEQ ID NO: 16; CDR gạch dưới)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của cả kháng thể mẹ EGFR và CD28 và đặc
 hiệu kép

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLL
 IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 28)

Thành phần EGFR của REGN6322

HCVR của nhánh EGFR từ EGFR mAb35193P2 mẹ:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTASSGFSFRDAWMTWVRQVPGKGLE
 WVGRIRNKIDGGTTDYNTVPKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYY
 CTTDIWNYVLFYYYGLDVWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 40; CDR gạch dưới)

CDR-H1: G F S F R D A W (SEQ ID NO: 42)

CDR-H2: I R N K I D G G T T (SEQ ID NO: 44)

CDR-H3: T T D I W N Y V L F Y Y Y G L D V (SEQ ID
 NO: 46)

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của nhánh EGFR của kháng thể đặc hiệu kép
 REGN6322

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTASGFSFRDAWMTWVRQVPGKGLE
 WVGRIRNKIDGGTTDYNTVPKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYY
 CTTDIWNYVLFYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
 AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPCPAPPVAGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
 DSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
 (SEQ ID NO: 48)

LCVR của kháng thể mẹ EGFR và CD28 và kháng thể đặc hiệu kép
 REGN6322

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL
 IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
 GTKVEIK

(SEQ ID NO: 16; CDR gạch dưới)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của cả kháng thể mẹ EGFR và CD28 và đặc hiệu kép

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRL
IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
GTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 28)

Thành phần EGFR của REGN6323

HCVR của nhánh EGFR từ EGFR mAb13006P2 mẹ:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSIISYYWSWIRQPPGKGLEWI
GYIYYSGRTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQVSLKLNSVIAADTAVYYCARVSE
DSYYHYGMDVWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 50; CDR gạch dưới)

CDR-H1: D D S I I S Y Y (SEQ ID NO: 52)

CDR-H2: I Y Y S G R T (SEQ ID NO: 54)

CDR-H3: A R V S E D S Y Y H Y G M D V (SEQ ID NO:
56)

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của nhánh EGFR của kháng thể đặc hiệu kép
REGN6323

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSIISYYWSWIRQPPGKGLEWI
GYIYYSGRTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQVSLKLNSVIAADTAVYYCARVSE
DSYYHYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

(SEQ ID NO: 58)

LCVR của kháng thể mẹ EGFR và CD28 và kháng thể đặc hiệu kép
REGN6323

EIVLTQSPGTL^SSLSPGERATL^SSCRASQSVSSSYLA^{WYQQKPGQAPRLL}
IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
GTKVEIK

(SEQ ID NO: 16; CDR gạch dưới)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của cả kháng thể mẹ EGFR và CD28 và đặc
hiệu kép

EIVLTQSPGTL^SSLSPGERATL^SSCRASQSVSSSYLA^{WYQQKPGQAPRLL}
IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 28)

Theo phương án của sáng chế, chuỗi nặng mAb12999P2, mAb13008P2,
mAb35193P2, hoặc mAb13006P2 được bắt cặp với chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit
amin được chọn từ:

QSVSSSYLA^{WYQQKPGQAPRLL}IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 16);

và

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN^{WYQQKPGKAPKLLI}
YAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQ
GTRLEIK

(SEQ ID NO: 67).

Nhánh liên kết CD28 (nhóm biệt hóa 28)

Sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép), ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, bao gồm một hoặc nhiều nhánh liên kết CD28 cũng như một hoặc nhiều nhánh liên kết EGFR.

Nhánh liên kết CD28 là một phần của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu tạo ra liên kết CD8 với protein. Ví dụ, nhánh liên kết CD28 của kháng thể IgG hình chữ Y dùng để chỉ phần cấu trúc của kháng thể tạo ra liên kết đặc hiệu với CD28. Ví dụ, theo phương án của sáng chế, nhánh liên kết CD28 bao gồm HCDR1, LCDR1, HCDR2, LCDR2, HCDR3 và LCDR3; HVCR (V_H) và LCVR (V_L) và/hoặc HC và LC mà liên kết đặc hiệu với CD28.

Theo phương án của sáng chế, nhánh liên kết CD28 bao gồm globulin miễn dịch chuỗi nặng bao gồm V_H bao gồm tổ hợp của chuỗi nặng CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và globulin miễn dịch chuỗi nhẹ tương ứng bao gồm V_L bao gồm tổ hợp của chuỗi nhẹ CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được nêu trong bản mô tả này. Theo phương án của sáng chế, nhánh liên kết CD28 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng (V_L) nêu trong bản mô tả này.

Trình tự axit amin của chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể kháng CD28 mẹ 14226P2, 14193P2 và 14216P2 được nêu dưới đây:

CD28 mAb mẹ được sử dụng để tạo ra đặc hiệu kép

mAb14226P2

HCVR của mAb14226P2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI
GYIYYSGITHYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGV
RRDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS

(SEQ ID NO: 10)

CDR-H1: GGSISSYY (SEQ ID NO: 12)

CDR-H2: IYYSGIT (SEQ ID NO: 6)

CDR-H3: ARWGVRRDYYYYGMDV (SEQ ID NO: 14)

Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của mAb14226P2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWI

GYIYYSGITHYNPSLKSRVTISVDTSKIQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWGV
 RRDYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
 YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 26)

LCVR của mAb14226P2

QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 16)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của mAb14226P2

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLI
 IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 28)

mAb14193P2

HCVR của mAb14193P2

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
 WVAVISYAGNNKYYADSVKGRFTVSRDNSKKTLYLQMNSLRSEDTAVYY
CAKDSYYDFLTDPDVLDIWGQGTMTVTVSS

(SEQ ID NO: 59)

CDR-H1: GFTFSSYG (SEQ ID NO: 60)

CDR-H2: ISYAGNNK (SEQ ID NO: 61)

CDR-H3: AKDSYYDFLTDPDVLDI (SEQ ID NO: 62)

LCVR của mAb14193P2

QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 16)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

mAb14216P2

HCVR của mAb14216P2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNNMHWVRQAPGKGLE
YVSGISSNGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGGGLRAADMAVYFC
TRDDELLSFDYWGQGT LVT VSS

(SEQ ID NO: 63)

CDR-H1: GFTFSRNN (SEQ ID NO: 64)

CDR-H2: ISSNGGRT (SEQ ID NO: 65)

CDR-H3: TRDDELLSFDY (SEQ ID NO: 66)

LCVR của mAb14216P2

QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 16)

CDR-L1: QSVSSSY (SEQ ID NO: 18)

CDR-L2: GAS (SEQ ID NO: 20)

CDR-L3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 22)

Theo phương án của sáng chế, chuỗi nặng 14226P2, 14193P2 hoặc

14216P2 được bắt cặp với chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ:

QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL
TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 16);

và

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
YAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQ
GTRLEIK

(SEQ ID NO: 67).

“14226P2”, “14193P2” hoặc “14216P2” hoặc “mAb14226P2”, “mAb14193P2” hoặc “mAb14216P2” dùng để chỉ kháng thể đơn đặc hiệu mẹ mà từ đó nhân CD28 của đặc hiệu kép được mô tả trong bản mô tả này thu được. Nhánh liên kết CD28 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_H) hoặc chuỗi nặng có độ dài đầy đủ nêu trong bản mô tả này (hoặc biến thể của chúng); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch tương ứng (V_L) hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ nêu trong bản mô tả này (hoặc biến thể của chúng); hoặc bao gồm V_H bao gồm CDR của nó (HCDR1 (hoặc biến thể của chúng), HCDR2 (hoặc biến thể của chúng) và HCDR3 (hoặc biến thể của chúng)) và V_L tương ứng bao gồm CDR của nó (LCDR1 (hoặc biến thể của chúng), LCDR2 (hoặc biến thể của chúng) và LCDR3 (hoặc biến thể của chúng)), ví dụ, trong đó vùng biến đổi và/hoặc CDR bao gồm trình tự axit amin đặc hiệu được mô tả trong bản mô tả này và mà không là biến thể. V_H như vậy có thể bao gồm trình tự axit amin biến thể trong đó CDR-H không là biến thể; và/hoặc V_L như vậy có thể bao gồm trình tự axit amin biến thể trong đó CDR-L không là biến thể. Các nhánh liên kết CD28 như vậy có thể được đề cập trong phạm vi của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu EGFRxCD28, ví dụ, 085Nx14226P2. Theo phương án của sáng chế, V_H được liên kết với miền chuỗi nặng hằng định IgG (ví dụ, IgG1 hoặc IgG4) và/hoặc V_L được liên kết với miền chuỗi nhẹ hằng định lamda hoặc kappa.

Sáng chế còn đề cập đến protein liên kết kháng nguyên, như kháng thể (ví dụ, kháng thể của người, kháng thể đơn dòng và kháng thể tái tổ hợp) và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với CD28 protein hoặc mảnh liên kết

kháng nguyên của nó (ví dụ, miền ngoại bào của CD28). Protein liên kết kháng nguyên liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên giống nhau trên CD28 là, hoặc cạnh tranh liên kết với CD28 với bất kỳ trong số các protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này, cũng là một phần của sáng chế.

Protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 đa đặc hiệu theo sáng chế mà liên kết với CD28 trên bề mặt của tế bào T và đồng hóa tín hiệu CD28 tăng cường sự hoạt hóa và/hoặc tăng sinh của tế bào T có thể được đề cập trong bản mô tả này là “đồng kích thích” hoặc “cùng kích thích”. Sự hoạt hóa tế bào T được bắt đầu khi liên kết phức hợp (TCR)/CD3 thụ thể tế bào T với phức hợp peptit-MHC (“tín hiệu 1”); sau đó, sự hoạt hóa được tăng cường nhờ sự gắn kết của thụ thể “đồng kích thích” thứ hai, chẳng hạn như thụ thể CD28 trên tế bào T liên kết với (các) phối tử có cùng nguồn gốc của nó trên tế bào đích (“tín hiệu 2”). Ví dụ, sự hoạt hóa tế bào T bằng kháng thể đặc hiệu kép CD28 có thể được gây ra bằng sự khuếch đại tín hiệu phản ứng với sự nhận diện kháng nguyên khối u nội sinh bằng phức hợp TCR/CD3, hoặc phản ứng với sự hoạt hóa “tín hiệu 1” thông qua đặc hiệu kép CD3.

Protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu

Sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên là đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) và liên kết ít nhất với EGFR và CD28. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể này được đề cập ở dạng AxB trong đó A chỉ nhánh liên kết trong phân tử đa đặc hiệu mà liên kết với EGFR và B chỉ nhánh liên kết trong phân tử đa đặc hiệu mà liên kết với CD28, hoặc ngược lại. EGFRxCD28 hoặc CD28xEGFR dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu mà liên kết với EGFR và CD28. Nhánh liên kết EGFR và CD28 đặc hiệu trong protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu cũng có thể được chỉ định ở dạng AxB trong đó A đề cập đến một nhánh đặc hiệu và B đề cập đến một nhánh đặc hiệu khác. Ví dụ, 085Nx14226P2 dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu có nhánh liên kết kháng EGFR của 085N như nêu trong bản mô tả này và kháng CD28 nhánh liên kết của 14226P2 như nêu trong bản mô tả này. 085N, ví dụ, là nhánh liên kết bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch 085N hoặc vùng biến đổi của nó hoặc CDR của nó mà trình tự của chúng được nêu cụ thể trong bản mô tả này hoặc là biến thể của chúng.

Theo các phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu

bao gồm protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép" có nghĩa là protein, polypeptit hoặc phức hệ phân tử (ví dụ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) bao gồm ít nhất miền liên kết kháng nguyên thứ nhất và miền liên kết kháng nguyên thứ hai. Mỗi vùng liên kết kháng nguyên trong phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một CDR độc lập hoặc kết hợp với một hoặc nhiều CDR và/hoặc FR bổ sung, liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên cụ thể. Trong phạm vi của sáng chế, vùng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (ví dụ là CD28) và vùng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác biệt thứ hai (ví dụ là EGFR).

Liên kết đa đặc hiệu dùng để chỉ liên kết với hai hoặc nhiều quyết định kháng nguyên khác (EGFR và CD28 hoặc nhiều hơn) mà có thể trên cùng một kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau. Đa đặc hiệu bao gồm đặc hiệu kép, đặc hiệu ba và đặc hiệu bốn.

Sáng chế bao gồm bất kỳ trong số protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu sau đây (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó): REGN7075, REGN6321, REGN6322, REGN6323, cũng như kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách kết hợp bất kỳ trong số các nhánh EGFR HCVR của **Bảng 1** (ví dụ, nhánh HCVR của kháng thể đơn dòng mẹ mAb12999P2, mAb13008P2, mAb35193P2 và mAb13006P2) với bất kỳ trong số các nhánh CD28 HCVR của **Bảng 3** (ví dụ nhánh HCVR của mAb14226, mAb14193 và mAb14216 mẹ) và phương pháp sử dụng chúng như nêu trong bản mô tả này.

Polynucleotit và phương pháp sản xuất

Polynucleotit phân lập mã hóa chuỗi globulin miễn dịch của bất kỳ protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu EGFRxCD28 hoặc protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR nêu trong bản mô tả này tạo thành một phần của sáng chế như vector bao gồm polynucleotit và/hoặc tế bào chủ (ví dụ, tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO)) bao gồm polynucleotit, vector hoặc protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này.

Polynucleotit bao gồm ADN và ARN. Sáng chế bao gồm polynucleotit bất kỳ theo sáng chế, ví dụ, mã hóa V_H, V_L, CDR-H, CDR-L, HC hoặc LC globulin miễn

dịch của nhánh liên kết EGFR và/hoặc nhánh liên kết CD28, tùy ý, mà được liên kết chức năng với vùng khởi động hoặc trình tự kiểm soát biểu hiện khác. Ví dụ, sáng chế đề xuất polynucleotit bất kỳ (ví dụ, ADN) bao gồm trình tự nucleotit nêu trong **Bảng 2** và trình tự nucleotit nêu trong **Bảng 4**.

Sáng chế bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 29, 31, 33, 35, 39, 41, 43, 45, 49, 51, 53 và/hoặc 55, tùy ý được liên kết chức năng với vùng khởi động hoặc trình tự kiểm soát biểu hiện khác hoặc trình tự polynucleotit khác.

Nhìn chung, "vùng khởi động" hoặc "trình tự khởi động" là vùng điều hòa ADN có khả năng liên kết ARN polymeraza trong tế bào (ví dụ, trực tiếp hoặc thông qua protein hoặc chất được liên kết với vùng khởi động) và bắt đầu phiên mã trình tự mã hóa. Vùng khởi động có thể được liên kết chức năng với trình tự kiểm soát biểu hiện khác, bao gồm trình tự tăng cường và kìm hãm và/hoặc với polynucleotit theo sáng chế. Vùng khởi động có thể được sử dụng để kiểm soát sự biểu hiện gen bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng khởi động của cytomegalovirus (CMV) (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,385,839 và 5,168,062), vùng khởi động sớm SV40 (Benoist, *et al.*, (1981) *Nature* 290:304-310), vùng khởi động có trong vùng lặp lại đầu dài 3' của virus saccarom Rous (Yamamoto, *et al.*, (1980) *Cell* 22:787-797), vùng khởi động thymidin kinaza của virus herpes (Wagner, *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445), trình tự điều hòa của gen metallothionein (Brinster, *et al.*, (1982) *Nature* 296:39-42); vectơ biểu hiện của sinh vật nhân sơ như vùng khởi động beta-lactamaza (VIIIa-Komaroff, *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731), hoặc vùng khởi động *tac* (DeBoer, *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25); cũng xem "Useful proteins from recombinant bacteria" trong *Scientific American* (1980) 242:74-94; và thành phần vùng khởi động từ nấm men hoặc nấm khác như vùng khởi động *Gal4*, vùng khởi động ADC (alcohol dehydrogenaza), vùng khởi động PGK (phosphoglycerol kinaza) hoặc vùng khởi động alkaline phosphatase.

Polynucleotit mã hóa polypeptit được "liên kết chức năng" với vùng khởi động hoặc trình tự kiểm soát biểu hiện khác khi, trong tế bào hoặc hệ biểu hiện khác, trình tự định hướng sự phiên mã qua trung gian ARN polymeraza của trình tự mã hóa đến ARN, tốt hơn là mRNA, mà sau đó có thể là ARN được ghép nối (nếu nó chứa intron) và, tùy ý, dịch mã thành protein được mã hóa bởi trình tự mã hóa.

Sáng chế bao gồm polynucleotit mã hóa chuỗi polypeptit globulin miễn dịch là biến thể của trình tự nucleotit của chúng được nêu cụ thể trong bản mô tả này. "Biến thể" của polynucleotit dùng để chỉ polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mà ít nhất khoảng 70-99,9% (ví dụ, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) tương đồng với trình tự nucleotit tham chiếu được nêu trong bản mô tả này; khi sự so sánh được thực hiện bởi thuật toán BLAST trong đó các thông số của thuật toán được lựa chọn để đưa ra ghép cặp lớn nhất giữa các trình tự tương ứng trên toàn bộ chiều dài của trình tự tham chiếu tương ứng (ví dụ, ngưỡng mong đợi: 10; kích thước từ: 28; ghép cặp tối đa trong khoảng truy vấn: 0; điểm ghép cặp/ghép lệch 1, -2; chi phí chênh lệch: bằng). Theo phương án của sáng chế, biến thể của trình tự nucleotit nêu cụ thể trong bản mô tả này bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12) đột biến điểm, chèn (ví dụ, in frame insertions) hoặc loại bỏ (ví dụ, loại bỏ trong khung) một hoặc nhiều nucleotit. Đột biến như vậy có thể, theo phương án của sáng chế, là đột biến sai nghĩa hoặc vô nghĩa. Theo phương án của sáng chế, biến thể polynucleotit này mã hóa chuỗi polypeptit globulin miễn dịch mà có thể được đưa vào nhánh liên kết EGFR và/hoặc nhánh liên kết CD28, tức là, sao cho protein giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với EGFR và/hoặc CD28.

Tế bào chủ sinh vật nhân thực và nhân sơ, bao gồm tế bào động vật có vú, có thể được sử dụng làm vật chủ để biểu hiện protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR và EGFRxCD28 (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) hoặc nhánh liên kết kháng nguyên của nó. Tế bào chủ như vậy đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật và nhiều tế bào có sẵn từ American Type Culture Collection (ATCC). Tế bào chủ này bao gồm, *không kể những cái khác*, tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), NSO, tế bào SP2, tế bào HeLa, tế bào thận chuột lang con (BHK), tế bào thận của khỉ (COS), tế bào ung thư biểu mô gan của người (ví dụ, Hep G2), tế bào A549, tế bào 3T3, tế bào HEK-293 và một số dòng tế bào khác. Tế bào chủ của động vật có vú bao gồm tế bào của người, chuột nhắt, chuột cống, chó, con khỉ, con lợn, con dê, bò, ngựa và chuột lang. Các dòng tế bào khác mà có thể được sử dụng là dòng tế bào côn trùng (ví dụ, *Spodoptera frugiperda* hoặc *Trichoplusia ni*), tế bào lưỡng cư, tế bào vi khuẩn, tế bào thực vật và tế bào nấm. Tế bào nấm bao gồm tế bào nấm men và nấm sợi bao gồm, ví dụ, *Pichia*, *Pichia pastoris*,

Pichia finlandica, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* và *Neurospora crassa*. Sáng chế bao gồm tế bào chủ phân lập (ví dụ, tế bào CHO hoặc loại tế bào chủ bất kỳ nêu trên) bao gồm kháng thể kháng EGFR (ví dụ, kháng thể EGFR được tìm thấy trong WO2014/004427) hoặc protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR x kháng CD28 theo sáng chế, như REGN7075; REGN6321; REGN6322; REGN6323 và protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR X kháng CD28 được trình bày ở bảng 9A, 9B hoặc 9C, hoặc polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (Ig) của nó; và/hoặc một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa nhánh liên kết EGFR và CD28 nhánh liên kết của protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm tế bào biểu hiện EGFR và/hoặc CD28 hoặc mảnh kháng nguyên hoặc thể dung hợp của chúng (ví dụ, His₆ (SEQ ID NO: 68), Fc và/hoặc myc) được liên kết bởi EGFRxCD28 và/hoặc protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR theo sáng chế (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó), ví dụ, REGN7075, REGN6321, REGN6322, REGN6323, cũng như kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách kết hợp bất kỳ trong số các nhánh EGFR HCVR của Bảng 1 (ví dụ, nhánh HCVR của kháng thể đơn dòng mẹ mAb12999P2, mAb13008P2, mAb35193P2 và mAb13006P2) với bất kỳ trong số các nhánh CD28 HCVR của Bảng 3 (ví dụ nhánh HCVR của mAb14226, mAb14193 và mAb14216 mẹ), hoặc bất kỳ trong số kháng thể đặc hiệu kép được trình bày ở bảng 9A, 9B và 9C, ví dụ, trong đó tế bào ở trong cơ thể của đối tượng hoặc ở *in vitro*.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phức hợp bao gồm EGFRxCD28, và/hoặc protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR theo sáng chế, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, như được thảo luận trong bản mô tả này tạo phức với polypeptit EGFR và/hoặc CD28 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc thể dung hợp của chúng và/hoặc với kháng thể thứ cấp hoặc mảnh liên kết kháng

nguyên của nó (ví dụ, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện) mà liên kết đặc hiệu với kháng thể kháng EGFR hoặc EGFRxCD28 hoặc mảnh. Theo phương án của sáng chế, phức hợp ở *in vitro* (ví dụ, được làm bất động vào cơ chất rắn) hoặc ở trong cơ thể của đối tượng. Theo phương án của sáng chế, EGFR ở trên bề mặt của tế bào khối u và CD28 ở trên bề mặt của tế bào miễn dịch, ví dụ, tế bào T. Theo phương án của sáng chế, tế bào T được hoạt hóa.

Có một số phương pháp để sản xuất kháng thể tái tổ hợp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Một ví dụ về phương pháp sản xuất tái tổ hợp kháng thể được bộc lộ trong US4816567. Sự biến nạp có thể được thực hiện bởi các phương pháp đã biết để đưa polynucleotit vào tế bào chủ. Phương pháp đưa polynucleotit khác loại vào tế bào động vật có vú đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm chuyển nạp qua trung gian dextran, kết tủa canxi phosphat, chuyển nạp qua trung gian polybren, dung hợp tế bào nguyên sinh, kết hợp điện, đóng gói (các) polynucleotit trong liposom, tiêm biolistic và vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân. Ngoài ra, phân tử axit nucleic có thể được đưa vào tế bào động vật có vú bằng vector virus. Phương pháp biến nạp tế bào đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, bằng sáng chế mỹ số 4399216; 4912040; 4740461 và 4959455.

Sáng chế bao gồm phương pháp tái tổ hợp để sản xuất protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR x kháng CD28 (ví dụ, REGN7075, REGN6321, REGN6322 hoặc REGN6323) theo sáng chế, như kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc chuỗi globulin miễn dịch của nó, bao gồm các bước:

(i) đưa, vào tế bào chủ, một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa chuỗi globulin miễn dịch chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mã hóa EGFRxCD28 hoặc nhánh liên kết kháng nguyên của protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR ví dụ, trong đó polynucleotit ở trong vector; và/hoặc tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và/hoặc được liên kết chức năng với vùng khởi động;

(ii) nuôi cấy tế bào chủ (ví dụ, CHO hoặc *Pichia* hoặc *Pichia pastoris*) dưới điều kiện thích hợp để biểu hiện polynucleotit và,

(iii) tùy ý, phân lập protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên) hoặc chuỗi từ tế bào chủ và/hoặc môi trường trong đó tế bào chủ được nuôi. Sáng chế còn bao gồm protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR

hoặc EGFRxCD28, như kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà là sản phẩm của phương pháp sản xuất nêu trong bản mô tả này, và, tùy ý, phương pháp tinh sạch nêu trong bản mô tả này.

Theo phương án của sáng chế, phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 (ví dụ, REGN7075, REGN6321, REGN6322 hoặc REGN6323), ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm phương pháp tinh sạch protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, bằng sắc ký cột, kết tủa và/hoặc lọc. Như đã thảo luận, sản phẩm của phương pháp này cũng tạo thành một phần của sáng chế.

Biến thể trình tự

Các kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm và/hoặc bớt axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với trình tự dòng mầm tương ứng mà các vùng liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ đó. Các đột biến này có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó, một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ dòng mầm này, hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người, hoặc đột biến thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các sự thay đổi trình tự như trên được đề cập trong đây gọi chung là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng sản xuất một lượng lớn kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên, mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng lẻ hoặc tổ hợp của các đột biến này. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng V_H và/hoặc V_L được gây đột biến quay trở lại các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà miền liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác,

chỉ một số gốc được gây đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1, hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến với các gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác (cụ thể là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà vùng liên kết kháng nguyên được tạo ra từ đó). Hơn nữa, vùng liên kết kháng nguyên sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hay nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng lẻ nhất định bị đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể, trong khi một số gốc khác có khác biệt với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được gây đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác. Sau khi thu hồi, các vùng liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được kiểm tra với một hoặc nhiều thuộc tính mong muốn như: cải thiện tính đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, cải thiện hoặc tăng cường các đặc tính đối vận hay đồng vận (như trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm một hoặc nhiều vùng liên kết kháng nguyên thu được theo cách này nói chung, được bao hàm trong sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên, trong đó một hoặc tất cả vùng liên kết kháng nguyên bao gồm biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều sự thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết kháng nguyên có trình tự axit amin của HCVR, LCVR, và/hoặc CDR có, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. sự thay thế axit amin bảo toàn liên quan đến trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả ở đây. “Thay thế axit amin bảo thủ” là, trong đó một gốc axit amin được thay thế bởi một gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với các đặc điểm hóa học tương tự (ví dụ, mang điện tích hoặc kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo thủ về cơ bản sẽ không thay đổi các đặc tính chức năng của protein. Các ví dụ về nhóm axit amin có chuỗi bên có các thuộc tính hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên aliphatic: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên aliphatic-hydroxyl: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa

amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên vòng thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên bazơ: lyxin, arginin, và histidin; (6) chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh là cystein và metionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, sự thay thế bảo thủ là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bộc lộ trong Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. Sự thay thế "tương đối bảo toàn" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý.

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng liên kết kháng nguyên với trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR về cơ bản tương đồng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR được mô tả trong tài liệu này. Thuật ngữ "cơ bản tương đồng" hoặc "về cơ bản tương đồng", khi đề cập đến trình tự axit amin có nghĩa là hai trình tự axit amin, khi được sắp xếp một cách tối ưu, được xác định độ tương tự bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng trọng lượng khoảng trống mặc định, tìm ra được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất khoảng 98%, và 99%. Tốt hơn là, vị trí các gốc không tương đồng khác biệt bởi việc thay thế axit amin bảo thủ. Trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự thay thế bảo thủ, phần trăm độ tương đồng trình tự hoặc độ tương tự có thể được điều chỉnh lên cho đúng với bản chất bảo thủ của sự thay thế. Các phương pháp điều chỉnh đã được biết đến rộng rãi đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331.

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

sử dụng thông số mặc định hoặc thông số khuyến nghị, chương trình trong GCG ver.6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các sắp xếp và phần trăm độ tương đồng của vùng xếp chồng giữa trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Kỹ thuật giải được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Kháng thể bao gồm các biến thể Fc

Theo một số phương án theo sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 được đề xuất chứa vùng Fc chứa một hoặc nhiều đột biến mà làm tăng hoặc làm giảm việc liên kết kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở pH axit khi so với pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên chứa đột biến trong vùng C_H2 hoặc C_H3 của vùng Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của vùng Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong hạt cơ quan nội bào trong đó pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến này có thể làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể khi được dùng cho động vật. Ví dụ không giới hạn về biến đổi Fc này bao gồm, ví dụ, biến đổi ở vị trí

- 250 (ví dụ, E hoặc Q);
- 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F);
- 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T),
- 254 (ví dụ, S hoặc T), và/hoặc
- 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T);

hoặc biến đổi ở vị trí

- 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc
- 434 (ví dụ, H/F hoặc Y);

hoặc biến đổi ở vị trí

- 250 và/hoặc 428;

hoặc biến đổi ở vị trí

- 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và/hoặc

- 434.

Theo một phương án, biến đổi bao gồm

- biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S);
- biến đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F);
- biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y);
- biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E);
- biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và/hoặc
- biến đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

Ví dụ, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép EGFRxCD28 bao gồm vùng Fc chứa một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm của các đột biến được chọn lọc từ nhóm bao gồm:

- 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L);
- 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E);
- 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); và
- 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F).

Tất cả các dạng kết hợp có thể có của các vùng Fc đột biến trên đây, và đột biến khác trong vùng biến đổi của kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

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

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

hướng đích và các tác dụng phụ có hại gây ra từ đó.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết CD28 của người (ví dụ, ở 25°C) với K_D là nhỏ hơn khoảng 200 nM khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được nêu ở Ví dụ 5 và 13 trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD28 với K_D nhỏ hơn khoảng 100 nM, nhỏ hơn khoảng 90 nM, nhỏ hơn khoảng 80 nM, nhỏ hơn khoảng 60 nM, nhỏ hơn khoảng 40 nM, nhỏ hơn khoảng 30 nM, nhỏ hơn 20 nM, nhỏ hơn 10 nM, hoặc nhỏ hơn 5 nM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định ở Ví dụ 1 và 13 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần giống. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD28 với K_D nằm trong khoảng từ khoảng 5 nM đến khoảng 20 nM.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết CD28 với thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) là lớn hơn khoảng 3 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định ở Ví dụ 1 và 13 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần giống. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết CD28 với $t_{1/2}$ là lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 70 phút, lớn hơn khoảng 80 phút, lớn hơn khoảng 90 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 200 phút, lớn hơn khoảng 300 phút, lớn hơn khoảng 400 phút, lớn hơn khoảng 500 phút, lớn hơn khoảng 600 phút, lớn hơn khoảng 700 phút, lớn hơn khoảng 800 phút, lớn hơn khoảng 900 phút, lớn hơn khoảng 1000 phút, hoặc lớn hơn khoảng 1200 phút, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định ở Ví dụ 1 và 13 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần giống.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) có khả năng liên kết đồng thời với CD28 của người và EGFR của người. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế tương tác đặc hiệu với tế bào biểu hiện CD28 và/hoặc EGFR. Mức

độ mà phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết tế bào biểu hiện CD28 và/hoặc EGFR có thể được đánh giá bằng phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), như được minh họa ở Ví dụ 10A và 10B trong bản mô tả này. Ví dụ, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu dòng tế bào của người biểu hiện CD28 nhưng không biểu hiện EGFR (ví dụ, tế bào Jurkat), và dòng tế bào ung thư buồng trứng của người biểu hiện EGFR nhưng không biểu hiện CD28 (ví dụ, PEO1). Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với tế bào T của người hoặc của khỉ đuôi dài biểu hiện CD28 với giá trị EC₅₀ nhỏ hơn 1×10^{-5} M. Theo một số phương án, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với tế bào T của người hoặc của khỉ đuôi dài biểu hiện CD28 với giá trị EC₅₀ nằm trong khoảng từ 1×10^{-12} M đến 1×10^{-5} M. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với tế bào T của người hoặc của khỉ đuôi dài biểu hiện CD28 với giá trị EC₅₀ nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} M đến 1×10^{-5} M. Theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết với bề mặt của dòng tế bào biểu hiện EGFR với EC₅₀ nhỏ hơn khoảng $2,5 \times 10^{-8}$ M. Sự liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép với bề mặt của tế bào hoặc dòng tế bào có thể được xác định bằng thử nghiệm liên kết FACS *in vitro* như được mô tả trong Ví dụ 10A và 10B.

Protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 nêu trong bản mô tả này, ví dụ, bao gồm chuỗi globulin miễn dịch biến thể, có thể có một hoặc nhiều trong số các đặc điểm sau:

- Việc giảm sự tăng trưởng và/hoặc sống sót của tế bào khối u của người (ví dụ, A431 tế bào khối u) ở chuột nhắt (ví dụ, VH chuột nhắt (Rag^{2null}/γ^{cnull}/huSirp-a/huTPO)) được ghép với tế bào CD34+ (ví dụ, tế bào gan thai CD34+); tùy ý trong đó EGFRxCD28 được dùng kết hợp với chất đối kháng PD1 (ví dụ, kháng PD1 như cemiplimab);
- Việc giảm sự tăng trưởng và/hoặc sống sót của tế bào khối u của người (ví dụ, A431 tế bào khối u) ở chuột nhắt (ví dụ, (NOD/SCID/γ^{cnull})) bao gồm PBMC của người (ví dụ, trong đó PBMC của người được trộn với tế bào khối u được cấy dưới da vào chuột nhắt); tùy ý trong đó EGFRxCD28 được dùng kết hợp với chất đối kháng PD1 (ví dụ, kháng PD1 như cemiplimab);
- Việc giảm sự tăng trưởng và/hoặc sống sót của tế bào khối u của người (ví

dụ, A549 tế bào khối u) ở chuột nhắt (ví dụ, NOD/SCID/ γ_c^{null}) bao gồm PBMC của người (ví dụ, trong đó PBMC của người được cấy trong màng bụng và tế bào khối u được cấy dưới da vào chuột nhắt); tùy ý trong đó EGFRxCD28 được dùng kết hợp với chất đối kháng PD1 (ví dụ, kháng PD1 như cemiplimab);

- Liên kết với tế bào Jurkat CD28+;
- Liên kết với tế bào PE01 EGFR+; và/hoặc
- Không gây ra sự giải phóng cytokin đáng kể (ví dụ, interferon-gamma, IL-2, IL-6, IL-8 và/hoặc IL-10) khi được dùng cho khi đuôi dài, ví dụ, ở 10 mg/kg.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng EGFR và EGFRxCD28 có khả năng làm suy yếu tế bào khối u ở đối tượng (*xem*, ví dụ, Ví dụ 3-5). Ví dụ, theo các phương án nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng EGFR và EGFRxCD28 được đề xuất, trong đó dùng một lần phân tử liên kết kháng nguyên cho đối tượng ở liều có hiệu quả trị liệu gây giảm số lượng tế bào khối u ở đối tượng.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 có khả năng liên kết với nhiều loại tế bào khối u, bao gồm tế bào ung thư hắc tố A375, tế bào tuyến tiền liệt 22RV1, tế bào buồng trứng PEO1, tế bào tụy CAPAN2, tế bào tụy SW1990 và tế bào phổi H292 (Xem Ví dụ 10A và 10B). Như vậy, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể chứng minh hữu ích trong việc điều trị vô số các chỉ định ung thư.

Sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 có khả năng tăng cường khả năng gây độc tế bào của kháng nguyên đặc hiệu kháng khối u (TSA) X kháng thể đặc hiệu kép kháng CD3 chống lại nhiều dòng tế bào (Xem Ví dụ 11). Sử dụng cách tiếp cận này, kháng thể đặc hiệu kép TSA X CD3 có thể bao gồm đặc hiệu kép kháng STEAP2 X kháng CD3, kháng PSMA X kháng CD3, hoặc kháng MUC16 X kháng CD3. Kháng thể kháng EGFR X kháng CD28 có thể còn chứng minh hữu dụng khi được kết hợp với chất ức chế điểm kiểm soát, ví dụ, kháng thể với PD-1 hoặc PD-L1, hoặc bất kỳ chất ức chế điểm kiểm soát khác (Xem Ví dụ 9). Theo các phương án nhất định, có thể có lợi khi kết hợp đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 với cả đặc hiệu kép kháng TSA X kháng CD3 cộng với chất ức chế điểm kiểm soát.

Kháng thể theo sáng chế cũng được chứng minh là liên kết với quyết định

kháng nguyên nhất định trên EGFR của người bằng cách trao đổi hydro-đoteri (Xem Ví dụ 12). Cụ thể, một số kháng thể nhất định theo sáng chế được phát hiện là liên kết với/tương tác với gốc axit amin 345-368 của EGFR của người (SEQ ID NO: 70), gốc axit amin 399-416 của EGFR của người (SEQ ID NO: 71) và gốc axit amin 133-154 của EGFR của người (SEQ ID NO: 72).

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

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

Các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định việc vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật ví dụ có thể được sử dụng để xác định quyết định kháng nguyên hoặc vùng liên kết của kháng thể hoặc vùng liên kết kháng nguyên cụ thể bao gồm, ví dụ, kỹ thuật phong bế mang đường như như được mô tả trong Antibodies, Harlow và Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), gây đột biến điểm (ví dụ, gây đột biến alanin,

gây đột quét arginin, etc.), phân tích thẩm peptit (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), bảo vệ proteaza và phân tích cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, chiết quyết định kháng nguyên và biến đổi hóa học của kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với là phương pháp trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng khối phổ. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm đánh dấu đoteri vào protein cần quan tâm, sau đó gắn kháng thể với protein đã được gắn nhãn đoteri. Tiếp theo, phức hệ protein/kháng thể được chuyển vào nước để cho phép trao đổi hydro-đoteri nhằm tiến hành loại bỏ tất cả các gốc trừ các gốc được kháng thể bảo vệ (còn lại các gốc có gắn nhãn đoteri). Sau quá trình phân ly của kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và được phân tích khối phổ, qua đó bộc lộ các gốc được đánh dấu bằng đoteri tương ứng với axit amin cụ thể có tương tác với kháng thể. Xem, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Ngoài ra, theo các phương án nhất định, protein quan tâm liên kết với kháng thể, sau đó là trao đổi hydro-đoteri. Sau quá trình phân ly của kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và được phân tích khối phổ, qua đó bộc lộ các gốc không được đánh dấu bằng đoteri tương ứng với axit amin cụ thể có tương tác với kháng thể. Phương pháp phân tích cấu trúc tinh thể bằng tia X cũng được sử dụng để nhận diện axit amin nằm trong polypeptit có tương tác với kháng thể.

Sáng chế còn bao gồm kháng CD28 và kháng thể kháng EGFR liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên giống nhau như bất kỳ trong số kháng thể ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ kháng thể bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin như nêu trong Bảng 1, 3, 6, 9A, 9B và 9C). Tương tự, sáng chế còn bao gồm kháng CD28 và/hoặc kháng thể kháng EGFR cạnh tranh liên kết với CD28 và/hoặc EGFR với bất kỳ trong số kháng thể ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ kháng thể bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin như nêu trong Bảng 1, 3, 6, 9A, 9B và 9C trong bản mô tả này).

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu CD28 của người, và mảnh liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu EGFR của người, trong đó miền liên kết

kháng nguyên thứ nhất liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên CD28 như miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu CD28 ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên EGFR như miền bất kỳ trong số các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu EGFR ví dụ cụ thể được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép tương tác với một hoặc nhiều trong số gốc axit amin 133-154 của EGFR như nêu trong SEQ ID NO: 72, hoặc gốc axit amin 345-368 của EGFR như nêu trong SEQ ID NO: 70, hoặc gốc axit amin 399-416 của EGFR như nêu trong SEQ ID NO: 71.

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

Người ta có thể dễ dàng xác định xem một phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu (ví dụ là kháng thể) hoặc vùng liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như, hoặc cạnh tranh để liên kết với, phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu của sáng chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, để xác định nếu kháng thể thử nghiệm liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên CD28 (hoặc EGFR) như một phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép đã nêu theo sáng chế, trước tiên phân tử đặc hiệu kép đã nêu được phép liên kết với protein CD28 (hoặc protein EGFR). Sau đó, khả năng của kháng thể thử nghiệm liên kết với phân tử CD28 (hoặc EGFR) được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với CD28 (hoặc EGFR) sau khi liên kết bão hòa với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm không cạnh tranh liên kết với CD28 (hoặc EGFR) với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép tham chiếu và/hoặc rằng có sự cản

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

Để xác định liệu kháng thể hoặc vùng liên kết kháng nguyên của chúng có cạnh tranh để liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu, phương pháp liên kết được mô tả ở trên được thực hiện theo hai hướng: Theo hướng thứ nhất, phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu được cho liên kết với protein CD28 (hoặc protein EGFR) trong các điều kiện bão hòa, sau đó là đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử CD28 (hoặc EGFR). Theo định hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho liên kết với phân tử CD28 (hoặc EGFR) trong điều kiện bão hòa, sau đó là đánh giá khả năng liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên đã nêu

với phân tử CD28 (hoặc EGFR). Nếu, theo cả hai hướng, chỉ phân tử liên kết kháng nguyên thứ nhất (bảo hòa) có khả năng liên kết với phân tử CD28 (hoặc EGFR), thì có thể kết luận rằng phân tử liên kết kháng nguyên thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh liên kết với CD28 (hoặc EGFR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng kháng thể cạnh tranh liên kết với protein liên kết kháng nguyên đã nêu có thể không cần liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế không gian bằng cách liên kết quyết định kháng nguyên xấp chồng hoặc liền kề.

Tạo ra vùng liên kết kháng nguyên và xây dựng phân tử đặc hiệu kép

Vùng liên kết kháng nguyên đặc hiệu với các kháng nguyên cụ thể có thể được điều chế bằng công nghệ tạo kháng thể bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Sau khi thu được, hai vùng liên kết kháng nguyên khác nhau, đặc hiệu với hai kháng nguyên khác nhau (ví dụ là CD28 và EGFR), có thể được sắp xếp một cách thích hợp với nhau để tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. sử dụng các phương pháp thông thường. (Phần thảo luận về các dạng kháng thể đặc hiệu kép ví dụ có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế được đề cập ở nơi khác trong tài liệu này). Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều thành phần riêng lẻ (ví dụ là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) của các phân tử liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu theo sáng chế có nguồn gốc từ các kháng thể khảm, nhân hóa hoặc hoàn toàn ở người. Phương pháp tạo ra các kháng thể như vậy đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này. Ví dụ, một hoặc nhiều chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được điều chế bằng công nghệ VELOCIMMUNE™. Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™ (hoặc công nghệ tạo kháng thể ở người bất kỳ khác), các kháng thể khảm có ái lực cao đối với kháng nguyên cụ thể (ví dụ là CD28 hoặc EGFR) ban đầu được phân lập có vùng biến đổi ở người và vùng cố định ở chuột. Các kháng thể được mô tả đặc điểm và lựa chọn theo các đặc điểm mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v.. Các vùng cố định ở chuột được thay thế bằng vùng cố định mong muốn ở người để tạo ra chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ hoàn toàn ở người có thể kết hợp vào phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế.

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

Tương đương sinh học

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

Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên tương đương sinh học với phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được nêu trong tài liệu này. Hai protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng tương đương về mặt được dụng hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng mà tốc độ và mức độ hấp thụ không có sự khác biệt đáng kể khi được sử dụng ở cùng một liều lượng mol dưới điều kiện thí nghiệm tương tự, cùng liều đơn hoặc đa liều. Một số kháng thể sẽ là được xem là tương đương hoặc có thể thay thế lẫn nhau về mặt được dụng nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng khác nhau về tốc

độ hấp thụ và còn có thể được xem là tương đương sinh học vì sự khác biệt về tốc độ hấp thụ là do có chủ đích và được tạo ra trong quá trình đánh dấu, không nhất thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu trong cơ thể đối với, ví dụ, sử dụng mạn tính, và được xem là không khác nhau đáng kể về mặt y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

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

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

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

Tương đương sinh học có thể xác định bằng phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Phương pháp xác định tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được xác định trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác dưới dạng hàm theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà tương ứng với và được cho là phù hợp với dữ liệu độ sinh khả dụng ở người *in vivo*; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc khác động vật có vú trong đó tác dụng dược lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định dưới dạng hàm theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng để kiểm soát mà xác định độ an toàn, hiệu lực, hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Biến thể tương đương sinh học của phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ví dụ theo sáng chế có thể được cấu thành bởi, ví dụ, việc tạo nhiều đột biến thay thế các gốc hay trình tự hoặc việc xóa các gốc ở đầu hoặc ở giữa hoặc các trình tự không cần cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, gốc cystein không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế với các axit amin khác để ngăn chặn sự hình thành cầu nối disulfua trong phân tử không cần thiết hoặc không chính

xác trong quá trình hồi tính. Trong các ngữ cảnh khác, kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép ví dụ được nêu trong bản mô tả này chứa sự thay đổi axit amin làm biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, đột biến mà ngăn ngừa hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Chọn lọc loài và khả năng phản ứng chéo loài

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

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

Liên hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, như REGN7075, REGN6321, REGN6322, REGN6323, hoặc tổ hợp bất kỳ của kháng EGFR HCVR bắt cặp với HCVR từ bất kỳ trong số kháng thể CD28 được mô tả trong bản mô tả này, liên hợp với một gốc khác, ví dụ, gốc trị liệu (“liên hợp miễn dịch”). Theo phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR hoặc EGFRxCD28, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, được liên hợp với bất kỳ trong số chất trị liệu khác nêu trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “liên hợp miễn dịch” dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, kháng thể

hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, được liên kết hóa học hoặc sinh học với một protein liên kết kháng nguyên khác, thuốc, chất phóng xạ, gốc báo cáo, enzym, peptit, protein hoặc chất trị liệu.

Theo các phương án nhất định, gốc trị liệu có thể là cytotoxin, thuốc hóa trị, thuốc ức chế miễn dịch hoặc đồng vị phóng xạ. Tác nhân gây độc tế bào bao gồm bất kỳ tác nhân nào gây hại cho tế bào. Ví dụ về chất gây độc tế bào và chất hóa trị thích hợp để tạo liên hợp miễn dịch đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, (xem ví dụ, WO 05/103081).

Dùng thuốc và điều trị

Sáng chế đề xuất phương pháp dùng protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu EGFRxCD28 theo sáng chế, ví dụ, REGN7075; REGN6321; REGN6322; REGN6323; hoặc tổ hợp bất kỳ của kháng EGFR HCVR bắt cặp với HCVR từ bất kỳ trong số kháng thể CD28 được mô tả trong bản mô tả này, hoặc được phẩm của chúng, cho đối tượng (ví dụ, con người ví dụ, mà mắc rối loạn tăng sinh), bao gồm bước đưa protein liên kết kháng nguyên hoặc được phẩm vào cơ thể của đối tượng (ví dụ, con người), ví dụ, ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, phương pháp bao gồm chọc kim của ống tiêm vào cơ thể của đối tượng và tiêm protein liên kết kháng nguyên hoặc được phẩm vào cơ thể của đối tượng, ví dụ, vào tĩnh mạch, động mạch, khối u, mô cơ hoặc mô dưới da của đối tượng.

Phương thức dùng protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR hoặc được phẩm của chúng có thể thay đổi. Đường dùng bao gồm ngoài đường tiêu hóa, không ngoài đường tiêu hóa, miệng, trực tràng, xuyên niêm mạc, ruột, ngoài đường tiêu hóa; trong cơ, dưới da, trong da, trong nội tủy, trong nội tủy mạc, trực tiếp trong não thất, tĩnh mạch, trong phúc mạc, trong mũi, trong mắt, hít, thở, khu trú, da, tròng mắt, trong thủy tinh thể, qua da hoặc trong động mạch.

Sáng chế còn đề cập đến bình (ví dụ, bình nhựa hoặc thủy tinh hoặc bơm tiêm, ví dụ, với nắp hoặc cột sắc ký, kim lỗ rỗng hoặc xi lanh tiêm) chứa protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR theo sáng chế hoặc được phẩm của chúng.

Sáng chế còn đề cập đến thiết bị tiêm bao gồm một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên) mà liên kết

đặc hiệu với EGFR hoặc EGFR và CD28 (EGFRxCD28) hoặc được phẩm của nó. Thiết bị tiêm có thể được đóng gói thành kit. Thiết bị tiêm là thiết bị đưa chất vào cơ thể của đối tượng thông qua đường ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch. Ví dụ, thiết bị tiêm có thể là ống tiêm hoặc ống tiêm tự động (ví dụ, được đổ đầy sẵn được phẩm) mà, ví dụ, bao gồm xi lanh hoặc ống giữ chất lỏng được tiêm (ví dụ, chứa kháng thể hoặc kim tiêm để chọc vào da, mạch máu hoặc mô khác để tiêm chất lỏng; và pít tông để đẩy chất lỏng ra khỏi xi lanh và qua lỗ kim và vào cơ thể của đối tượng.

Ống tiêm được làm đầy trước là ống tiêm đã được làm đầy với chế phẩm (ví dụ được phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu và chất mang được dụng) trước khi bán hoặc chuyển cho người sử dụng cuối cùng, ví dụ, bác sĩ hoặc người chăm sóc, người cho bệnh nhân/đối tượng dùng được phẩm.

Công dụng trị liệu của phân tử liên kết kháng nguyên

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh ở đối tượng, bao gồm bước dùng liều có hiệu quả trị liệu của protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 (ví dụ, REGN7075; REGN6321; REGN6322; REGN6323; hoặc tổ hợp bất kỳ của kháng EGFR HCVR bắt cặp với HCVR từ bất kỳ trong số kháng thể CD28 được mô tả trong bản mô tả này cho đối tượng; tùy ý kết hợp với PD-1 và/hoặc PD-L1 inhibitor như kháng thể (ví dụ, pembrolizumab, nivolumab và/hoặc cemiplimab) hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo phương án của sáng chế, phương pháp bao gồm bước xác định xem ung thư ở đối tượng có biểu hiện EGFR hay không. Nếu quan sát thấy có biểu hiện như vậy, thì dùng protein liên kết kháng nguyên kháng EGFRxCD28 và/hoặc EGFR. Ví dụ, theo phương án của sáng chế, phương pháp bao gồm lấy mẫu sinh thiết ung thư (ví dụ, được thực hiện bởi bác sĩ điều trị) và bước xác định xem tế bào ung thư có biểu hiện EGFR hay không hoặc hướng dẫn cá nhân hoặc thực thể khác (ví dụ, đại diện cho bệnh nhân hoặc đối tượng) thực hiện việc xác định này và, nếu có sự biểu hiện EGFR, thì cho đối tượng dùng protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR hoặc EGFRxCD28. Theo phương án của sáng chế, bác sĩ hướng dẫn một số cá nhân hoặc thực thể, ví dụ, nhà nghiên cứu bệnh học (ví dụ, đại diện cho bệnh nhân hoặc đối tượng) thực hiện sinh thiết. Theo phương án của sáng chế, sự biểu hiện EGFR được xét nghiệm bằng hóa mô miễn dịch (IHC)

hoặc bằng ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym).

Sáng chế bao gồm phương pháp bao gồm bước cho đối tượng có nhu cầu dùng phương pháp này dùng chế phẩm trị liệu chứa phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép liên kết đặc hiệu EGFR, hoặc CD28 và EGFR. Chế phẩm điều trị có thể bao gồm kháng thể hoặc phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bất kỳ theo sáng chế và chất mang hoặc chất độn được dùng.

Các kháng thể và các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế (và các chế phẩm trị liệu chứa chúng) rất hữu ích, ngoài ra, để điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ trong đó kích thích, hoạt hóa và/hoặc hướng đích đáp ứng miễn dịch theo hướng có lợi. Cụ thể, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép kháng EGFR hoặc EGFRxCD28 theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan hoặc được điều tiết bởi sự biểu hiện của EGFR hoặc hoạt tính hoặc sự tăng sinh của các tế bào EGFR+. Cơ chế hoạt động mà các phương pháp điều trị theo sáng chế đạt được bao gồm tiêu diệt các tế bào biểu hiện EGFR khi có mặt của các tế bào phản ứng kích thích, ví dụ, tế bào T. Tế bào biểu hiện EGFR có thể bị ức chế hoặc bị tiêu diệt bằng cách sử dụng các phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tế bào ung thư phổi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ động vật có vú (ví dụ, chuột cống, chuột nhắt, mèo, chó, bò, cừu, ngựa, dê, thỏ), tốt hơn là con người, ví dụ, có nhu cầu điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư biểu hiện EGFR. Đối tượng có thể mắc bệnh ung thư biểu hiện EGFR, dẫn đến phát triển các tình trạng như vậy, và/hoặc sẽ hưởng lợi từ việc ức chế hoặc giảm hoạt tính EGFR hoặc sự suy yếu tế bào EGFR+. Theo một phương án, đối tượng có thể mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh tăng sinh.

Bệnh tăng sinh, đối với mục đích trong sáng chế này, dùng để chỉ bệnh được đặc trưng bởi sự tăng trưởng tế bào bất thường, quá mức và/hoặc không kiểm soát, ví dụ, trong đó tế bào biểu hiện EGFR. Ví dụ, bệnh tăng sinh bao gồm bệnh ung thư biểu hiện EGFR. Một loạt các bệnh ung thư biểu hiện EGFR. Bệnh ung thư biểu hiện EGFR ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở bệnh ung thư biểu mô thực quản, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy phổi, bệnh ung thư tuyến phổi, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy cổ, u thần kinh đệm, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ), bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung

thư kết tràng, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư đầu cổ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư biểu mô, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư dạ dày-thực quản, (ví dụ, bệnh ung thư tuyến dạ dày-thực quản), và bệnh ung thư hắc tố. Theo đó, kháng thể và phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sử dụng trong việc điều trị một loạt các bệnh ung thư.

Bệnh ung thư được đặc trưng bởi ế bào khối u hoặc tế bào máu ung thư, có thể là bệnh ung thư biểu hiện EGFR ví dụ, trong đó sự biểu hiện EGFR ở tế bào của đối tượng cụ thể được điều trị đã được xác nhận, bao gồm bệnh ung thư biểu mô thực quản, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy phổi, bệnh ung thư tuyến phổi, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy cổ, bệnh ung thư tuyến nội mạc tử cung, bệnh ung thư biểu mô niệu mạc bàng quang, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ), bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư da (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy đầu và cổ), bệnh ung thư não (ví dụ, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư dạ dày-thực quản, (ví dụ, bệnh ung thư tuyến dạ dày-thực quản), bệnh ung thư tuyến tiền liệt và/hoặc bệnh ung thư buồng trứng.

Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể cũng được sử dụng để điều trị, ví dụ, khối u nguyên phát và/hoặc di căn từ ung thư ruột kết, phổi, vú, thận và bàng quang (hoặc từ từ ung thư bất kỳ được thảo luận trong bản mô tả này). Theo các phương án ví dụ nhất định, phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư buồng trứng.

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

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh tăng sinh, ví dụ, liên quan đến sự biểu hiện EGFR (ví dụ, bệnh ung thư phổi), bao gồm bước cho đối tượng dùng một hoặc nhiều trong số kháng EGFR, hoặc EGFRxCD28 phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép, như được mô tả trong bản

mô tả này, ví dụ, sau khi đối tượng thể hiện sự không đáp ứng với các loại liệu pháp chống ung thư khác. Ví dụ, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị bệnh tăng sinh như bệnh ung thư phổi bao gồm bước cho bệnh nhân hoặc đối tượng dùng kháng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép EGFR hoặc EGFRxCD28 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần hoặc 4 tuần, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng, 8 tháng, 1 năm, hoặc lâu hơn sau khi đối tượng tiếp nhận các phương pháp chăm sóc tiêu chuẩn cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư phổi. Theo khía cạnh khác, kháng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép EGFR hoặc EGFRxCD28 theo sáng chế bao gồm miền IgG4 Fc ban đầu được dùng cho đối tượng ở một hoặc nhiều thời điểm (ví dụ, để tạo ra sự suy yếu ban đầu tế bào ung thư bùng nổ), sau đó dùng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép tương đương chứa miền IgG khác, như miền Fc IgG1, ở các thời điểm sau đó. Có thể hình dung rằng kháng thể kháng EGFR hoặc EGFRxCD28 theo sáng chế có thể được sử dụng liên hợp với phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép, như với kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR/kháng CD3. Có thể hình dung rằng kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế sẽ được sử dụng liên hợp với chất trị liệu, ví dụ, chất hướng đích PD-1, và các đích khác. Có thể có lợi khi kết hợp hai kháng thể đặc hiệu kép hướng đích cùng một kháng nguyên khối u (ví dụ, EGFR), nhưng với một trong số đặc hiệu kéo hướng đích CD3 trên tế bào T và hướng đích đặc hiệu kép phân tử đồng kích thích như CD28. Kết hợp này có thể được sử dụng một mình để tăng cường sự tiêu diệt tế bào khối u, hoặc có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế điểm kiểm tra.

Liều “hiệu quả” hoặc “có hiệu quả trị liệu” của protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tăng sinh, như bệnh ung thư biểu hiện EGFR, là lượng protein liên kết kháng nguyên để để giảm một hoặc nhiều tín hiệu và/hoặc triệu chứng của bệnh ở đối tượng được điều trị, cho dù bằng cách gây ra sự hồi quy hoặc loại bỏ các dấu hiệu và / hoặc triệu chứng như vậy hoặc bằng cách ức chế sự tiến triển của các tín hiệu và/hoặc triệu chứng như vậy. Theo phương án của sáng chế, liều có hiệu quả trị liệu của protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR hoặc EGFRxCD28 là 0,1-2000 mg, ví dụ, 0,1 mg IV (trong tĩnh mạch) Q2W (mỗi hai tuần) đến 2000 mg IV Q2W. Lượng liều kháng thể có thể thay đổi phụ thuộc vào tuổi và thể trọng đối tượng sử dụng, bệnh đích, tình trạng bệnh lý, đường dùng thuốc và yếu

tổ tương tự. Theo các phương án nhất định, liều ban đầu có thể theo sau bởi việc dùng liều thứ hai hoặc nhiều liều sau đó protein liên kết kháng nguyên ở lượng có thể gần giống hoặc ít hơn hoặc nhiều hơn lượng của liều ban đầu, trong đó các liều sau đó được dùng cách nhau 2 tuần.

Liều phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng đối với bệnh nhân có thể thay đổi phụ thuộc vào tuổi và thể trọng của bệnh nhân, đích bệnh, tình trạng bệnh lý, đường sử dụng, và yếu tố tương tự. Liều dùng được tính ưu tiên theo trọng lượng cơ thể hoặc diện tích về mặt cơ thể. Phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Lịch trình và liều lượng hiệu quả sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép có thể được xác định dựa theo kinh nghiệm; ví dụ, sự cải thiện bệnh của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng việc đánh giá định kỳ, và có điều chỉnh liều cho phù hợp. Hơn nữa, việc xác định thang khác loài của liều lượng có thể được thực hiện bằng các phương pháp phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

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

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

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

Theo một phương án ví dụ theo sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc thứ ba được dùng từ một đến vài tuần sau khi dùng liều ngay trước đó. Thuật ngữ "liều mới sử dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là, trong trình tự của việc sử dụng nhiều liều, liều chứa phân tử liên kết kháng nguyên, mà được sử dụng cho bệnh nhân trước khi sử dụng của liều tiếp theo trong trình tự mà không có liều xen giữa.

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

Theo phương án bao gồm nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được dùng ở cùng một tần suất dùng như liều thứ hai khác. Tương tự, theo phương án bao gồm nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được dùng ở cùng một tần suất dùng như liều thứ ba khác. Theo một số phương án theo sáng chế, tần suất dùng trong đó liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi theo phác đồ điều trị. Tần suất dùng có thể còn được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sĩ, phụ thuộc vào nhu cầu của mỗi bệnh nhân sau khi được kiểm tra lâm sàng.

Sử dụng chẩn đoán

Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc xác định CD28 hoặc EGFR, hoặc tế bào biểu hiện CD28 hoặc biểu hiện EGFR trong mẫu, ví dụ, cho mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng EGFR

hoặc EGFRxCD28, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có thể được sử dụng để chuẩn đoán tình trạng bệnh lý hoặc bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện khác thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện, v.v.) của CD28 hoặc EGFR. Ví dụ về thử nghiệm chẩn đoán đối với CD28 hoặc EGFR có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân, tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, trong đó kháng thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử báo cáo. Ngoài ra, kháng thể không được đánh dấu có thể được sử dụng để chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ cấp mà được đánh dấu theo cách phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc chất báo cáo có thể phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc quang hóa như florescein isothiocyanat hoặc rhodamin; hoặc enzym như alkaline phosphatase, betagalactosidase, peroxidase cải ngựa hoặc luciferase. Ví dụ về thử nghiệm đặc hiệu mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định CD8 hoặc EGFR trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Mẫu mà có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán CD28 hoặc EGFR theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch lỏng bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân, mà chứa lượng có thể phát hiện được của protein CD28 hoặc EGFR, hoặc mảnh của nó, dưới điều kiện bệnh lý hoặc điều kiện bình thường. Nhìn chung, mức CD28 hoặc EGFR trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị ảnh hưởng do bệnh hoặc triệu chứng kết hợp với hoạt tính hoặc mức CD28 hoặc EGFR bất thường) sẽ được xác định trước để thiết lập một đường cơ sở hoặc tiêu chuẩn, của mức CD28 hoặc EGFR. Đường cơ sở của mức CD28 hoặc EGFR có thể sau đó được so sánh với mức CD28 hoặc EGFR đo được trong các mẫu thu được từ các đối tượng nghi ngờ mắc bệnh hoặc triệu chứng có liên quan đến CD28 hoặc EGFR.

Hỗn hợp và dược phẩm bào chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm EGFRxCD28 và/hoặc protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR và một hoặc nhiều thành phần; cũng như phương pháp sử dụng chúng và phương pháp sản xuất chế phẩm này. Dược phẩm (ví dụ, dược phẩm chứa nước bao gồm nước) chứa protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR theo sáng chế và chất mang hoặc tá dược được dùng là một phần

của sáng chế.

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

Để điều chế dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28, ví dụ, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó (ví dụ, REGN7075; REGN6321; REGN6322; REGN6323; hoặc tổ hợp bất kỳ của kháng EGFR HCVR bất cặp với HCVR từ bất kỳ trong số kháng thể CD28 được mô tả trong bản mô tả này, protein liên kết kháng nguyên được trộn với chất mang hoặc tá dược dược dụng. Xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984); Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: Science và Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, và Wilkins, New York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. Theo phương án của sáng chế, dược phẩm vô trùng. Các dược phẩm này là một phần của sáng chế.

Dược phẩm theo sáng chế chứa protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR và chất mang dược dụng bao gồm, ví dụ, nước, chất đệm, chất bảo quản và/hoặc chất tẩy.

Phạm vi của sáng chế bao gồm chế phẩm được làm khô, ví dụ, đông khô, chứa protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm của nó mà chứa chất mang được dụng nhưng về cơ bản thiếu nước.

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

Như được thảo luận trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất bình (ví dụ, bình nhựa hoặc thủy tinh) hoặc thiết bị tiêm (ví dụ, ống tiêm, ống tiêm được làm đầy trước hoặc ống tiêm tự động) chứa bất kỳ trong số protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR trong bản mô tả này, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm chứa chất mang hoặc tá được dụng của nó.

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

Các bút tái sử dụng lại và dùng một lần và thiết bị phân phối tự tiêm có thể

được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Xem, ví dụ, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK) hoặc HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL)

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

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

Tốt hơn là, dược phẩm để sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả trên đây được điều chế ở dạng liều ở liều đơn vị được làm thích hợp cho liều chứa thành phần hoạt tính. Dạng liều này ở dạng liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên thuốc, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v. lượng kháng thể trên đây có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2000 mg mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng tiêm.

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

Chất trị liệu bổ sung ví dụ mà có thể được kết hợp với hoặc dùng kết hợp với phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm, ví dụ, hóa trị (ví dụ, hóa trị chống ung thư, ví dụ, paclitaxel, docetaxel, vincristin, cisplatin, carboplatin hoặc oxaliplatin), xạ trị, chất ức chế điểm kiểm soát hướng đích PD-1 (ví dụ, kháng thể kháng PD-1 như pembrolizumab, nivolumab, hoặc cemiplimab (xem US9,987,500)), CTLA-4, LAG3, TIM3, và các chất khác, kháng thể hóa trị hai chủ vận đồng kích thích hướng đích phân tử như GITR, OX40, 4-1BB, và các chất khác), kháng thể CD28 đặc hiệu kép và đa đặc hiệu đồng kích thích khác (ví dụ, đặc hiệu kép) kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết kháng nguyên liên quan đến khối u (ví dụ, MUC16 (mucin 16), PSMA, hoặc STEAP2) và, ví dụ, CD3 (MUC16xCD3, PSMAxCD3, hoặc STEAP2xCD3). Kháng thể đặc hiệu kép ví dụ bao gồm miền liên kết kháng nguyên mà liên kết CD3 bao gồm, nhưng không giới hạn ở các miền được mô tả trong, ví dụ, WO2017/053856A1, WO2014/047231A1, WO2018/067331A1 và WO2018/058001A1. EGFR được biểu hiện ở một loạt bệnh ung thư. Theo đó, kháng thể EGFRxCD28 đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một loại các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền liên kết kháng nguyên mà liên kết CD3 trong điều trị nhiều loại bệnh ung thư.

Theo các phương án khác của sáng chế, chất trị liệu khác được dùng cho đối tượng kết hợp với protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 và/hoặc kháng EGFR, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được dùng cho đối tượng cuốn the Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (Nov. 1, 2002)) hoặc thông tin kê đơn được phê duyệt thường được cung cấp với các chất cụ thể.

Phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư biểu hiện EGFR ở đối tượng có nhu cầu điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách dùng lượng liều có hiệu quả trị liệu của EGFRxCD28 và/hoặc protein liên kết kháng nguyên kháng EGFR, kết hợp với chất trị liệu khác là một phần của sáng chế.

Thuật ngữ "kết hợp với" chỉ các thành phần, protein liên kết kháng nguyên EGFRxCD28 hoặc kháng EGFR, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, cùng với chất trị liệu khác, như cemiplimab, có thể được bào chế thành một chế phẩm đơn lẻ, ví dụ, để phân phối cùng một lúc, hoặc được bào chế riêng biệt thành hai hoặc nhiều chế phẩm (ví dụ, kit bao gồm hai thành phần). Các

thành phần được dùng kết hợp với các thành phần khác có thể được dùng cho đối tượng ở thời điểm khác thời điểm dùng thành phần khác; ví dụ, mỗi lần dùng có thể là dùng không đồng thời (ví dụ, riêng biệt hoặc theo thứ tự) tại các khoảng thời gian trong khoảng thời gian nhất định như một phần của phác đồ điều trị. Các thành phần riêng biệt được dùng kết hợp với nhau cũng có thể được dùng theo thứ tự, mặc dù về cơ bản là đồng thời, trong cùng một phiên dùng. Hơn nữa, các thành phần riêng biệt được dùng kết hợp với nhau có thể được dùng cho đối tượng theo cùng một đường dùng hoặc theo một đường dùng khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được trình bày để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thực hiện với công bố đầy đủ và bản mô tả cách để sản xuất và sử dụng phương pháp và được phẩm theo sáng chế, và không có mục đích giới hạn phạm vi các tác giả sáng chế quan tâm trong sáng chế này.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể kháng EGFRxCD28

Tạo ra kháng thể kháng EGFR

Kháng thể kháng EGFR được thu bằng cách dùng trực tiếp dòng tế bào biểu hiện EGFR (A431) với chất hỗ trợ để kích thích phản ứng miễn dịch, đối với chuột VELOCIMMUNE® bao gồm ADN mã hóa chuỗi nặng globulin miễn dịch của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ phổ quát. Nghĩa là, các kháng thể được tạo ra ở chuột này có các vùng biến đổi chuỗi nặng khác nhau nhưng về cơ bản là các vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống hệt nhau.

Đáp ứng miễn dịch của kháng thể được quan sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu EGFR. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, kháng thể kháng EGFR được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính kháng nguyên mà không dung hợp với tế bào tủy, như được mô tả trong US 7,582,298.

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

Bảng 1: Mã nhận dạng trình tự axit amin đối với kháng thể đơn dòng (mAb)

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

**Bảng 3: Mã nhận dạng trình tự axit amin đối với
Kháng thể đơn dòng (mAb) CD28 mẹ**

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226	10	12	6	14	16	18	20	22
mAb14193	59	60	61	62	16	18	20	22
mAb14216	63	64	65	66	16	18	20	22

Bảng 4: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic đối với kháng thể CD28 mẹ

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14226	9	11	5	13	15	17	19	21
mAb14193					15	17	19	21
mAb14216					15	17	19	21

Tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (bsAs) liên kết CD28 và EGFR

Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền liên kết đặc hiệu kháng EGFR và miền liên kết đặc hiệu kháng CD28 được xây dựng bằng cách sử dụng các phương pháp luận tiêu chuẩn, trong đó mỗi miền liên kết kháng nguyên kháng EGFR và miền liên kết kháng nguyên kháng CD28 bao gồm các HCVR khác nhau, riêng biệt được bắt cặp với LCVR chung. Trong một số ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép được xây dựng để dùng chuỗi nặng từ kháng thể kháng CD28, chuỗi nặng từ kháng thể kháng EGFR và chuỗi nhẹ chung bao gồm các thành phần, trình tự axit amin và axit nucleic mã hóa kháng thể như được trình bày dưới đây ở bảng 5, 6, 7 và 8. Kháng thể đặc hiệu kép khác mà liên kết với EGFR và CD28 có thể được tạo ra bằng các kháng thể mẹ đơn dòng có ký hiệu được trình bày ở bảng 9A, 9B và 9C.

EGFR mẹ

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb12999P2	2	4	6	8	16	18	20	22
mAb13008P2	30	32	34	36	16	18	20	22
mAb35193P2	40	42	44	46	16	18	20	22
mAb13006P2	50	52	54	56	16	18	20	22

**Bảng 2: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic đối với
Kháng thể đơn dòng (mAb) EGFR mẹ**

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb12999P2	1	3	5	7	15	17	19	21
mAb13008P2	29	31	33	35	15	17	19	21
mAb35193P2	39	41	43	45	15	17	19	21
mAb13006P2	49	51	53	55	15	17	19	21

Tạo ra kháng thể kháng CD28

Kháng thể kháng CD28 được thu bằng cách gây miễn dịch ở chuột VELOCIMMUNE® (*tức là*, chuột được thiết kế chứa ADN mã hóa vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ phổ quát globulin miễn dịch của người) với protein CD2 của người được dung hợp với phần Fc của IgG2a của chuột, hoặc với tế bào biểu hiện CD28 hoặc với ADN mã hóa CD28.

Đáp ứng miễn dịch của kháng thể được quan sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu CD28. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, kháng thể kháng CD28 được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính kháng nguyên, như được mô tả trong US7,582,298.

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

**Bảng 5: Tóm tắt các ký hiệu kháng thể cho nhánh HCVR của
Kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR x kháng CD28**

Ký hiệu kháng thể đặc hiệu kép	Miền liên kết kháng nguyên kháng EGFR (ký hiệu kháng thể mẹ)	Miền liên kết kháng nguyên kháng CD28 (ký hiệu kháng thể mẹ)
bsAb7075 (còn được đề cập là REGN7075 hoặc H4sH24623D)	mAb12999P2	mAb14226
bsAb6321 (còn được đề cập là REGN6321)	mAb13008P2	mAb14226
bsAb6322 (còn được đề cập là REGN6322)	mAb35193P2	mAb14226
bsAb6323 (còn được đề cập là REGN6323)	mAb13006P2	mAb14226

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

Ký hiệu kháng thể đặc hiệu kép	Kháng-EGFR Vùng liên kết kháng nguyên				Kháng CD28 Vùng liên kết kháng nguyên				Vùng biến đổi chuỗi nhẹ chung			
	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LC VR	LCD R1	LCD R2	LCD R3
bsAb7075	2	4	6	8	10	12	6	14	16	18	20	22
bsAb6321	30	32	34	36	10	12	6	14	16	18	20	22
bsAb6322	40	42	44	46	10	12	6	14	16	18	20	22
bsAb6323	50	52	54	56	10	12	6	14	16	18	20	22

Bảng 7: Trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR x

kháng CD28

Ký hiệu kháng thể đặc hiệu kép	Kháng-EGFR Vùng liên kết kháng nguyên				Kháng CD28 Vùng liên kết kháng nguyên				Vùng biến đổi chuỗi nhẹ chung			
	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LC VR	LCD R1	LCD R2	LCD R3
bsAb7075	1	3	5	7	9	11	5	13	15	17	19	21
bsAb6321	29	31	33	35	9	11	5	13	15	17	19	21
bsAb6322	39	41	43	45	9	11	5	13	15	17	19	21
bsAb6323	49	51	53	55	9	11	5	13	15	17	19	21

Bảng 8. Trình tự axit amin và nucleotit cho chuỗi globulin miễn dịch có độ dài đầy đủ của kháng thể đặc hiệu kép bsAb7075, bsAb6321, bsAb6322 và bsAb6323

	<u>HC (EGFR)</u>		<u>HC (CD28)</u>		<u>LC (EGFR & CD28)</u>	
Ký hiệu kháng thể đặc hiệu kép	D	P	D	P	D	P
bsAb7075	23	24	25	26	27	28
bsAb6321	37	38	25	26	27	28
bsAb6322	47	48	25	26	27	28
bsAb6323	57	58	25	26	27	28

D=Trình tự nucleotit của ADN mã hóa trình tự được nêu

P=axit amin của polypeptit cho trình tự được nêu

Các số dùng để chỉ SEQ ID NO cho trình tự được nêu

HC là chuỗi nặng có độ dài đầy đủ cho kháng thể được nêu

LC là chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ cho kháng thể được nêu

Kháng thể đặc hiệu kép khác bao gồm một HCVR từ kháng thể EGFR mẹ và nhánh HCVR khác từ kháng thể CD28 mẹ có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể EGFR mẹ được sử dụng để tạo ra kháng

thể kháng EGFR X kháng CD28 đặc hiệu kép này có trình tự HCVR được mô tả trong WO2014/004427. Kháng thể mẹ CD28 được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng EGFR X kháng CD28 đặc hiệu kép khác này có trình tự axit amin được mô tả ở trên ở Bảng 3. Miền liên kết kháng EGFR và kháng CD28 (cặp) được trình bày ở bảng 9A, 9B và 9C.

**Bảng 9A: Tóm tắt các ký hiệu kháng thể mẹ cho nhánh HCVR của
Kháng thể đặc hiệu kép khác kháng EGFR x kháng CD28**

Kháng-EGFR Vùng liên kết kháng nguyên (Ký hiệu kháng thể mẹ và trình tự được tìm thấy trong WO2014/004427)	Kháng CD28 Vùng liên kết kháng nguyên (Ký hiệu kháng thể mẹ và trình tự được tìm thấy trong bản mô tả này ở Bảng 3)
mAb085N	mAb14226
mAb086N	mAb14226
mAb136P	mAb14226
mAb141P	mAb14226
mAb142P	mAb14226
mAb143P	mAb14226
mAb144P	mAb14226
mAb145P	mAb14226
mAb147P	mAb14226
mAb151P	mAb14226
mAb153P	mAb14226
mAb155P	mAb14226
mAb157P	mAb14226
mAb158P	mAb14226
mAb159P	mAb14226
mAb161P	mAb14226
mAb163P	mAb14226
mAb169P	mAb14226
mAb171P	mAb14226

**Bảng 9B: Tóm tắt các ký hiệu kháng thể mẹ cho nhánh HCVR của
Kháng thể đặc hiệu kép khác kháng EGFR x kháng CD28**

Kháng-EGFR Vùng liên kết kháng nguyên (Ký hiệu kháng thể mẹ và trình tự được tìm thấy trong WO2014/004427)	Kháng CD28 Vùng liên kết kháng nguyên (Ký hiệu kháng thể mẹ và trình tự được tìm thấy trong bản mô tả này ở Bảng 3)
mAb085N	mAb14193
mAb086N	mAb14193
mAb136P	mAb14193
mAb141P	mAb14193
mAb142P	mAb14193
mAb143P	mAb14193
mAb144P	mAb14193
mAb145P	mAb14193
mAb147P	mAb14193
mAb151P	mAb14193
mAb153P	mAb14193
mAb155P	mAb14193
mAb157P	mAb14193
mAb158P	mAb14193
mAb159P	mAb14193
mAb161P	mAb14193
mAb163P	mAb14193
mAb169P	mAb14193
mAb171P	mAb14226

**Bảng 9C: Tóm tắt các ký hiệu kháng thể mẹ cho nhánh HCVR của
Kháng thể đặc hiệu kép khác kháng EGFR x kháng CD28**

Kháng-EGFR Vùng liên kết kháng nguyên (Ký hiệu kháng thể mẹ và trình tự được tìm thấy trong WO2014/004427)	Kháng CD28 Vùng liên kết kháng nguyên (Ký hiệu kháng thể mẹ và trình tự được tìm thấy trong bản mô tả này ở Bảng 3)
mAb085N	mAb14216
mAb086N	mAb14216
mAb136P	mAb14216
mAb141P	mAb14216
mAb142P	mAb14216
mAb143P	mAb14216
mAb144P	mAb14216
mAb145P	mAb14216
mAb147P	mAb14216
mAb151P	mAb14216
mAb153P	mAb14216
mAb155P	mAb14216
mAb157P	mAb14216
mAb158P	mAb14216
mAb159P	mAb14216
mAb161P	mAb14216
mAb163P	mAb14216
mAb169P	mAb14216
mAb171P	mAb14216

Kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trong các ví dụ sau đây bao gồm nhánh liên kết đã biết là liên kết với protein hCD28 dime khác loại có thể hòa tan của người; và EGFR của người (xem dữ liệu liên kết Biacore dưới đây). Kháng thể đặc hiệu kép ví dụ được sản xuất có miền IgG4 Fc được biến đổi (thể khảm) như nêu trong công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số US20140243504A1, được công bố vào ngày 28/08/2014.

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra theo phần Ví dụ này chứa hai miền liên kết kháng nguyên riêng biệt (*tức là*, nhánh liên kết). Miền liên kết kháng nguyên thứ

nhất chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể kháng CD28 ("CD28-VH"), và miền liên kết kháng nguyên thứ hai chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có nguồn gốc từ kháng thể kháng EGFR ("EGFR- VH"). Cả kháng thể kháng EGFR và kháng thể kháng CD28 đều có chung chuỗi nhẹ. Việc bắt cặp CD28-VH/EGFR-VH tạo ra miền liên kết kháng nguyên nhận diện đặc hiệu CD28 trên tế bào T và EGFR trên tế bào khối u.

Xác định đặc tính kháng thể đặc hiệu kép liên kết CD28 và EGFR

Phương pháp động lực SPR: Các thông số liên kết động học được xác định thông qua cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng thiết bị T-200 và cảm biến CM5 (GE Healthcare). Các biểu đồ cảm biến được tham chiếu kép phù hợp toàn cầu với mô hình liên kết 1:1 sử dụng Scrubber (BioLogics Software). Hằng số tốc độ phân ly (k_d) được xác định bằng cách khớp với sự thay đổi của phản ứng liên kết trong giai đoạn phân ly, và hằng số tốc độ kết hợp (k_a) được xác định bằng cách khớp với liên kết chất phân tích ở các nồng độ khác nhau. K_D được tính toán từ tỷ lệ của k_d và k_a . Thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) được tính bằng $\ln 2/k_d$ và chuyển đổi sang phút.

Phương pháp đặc hiệu EGFR: Ab đơn dòng kháng hFc (REGN2567) được ghép cặp với bề mặt cảm biến CM5 bằng cách sử dụng hóa học ghép cặp EDC/NHS truyền thống. 200 – 250 RU của EGFRxCD28 Ab được bắt trên bề mặt này. Một loạt pha loãng sáu điểm, gấp ba lần hEGFR.mmmH bắt đầu ở 30nM được tiêm trên bề mặt này với tốc độ dòng 50uL/phút trong 5 phút. Bề mặt được tái tạo với xung 10 giây của 20mM H₃PO₄. Sự phân ly được đo trong 10 phút. Các biểu đồ cảm biến đã được xử lý và khớp như mô tả ở trên.

Đặc hiệu phương pháp bắt CD28: Ab (GE) đa dòng kháng mFc đã được ghép nối với bề mặt cảm biến CM5 bằng cách sử dụng hóa học ghép EDC/NHS truyền thống. ~ 30RU của hCD28.mFc được bắt trên bề mặt này. Một loạt pha loãng sáu điểm, gấp ba lần EGFRxCD28 bắt đầu ở 90nM được tiêm trên bề mặt này với tốc độ dòng 50uL/phút trong 4 phút. Sự phân ly được đo trong 5 phút. Bề mặt được tái tạo bằng cách tiêm 10mM glyxin trong 40 giây, pH 1,5. Các biểu đồ cảm biến đã được xử lý và khớp như mô tả ở trên.

Phân tích Biacore cho thấy rằng EGFRxCD28 liên kết hEGFR với K_D là ~9,3E-10 và hCD28 với K_D là ~5,2E-08 (Bảng 10 và 11).

Bảng 10: Động lực liên kết với EGFR Biacore

Biacore 37°C liên kết với EGFR-mmh của người						
AbPID	Bắt mAB (RU)	Liên kết 30nM hEGFR.mmh (RU)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t _{1/2} (phút)
REGN7075	245,6 ± 0,7	72,67	4,41E+05	4,12E-04	9,33E-10	4,24
Biacore 25°C liên kết với EGFR-mmh của người						
REGN7075	209,6 ± 0,8	55,45	1,54E+05	4,33E-04	2,80E-09	26,69

Bảng 11: Động lực liên kết với CD28 Biacore

Biacore 37°C liên kết với CD28-mmh của người						
AbPID	Bắt hCD28.mFc (RU)	Liên kết 90 nM mAb (RU)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t _{1/2} (phút)
REGN7075	39,8 ± 0,2	25,0	2,54E+05	1,31E-02	5,17E-08	0,9
Biacore 25°C liên kết với CD28-mmh của người						
REGN7075	32,6 ± 0,2	27,1	2,94E+05	3,14E-03	1,07E-08	3,7

Tiếp theo, sử dụng đồng nuôi cấy tế bào T của người có chứa tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và PEO-1, khả năng gây độc tế bào và hoạt hóa tế bào T của EGFRxCD28 đã được thử nghiệm. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC) được phân lập từ bao bạch cầu của vật cho khỏe mạnh. Phân lập PBMC được thực hiện bằng cách quay ly tâm gradien sử dụng ống SepMate™ 50 mL theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Tóm lại, 15 mL của FicollPaque PLUS được tạo lớp vào ống SepMate 50 mL, sau đó thêm 30 mL bạch cầu được pha loãng theo tỷ lệ 1:2 với D- FBS. Bước tiếp theo được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất SepMate. Tế bào T CD3⁺ được phân lập từ PBMC sử dụng kit phân lập tế bào T của người từ StemCell Technologies và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào T CD3⁺ được đông lạnh trong FBS chứa 10% DMSO ở nồng độ là 50×10^6 tế bào trên bình.

EGFRxCD28 làm tăng đáng kể khả năng của MUC16xCD3 (dữ liệu không được thể hiện) để gây ra sự tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u, từ 18,8% đến 71,5% (Fig. 1C). Phù hợp với việc tăng cường độc tính tế bào T này, EGFRxCD28 cũng

tăng cường hoạt hóa tế bào T được đánh giá bằng sự biểu hiện CD25 và giải phóng IFN γ cytokin (Hình 1D và 1E). (Fig. 1D và 1E). Đáng chú ý, EGFR $\times$ CD28 với sự hiện diện của kiểm soát liên kết CD3 không nhắm mục tiêu (không có “tín hiệu 1”) không có tác dụng lên độc tính hoặc hoạt hóa tế bào T (Fig. 1C-1E).

Ví dụ 2: Sự biểu hiện quá mức của phối tử CD28 tự nhiên trên tế bào khối u kết hợp với điều trị PD-1 mAb để tạo ra khả năng miễn dịch chống khối u bền vững phụ thuộc vào tế bào T CD8 *in vivo*

Để xác định xem sự tham gia của CD28 bằng (các) phối tử tự nhiên của nó có thể tăng cường hiệu quả chống khối u của PD-1 mAb *in vivo* hay không, các tế bào khối u MC38 đã được thiết kế để biểu hiện quá mức CD86, một trong những phối tử đồng kích thích cho CD28. Cụ thể, để tạo ra dòng tế bào khối u được thiết kế để biểu hiện các phối tử đồng kích thích, plasmid pLVX với vùng khởi động EF1a mã hóa CD86 của chuột hoặc vector trống và gen kháng puromyxin (pLVX.EF1a.CD86-puro và pLVX.EF1a.EV-puro, tương ứng) được sử dụng để lây nhiễm tế bào HEK293T, tạo điều kiện thuận lợi cho việc sản xuất các hạt virus, sau đó được sử dụng để lây nhiễm MC38 (National Cancer Institute, Laboratory of Tumor Immunology & Biology). Dòng tế bào biểu hiện CD86 thiết kế được phân lập bằng cách phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Tế bào được duy trì trong các điều kiện do ATCC khuyến nghị với sự có mặt của Puromyxin 0,5 μ g/ml. Dòng tế bào thu được được là MC38/CD86 và MC38/EV được thiết kế.

Sự kết hợp của tế bào MC38/CD86 và điều trị kháng PD-1 mAb đã ức chế đáng kể sự phát triển của khối u (Fig. 2A), dẫn đến sự thoái lui hoàn toàn của khối u liên quan đến lợi ích sống sót mạnh mẽ (Fig. 2B) khi so sánh với tế bào MC38 đối chứng âm được chuyển nạp với đối chứng vector trống (MC38/EV). Sự suy yếu của tế bào T CD8⁺ trong quá trình điều trị đã hoàn toàn loại bỏ hiệu quả chống khối u được tạo ra bằng cách kết hợp liệu pháp kháng PD-1 mAb với tế bào MC38/CD86 chứng tỏ sự phụ thuộc vào tế bào T CD8⁺ (Fig. 2C). Đáng chú ý, các con chuột không có khối u ban đầu được cấy các tế bào MC38/CD86 và được điều trị bằng mAb kháng PD-1 đã loại bỏ khối u mẹ MC38 thứ hai được cấy hơn 60 ngày sau khi cấy khối u chính, cho thấy sự hiện diện của đáp ứng bộ nhớ tế bào T (Fig. 2D). Do đó, các dữ liệu này chứng minh rằng tác dụng hợp lực của sự biểu hiện cấu thành của phối tử

CD28 và liệu pháp kháng PD-1 có thể dẫn đến miễn dịch bền vững chống lại khối u phụ thuộc CD8 *in vivo*.

Ví dụ 3: Sử dụng các kháng thể EGFRxCD28 kết hợp với kháng thể kháng PD-1 hợp lực kiểm soát và tiêu diệt khối u ghép ngoại lai của người ở chuột, V_H được ghép với tế bào gốc CD34⁺ của người.

Độ hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 kết hợp với Ab phong bế PD-1 (REGN2810 (cemiplimab), E. Burova *et al.*, Characterization of the Anti-PD-1 Antibody REGN2810 and Its Antitumor Activity in Human PD-1 Knock-In Mice. *Mol Cancer Ther* 16, 861-870 (2017)) được thử nghiệm bằng cách sử dụng mô hình ghép ngoại lai khối u của người. Sự kết hợp của quần thể tế bào miễn dịch của con người đã được xác nhận bởi FACS (Fig. 3A). Tế bào khối u ung thư biểu mô dạng biểu bì A431 (thu được từ ATCC) được cấy ghép dưới da ở SIRPA^{h/h} TPO^{h/m} Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-} mà được ghép với tế bào gan thai CD34⁺. Chuột được phân thành 4 nhóm dựa trên người hiến gan bào thai, tần suất hình thành tế bào miễn dịch của con người và giới tính. Chuột được dùng liều bằng cách tiêm trong phúc mạc 2 lần mỗi tuần bắt đầu từ ngày cấy ghép (ngày 0) có đối chứng tương đương, 5 mg/kg EGFRxCD28, 10 mg/kg PD-1 hoặc kết hợp. Sau đó, (các) lần tiêm kháng thể được thực hiện cứ 2-3 ngày một lần trong quá trình thử nghiệm. Khối u được đo hai chiều (dài x rộng) và thể tích khối u được tính (dài x rộng² x 0,5). Chuột được gây chết nhân đạo khi khối u đạt đến điểm cuối của khối u được chỉ định (thể tích khối u > hoặc phân loét khối u).

Sự biểu hiện của EGFR và PD-L1 trên tế bào khối u A431 được xác nhận bằng FACS (Fig. 3B). Mỗi nhóm được điều trị trong phúc mạc (IP) bắt đầu vào ngày thử thách khối u với:

- (1) 10 mg/kg đối chứng tương đương của người số 1 + 5 mg/kg đối chứng tương đương của người số 2
- (2) 10 mg/kg kháng PD-1 của người (REGN2810; cemiplimab) + 5 mg/kg đối chứng tương đương của người số 2
- (3) 5 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075) + 10 mg/kg đối chứng tương đương của người số 1 hoặc
- (4) 5 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075) + 10 mg/kg kháng PD-1 của người

(REGN2810). Sau đó, (các) lần tiêm kháng thể được thực hiện cứ 2 lần một tuần trong quá trình thử nghiệm. Khối u được đo hai chiều (dài x rộng) và thể tích khối u được tính ($\text{dài} \times \text{rộng}^2 \times 0,5$). Chuột được gây chết nhân đạo khi khối u đạt đến điểm cuối của khối u được chỉ định (thể tích khối u > hoặc phần loét khối u).

Đối chứng tương đương số 1 và đối chứng tương đương 2 kháng thể đối chứng âm liên kết Fel d1.

Kích thước của các kích thước khối u A431 theo thời gian trong mỗi nhóm điều trị được nêu trong Fig. 4. EGFRxCD28 kết hợp với kháng PD-1 kiểm soát hợp lực và tiêu diệt khối u ghép ngoại lai của người ở chuột được nhân hóa. Liệu pháp đơn EGFRxCD28 có thể trì hoãn đáng kể sự phát triển của khối u và kết hợp với Ab kháng PD-1 đã ức chế thêm sự tiến triển của khối u. Khi PSMAxCD28 Ab đối chứng được sử dụng trong cùng một thiết lập điều trị, việc ức chế sự phát triển của khối u có hoặc không có điều trị kháng PD1 không được quan sát thấy (Fig. 5). Sự thiếu biểu hiện PSMA trên tế bào khối u A431 được xác nhận bằng FACS (Fig. 6).

Các dữ liệu này chứng minh rằng liệu pháp đơn trị liệu kháng PD1 gây ra đáp ứng chống khối u hạn chế và đơn trị liệu kháng EGFR gây ra đáp ứng chống khối u một phần trong khi liệu pháp kết hợp thể hiện đáp ứng miễn dịch chống khối u mạnh mẽ, nhanh chóng.

Ví dụ 4: Việc dùng kháng thể EGFRxCD28 làm đối chứng đơn trị liệu và tiêu diệt khối u ghép ngoại lai A431 của người ở chuột NSG được ghép với tế bào PBMC của người.

Tế bào khối u ung thư biểu mô dạng biểu bì A431 (thu được từ ATCC) được trộn với PBMC của người và được cấy dưới da ở chuột NSG (NOD/SCID/ γ_c^{null}). Chuột được điều trị theo quy trình phòng ngừa (điều trị vào ngày 0, 3, 7) hoặc trị liệu (ngày 3, 7, 10).

Đối với quy trình điều trị phòng ngừa, chuột được chia thành 4 nhóm điều trị. Mỗi nhóm được điều trị trong phúc mạc (UP) với:

- (1) 5 mg/kg Ab đối chứng EGRvIIIxCD3 (bs17664D)
- (2) 5 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075)
- (3) 0,5 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075)
- (4) 0,05 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075).

Đối với quy trình trị liệu, chuột được phân thành 3 nhóm điều trị. Mỗi nhóm được điều trị với:

- (1) 5 mg/kg Ab đối chứng EGRvIIIxCD3 (bs17664D)
- (2) 5 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075)
- (3) 0,05 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075).

Khối u được đo hai chiều (dài x rộng) và thể tích khối u được tính (dài x rộng² x 0,5). Chuột được gây chết nhân đạo khi khối u đạt đến điểm cuối của khối u được chỉ định (thể tích khối u > hoặc phần loét khối u).

Kích thước khối u trung bình ở chuột được điều trị trong mỗi nhóm điều trị được tóm tắt trong Fig. 7A và 7B. Các dữ liệu này đã chứng minh rằng ở thiết lập phòng ngừa, phản ứng chống khối u mạnh mẽ được quan sát thấy ở cả ba liều thử nghiệm trong khi đáp ứng ít hơn hoàn toàn ở thiết lập trị liệu.

Ví dụ 5: Việc dùng kháng thể EGFRxCD28 làm đối chứng đơn trị liệu và tiêu diệt khối u ghép ngoại lai A549 của người ở chuột NSG được ghép với tế bào PBMC của người.

Tế bào khối u ung thư tuyến phổi A549 (thu được từ ATCC) được cấy dưới da ở chuột NSG (NOD/SCID/ γ_c^{null}) vào ngày 0. PBMC của người được ghép vào ngày thứ 3 trong phúc mạc. Chuột được chia thành 4 nhóm điều trị. Mỗi nhóm được điều trị trong phúc mạc (UP) với:

- (1) 10 mg/kg Ab đối chứng EGRvIIIxCD3 (bs17664D)
- (2) 1 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075)
- (3) 10 mg/kg EGFRxCD28 (REGN7075).

Điều trị Ab được dùng vào ngày 15, 22 và 29. Khối u được đo hai chiều (dài x rộng) và thể tích khối u được tính (dài x rộng² x 0,5). Chuột được gây chết nhân đạo khi khối u đạt đến điểm cuối của khối u được chỉ định (thể tích khối u > 2000mm³ hoặc phần loét khối u).

Kích thước khối u trung bình ở chuột được điều trị trong mỗi nhóm điều trị được tóm tắt ở Fig. 8. Phản ứng chống khối u phụ thuộc vào liều lượng đáng kể đã được quan sát trong thiết lập trị liệu với khối u đã hình thành.

Ví dụ 6: Kháng thể đặc hiệu kép đồng kích thích EGFRxCD28 liên kết với tế

bào CD28⁺ và EGFR⁺.

Phân tích đếm tế bào dòng chảy được sử dụng để xác định liên kết của EGFRxCD28 (REGN6323) với tế bào Jurkat (tế bào CD28⁺) và với tế bào PEO1 (tế bào EGFR⁺). Sự liên kết của kháng thể với mỗi loại tế bào được quan sát. Xem Fig. 1A và 1B.

Dòng tế bào biểu hiện nội sinh EGFR (PEO1, EGFR⁺) được gắn nhãn 1 μ M chất theo dấu tế bào tím và được để qua đêm ở 37°C. Riêng biệt, PBMC của người (TNew York Blood Center) hoặc PBMC của khỉ đuôi dài (Covance, Cranford NJ) được để trong môi trường RPMI bổ sung ở 1×10^6 tế bào/mL và ủ qua đêm ở 37°C để làm giàu tế bào lympho bằng cách làm cạn kiệt các đại thực bào bám dính, đuôi gai tế bào và một số bạch cầu đơn nhân. Ngày hôm sau, tế bào đích được đồng ủ với PBMC của người chưa từng bị suy yếu tế bào bám dính (tỷ lệ tế bào tác động/đích là 4:1) và pha loãng liên tiếp đặc hiệu kép TSAxCD3 hoặc đặc hiệu kép trên cơ sở CD3 không hướng đích, đơn lẻ hoặc kết hợp với nồng độ cố định (2,5 μ g/ml) của đặc hiệu kép TSAxCD28 trong 96 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, các tế bào được lấy ra khỏi đĩa nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng đệm phân ly tế bào không chứa enzym và được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (FACS).

Đối với phân tích FACS, tế bào được nhuộm bằng chất theo dấu tế bào hồng cầu xa khả năng tồn tại (Invitrogen) và kháng thể liên hợp trực tiếp với CD2, CD4, CD8 và CD25 (BD). Mẫu được chạy với các đầu hiệu chuẩn để đếm tế bào. Để đánh giá tính đặc hiệu của việc tiêu diệt, tế bào đích được đánh giá là quần thể dương tính với chất theo dõi tế bào tím. Phần trăm tế bào đích sống được tính như sau: % tế bào sống = $(R1/R2) \times 100$, trong đó R1 = % tế bào đích sống khi có kháng thể và R2 = % tế bào đích sống nếu không có kháng thể thử nghiệm. Sự hoạt hóa tế bào T được xác định bởi phần trăm của tế bào T (CD25⁺) được hoạt hóa trong số tế bào TCD2⁺/CD4⁺ hoặc CD2⁺/CD8⁺. Số lượng tế bào T được xác định bằng cách tính toán số lượng của tế bào CD4⁺ hoặc CD8⁺ sống trên đầu hiệu chuẩn.

Hàm lượng cytokin tích lũy trong môi trường được phân tích bằng cách sử dụng kit Cytokin Th1/Th2/Th17 của BD cytometric Bead Array (CBA) ở người, theo quy trình của nhà sản xuất.

Ví dụ 7: Phân tích cụm tế bào T trong khối u

Để kiểm tra xem liệu việc điều trị có tác động đáng kể đến việc kích hoạt tế bào T của người trong mô hình ghép ngoại lai khối u A431 hay không, tế bào T trong khối u đã được xác định đặc tính. CITRUS (định danh cụm, xác định đặc tính, và hồi quy), phương pháp phân tầng độc lập các cụm tế bào T khác nhau có ý nghĩa thống kê, được sử dụng để xác định các cụm tế bào T CD8+/CD4+ của người đáp ứng khi điều trị đơn lẻ và kết hợp.

Đối với phân tích đếm tế bào dòng chảy của các thí nghiệm *in vivo*, khối u được thu lại, huyền phù tế bào đơn lẻ được chuẩn bị và tế bào hồng cầu được ly giải bằng cách sử dụng đệm ACK L ly giải (ThermoFisher Scientific). Phân biệt tế bào sống/chết được thực hiện bằng cách sử dụng kit nhuộm tế bào chết màu xanh lam có thể cố định sống/chết (ThermoFisher Scientific). Mẫu được thu thập trên Symphony (BD Bioscience) và được phân tích bằng phần mềm Cytobank (Cytobank, Santa Clara, CA). Phân tích được thực hiện với số lượng sự kiện bằng nhau trên mỗi mẫu. Phạm vi trong các sự kiện được xác định bởi mẫu với ít sự kiện nhất có được. Để tự động nhóm các tế bào T dựa trên chất chỉ thị cụ thể, phân tích CITRUS từ Cytobank đã được sử dụng.

Cả EGFRxCD28 (REGN7075) và điều trị đơn chất chống PD-1 Ab (cemiplimab) làm giảm cụm tế bào T CD8 + C1, thể hiện hàm lượng cao của PD-L1 và ICOS (xem Fig. 9A và 9B). Chỉ riêng việc phong bế PD-1 đã thúc đẩy mạnh mẽ việc mở rộng cụm tế bào T CD8 + C2 với kiểu hình được hoạt hóa cao (hàm lượng cao của CD2, CD86, GITR, TIGIT và ICOS). Điều thú vị là các cụm tế bào T CD4 + đa dạng hơn đáp ứng với điều trị đơn lẻ hoặc kết hợp (Fig. 9C và 9D) được quan sát thấy. Chỉ điều trị kết hợp mới mở rộng đáng kể cụm C2 với bộ nhớ phản ứng lại kích thích tăng sinh như kiểu hình (Ki67 cao, CD45RA thấp và CCR7) và bộ nhớ phản ứng lại kích thích ít suy giảm hơn như cụm C3 (CD38 thấp, CD45RA và CCR7). Tương tự như tế bào T CD8 +, điều trị kết hợp làm giảm đáng kể cụm C1 với mức độ biểu hiện PDL1 cao hơn. Đơn trị liệu phong bế PD-1 thúc đẩy sự mở rộng của tế bào bộ nhớ phản ứng lại kích thích với mức độ biểu hiện CD38 cao hơn (C4), giống như kiểu hình được hoạt hóa hơn. Đơn trị liệu EGFRxCD28 duy trì nhóm nhỏ tế bào T CD4+ chưa được gây miễn dịch trong khối u (C5), chúng có thể được môi/hoạt hóa thêm khi điều trị Ab kháng PD1.

Các dữ liệu này chứng minh rằng mô hình khối u ghép ngoại lai của người trên chuột được nhân hóa đem lại nền tảng mạnh mẽ cho kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 thử nghiệm dưới dạng đơn trị liệu và kết hợp với thuốc thử phong bế PD-1. Sử dụng phân tích FACS chiều cao và phương pháp nhận dạng phân cụm hoàn toàn tự động giúp chúng ta có thể phân tích sâu hơn cơ chế miễn dịch cơ bản ở chuột đã được phục hồi hệ thống miễn dịch của người. Mặc dù chỉ riêng việc phong bế PD1 đã có thể thúc đẩy sự mở rộng mạnh mẽ của tế bào T CD8 + và CD4 + với kiểu hình được hoạt hóa, nhưng nó không đủ để thúc đẩy sự phát triển bộ nhớ và thúc đẩy sự ức chế khối u đáng kể. Khi kết hợp với điều trị EGFRxCD28, có thể đạt được trạng thái kích hoạt tế bào T cân bằng và thúc đẩy phản ứng chống khối u mạnh mẽ.

Ví dụ 8: EGFRxCD28 đơn lẻ hoặc kết hợp với liệu pháp kháng PD1 không gây ra sự hoạt hóa tế bào T toàn thân so với chất siêu chủ vận CD28 ở khi đuôi dài.

Để đánh giá khả năng dung nạp của đặc hiệu kép EGFRxCD28 (REGN7075) đơn thuần, hoặc tiềm năng hợp lực được lý kết hợp với kháng thể kháng PD1, các nghiên cứu trên khi đuôi dài đã được tiến hành. Ba con khi trong mỗi nhóm điều trị được tiêm một liều duy nhất (10 mg/kg) EGFRxCD28 hoặc kết hợp với REGN2810 (cemiplimab) (10 mg/kg) qua đường truyền tĩnh mạch (các nhóm kết hợp được truyền tuần tự).

Nghiên cứu trên khi đuôi dài được thực hiện theo hướng dẫn của IACUC. Đối với các nghiên cứu với EGFRxCD28, các nghiên cứu về khi đuôi dài cái (*Macaca fascicularis*) được thực hiện tại SNBL USA (được công nhận bởi Hiệp hội Đánh giá và Công nhận Chăm sóc Động vật Phòng thí nghiệm, AAALAC; Đảm bảo Phúc lợi Động vật do Văn phòng Phúc lợi Động vật Phòng thí nghiệm, OLAW cấp; đăng ký với Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ, USDA và ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật thể chế, IACUC). Đối với phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy, máu được thu thập từ tĩnh mạch ngoại vi của các con vật còn tỉnh táo, được kim chế vào ống kali EDTA. 100 μ L máu toàn phần được nhuộm với kháng thể được chỉ định. Thu thập dữ liệu đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện bằng FACS Canto II. Tổng số lượng tuyệt đối của các quần thể cá thể được tính từ tỷ lệ phần trăm tương đối của chúng khi thu được từ cổng quần thể mẹ/bà và tổng số lượng quần thể mẹ/bà được tính từ máy phân tích huyết học đã được xác thực theo công thức: Số lượng quần thể tuyệt đối ($\times 10^3/\mu$ L)

= (tỷ lệ tương đối của quần thể x tổng số quần thể mẹ/bà)/100. Đối với cytokine huyết thanh, máu được thu thập vào các ống tách huyết thanh có chất chống đông máu. Huyết thanh được tách qua ly tâm trong máy ly tâm được thiết lập nhiệt độ là 4 °C. Phân tích sử dụng nền tảng MSD U-Plex (IL-2, 4, 6, 8, 10, TNF α và IFN γ).

Đánh giá độc tính dựa trên các quan sát lâm sàng, tiêu thụ thức ăn định tính, trọng lượng cơ thể, và các dấu hiệu quan trọng (nhiệt độ cơ thể, nhịp tim, đo oxy xung và nhịp thở), bệnh lý lâm sàng và giải phẫu sau khi hoàn thành thí nghiệm. Máu được thu thập để phân tích định kiểu miễn dịch cytokin và FACS. EGFRxCD28 đơn lẻ hoặc kết hợp với cemiplimab được dung nạp tốt và tất cả các con vật đều sống sót cho đến thời điểm mổ xác theo lịch trình. Không có bài báo thử nghiệm nào liên quan đến quan sát lâm sàng được quan sát (dữ liệu không được thể hiện). Không tìm thấy sự thay đổi nào về trọng lượng cơ quan, cũng như không có bất kỳ thay đổi vĩ mô nào được ghi nhận ở giai đoạn cuối bị hoại tử (dữ liệu không được thể hiện). Ngoài ra, không có sự giải phóng cytokin đáng kể, đã quan sát thấy sự cách ly hoặc hoạt hóa tế bào T (Fig. 10A-10C). Ngược lại, sự giải phóng cytokin đáng kể, sự cách ly tế bào lympho và hoạt hóa tế bào T đã được thấy ở những con khỉ dùng “siêu chủ vận” CD28 (dữ liệu không được thể hiện). Không có thay đổi mô học đáng kể nào liên quan đến điều trị được quan sát thấy ở động vật được sử dụng EGFRxCD28 đơn lẻ hoặc kết hợp với cemiplimab.

Ví dụ 9: Đáp ứng chống khối u phụ thuộc vào liều lượng bởi Liệu pháp kết hợp Kháng thể đặc hiệu kép EGFR X CD28 (REGN7075) và Kháng thể kháng PD-1 (REGN2810)

Vật liệu và phương pháp

NCI-H292

Dòng tế bào NCI-H292 là dòng tế bào ung thư biểu mô phổi mucoepidermoid của người được phân lập từ bệnh nhân nữ 32 tuổi (ATCC CRL-1848). Dòng tế bào được duy trì trong RPMI-1640 với 10% FBS được bổ sung với PSG (penicillin, streptomycin, và glutamin).

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC)

PBMC của người thu được từ ReachBio, Cat. # 0500-401, Người cho # 0190205 được sử dụng trong nghiên cứu này.

Quy trình được sử dụng để nghiên cứu khối u:

Chuột NSG cái (tuổi ~ 10 tuần tuổi) đã được sử dụng trong thí nghiệm. Chuột được cấy dưới da với 4×10^6 tế bào khối u, được trộn với 2×10^6 PBMC. Sự phát triển của khối u được theo dõi bằng thước cặp hai lần một tuần trong suốt thời gian nghiên cứu. Kháng thể được nêu trong Bảng 12 được sử dụng dưới dạng đơn trị liệu hoặc kết hợp bằng cách tiêm vào màng bụng với liều lượng đã nêu vào những ngày được chỉ định sau khi cấy ghép khối u. Thí nghiệm kết thúc khi chuột có khối u loét hoặc thể tích khối u vượt quá 1500 cm^3 theo tiêu chuẩn IACUC. Phân tích thống kê được trình bày trong Bảng 13. Dữ liệu được tóm tắt ở **Fig. 11** và **12**.

Bảng 12 – Thiết kế thí nghiệm

Nhóm	Ab 1	Liều Ab 1 (mg/kg)	Ab 2	Liều Ab 2 (mg/kg)	Chuột trên nhóm
A	Đối chứng tương đương số 1	1	Đối chứng tương đương số 2	0,1	8
B	REGN2810	1	Đối chứng tương đương số 2	0,1	8
C	Đối chứng tương đương số 1	1	REGN7075	0,1	8
D	Đối chứng tương đương số 1	1	REGN7075	0,02	8
E	REGN2810	1	REGN7075	0,1	9
F	REGN2810	1	REGN7075	0,02	9

Đối chứng tương đương số 1 và đối chứng tương đương 2 là kháng thể đối chứng âm liên kết Fel d1

REGN7075 là đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng thể CD28 còn được đề cập là bsAb7075

REGN2810 là kháng thể kháng PD-1

Bảng 13: Phân tích thống kê ngày 32: Phân tích mô hình hiệu quả trộn (REML)

Thử nghiệm so sánh nhiều của Tukey	Tóm tắt	Giá trị P
Kiểu tương đương so với REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,1 mg/kg)	****	<0,0001
Kiểu tương đương so với REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,02 mg/kg)	**	0,0073
REGN2810 (1 mg/kg) so với REGN7075 (0,1 mg/kg)	*	0,0131
REGN2810 (1 mg/kg) so với REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,1 mg/kg)	****	<0,0001
REGN2810 (1 mg/kg) so với REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,02 mg/kg)	****	<0,0001
REGN7075 (0,1 mg/kg) + REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,1 mg/kg)	****	<0,0001
REGN7075 (0,1 mg/kg) + REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,02 mg/kg)	*	0,0340
REGN7075 (0,02 mg/kg) + REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,1 mg/kg)	****	<0,0001
REGN7075 (0,02 mg/kg) + REGN2810 (1 mg/kg) + REGN7075 (0,02 mg/kg)	****	<0,0001

Tóm tắt

Dữ liệu được nêu trong Fig. 11 và 12, chứng minh rằng khi thử nghiệm ở mô hình này, đáp ứng chống khối u mạnh nhất được quan sát thấy khi REGN7075 (kháng EGFR X kháng CD28) được kết hợp với kháng thể kháng PD-1 (REGN2810), so với kết quả thu được khi sử dụng một mình kháng thể.

Ví dụ 10A: Chuẩn độ liên kết đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách sử dụng REGN6323

Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để xác định sự gắn kết của các kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 với một số dòng tế bào ung thư (A375, 22RV1, PEO1, CAPAN2, SW1990, H292), tế bào T của người và khi

đuôi dài và tế bào Jurkat, sau đó phát hiện với kháng thể IgG thứ cấp kháng người được đánh dấu. Tóm lại, 1×10^5 tế bào/giếng được ủ trong 30 phút ở 4°C với sự pha loãng liên tiếp của kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 hoặc kháng thể đối chứng (kháng thể IgG4 của người liên kết với kháng nguyên của người mà không có phản ứng chéo với CD28 của người hoặc khi đuôi dài), nằm trong khoảng từ 100nM đến 1,5pM đối với tế bào T của người và khi đuôi dài, và từ 133nM đến 2pM đối với tế bào biểu hiện EGFR. Sau khi ủ, tế bào được rửa hai lần với PBS lạnh chứa 1% FBS được lọc và kháng thể thứ cấp kháng người được liên hợp với Florophor được thêm vào tế bào và được ủ thêm 30 phút. Thuốc nhuộm sống/chết được thêm vào quá trình ủ tế bào T của người và khi đuôi dài. Giếng không chứa kháng thể hoặc chỉ chứa kháng thể thứ cấp được sử dụng làm đối chứng.

Sau khi ủ với tế bào biểu hiện EGFR, tế bào được rửa, tái huyền phù trong 200 μL PBS lạnh chứa 1% FBS được lọc và được phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy trên BD FACS Canto II.

Sau khi ủ với tế bào người hoặc tế bào T của khi đuôi dài, tế bào được rửa sạch và nhuộm bằng hỗn hợp kháng thể kháng CD2, kháng CD16, kháng CD4 và kháng CD8 trong đệm nhuộm sáng để ủ thêm 20 phút ở 4°C . Sau khi rửa, các tế bào được treo lại trong 200 μL PBS lạnh có chứa 1% FBS đã lọc, được định lượng trong cổng sống/CD2+/CD4+/CD16 hoặc sống/CD2+/CD8+/CD16- và được phân tích bằng phương pháp đo tế bào dòng trên BD FACS LSR -Fortessa-X20.

Kết quả của phép chuẩn độ liên kết đếm tế bào theo dòng chảy (Xem Bảng 14A và 14B và Fig. 13A, 13B và 13C)

Sự liên kết của kháng EGFR X kháng kháng thể CD28 đặc hiệu kép (REGN6323) vào bề mặt của tế bào T của người và tế bào T của khi đuôi dài được thử nghiệm như mô tả ở trên bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Kết quả cho thấy REGN6323 liên kết với cả tế bào T CD4 + và CD8 + của người và khi đuôi dài, mà không đạt đến độ bão hòa trong phạm vi nồng độ đã chọn (Fig. 13A).

Sự liên kết của kháng EGFR X kháng kháng thể CD28 đặc hiệu kép (REGN6323) với bề mặt của dòng tế bào biểu hiện EGFR khác cũng được thử nghiệm bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Dòng tế bào được sử dụng là tế bào Jurkats (Xem Fig. 13C), là dòng tế bào lympho T bất tử của người; tế bào A375, là dòng tế bào hắc tố biểu mô; tế bào 22RV1, là dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền

liệt; tế bào PEO1, là dòng tế bào ung thư biểu mô buồng trứng có nguồn gốc từ cổ tử cung; CAPAN2, là dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy; SW1990, là dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến tụy có nguồn gốc từ vị trí di căn (lá lách); và H292, là dòng tế bào ung thư biểu mô phổi. Các kết quả này cho thấy rằng REGN6323 liên kết với tế bào A375 với EC50 là 1,48E-09M. REGN6323 liên kết với tế bào 22RV1 với EC50 là 5,54E-10M. REGN6323 liên kết với tế bào PEO1 với EC50 là 6,67E-10. REGN6323 liên kết với tế bào CAPAN2 với EC50 là 1,29E-09M. REGN6323 được liên kết với tế bào SW1990 với EC50 là 2,96E-09M và REGN6323 được liên kết với tế bào H292 với EC50 là 6,74E-10 (Xem Fig. 13B).

Kháng thể đối chứng tương đương không thể hiện bất kỳ liên kết nào với tế bào T của người hoặc khi đuôi dài, cũng như không liên kết với dòng tế bào biểu hiện EGFR.

Các dữ liệu này cho thấy REGN6323 có khả năng liên kết nhiều dòng tế bào ung thư biểu hiện EGFR và do đó, có thể có hiệu quả để điều trị nhiều chỉ định ung thư.

Ví dụ 10B: Chuẩn độ liên kết đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách sử dụng REGN6321 và REGN6322

Thí nghiệm cũng đã được thực hiện để xác định xem liệu kháng thể đặc hiệu kép kháng EGFR X kháng CD28 cũng có thể biểu hiện liên kết với nhiều loại tế bào hay không. Theo quy trình được mô tả ở trên, REGN6321 và REGN6322 đã được kiểm tra theo cách tương tự. REGN6323 cũng được bao gồm trong nghiên cứu này.

Kết quả, như trong Fig. 13C, chứng minh rằng REGN6321, REGN6322 và REGN6323 thể hiện liên kết với dòng tế bào tuyến tiền liệt, 22RV1, cũng như dòng tế bào được chỉ định PEO1, là dòng tế bào buồng trứng. Các kết quả này đã chứng minh rằng các kháng thể kháng EGFR X kháng CD28 bổ sung này có khả năng liên kết với các dòng tế bào ung thư khác biểu hiện EGFR.

Bảng 14: Tóm tắt các nghiên cứu về liên kết tế bào theo dòng chảy với các kháng thể đặc hiệu kép EGFR X CD28 khác nhau

Ký hiệu kháng thể đặc hiệu kép kháng	Liên kết EC ₅₀ [M]
--------------------------------------	-------------------------------

EGFR x kháng CD28				
	CASKI	A375	22RV1	PEO1
REGN6321	1,69E-08	5,42E-09	+, NC	+, NC
REGN6322	2,44E-08	4,64E-09	9,58E-09	5,77E-09
REGN6323	2,35E-09	8,74E-10	1,19E-08	5,86E-09
REGN7075	2,05E-09	NT	NT	1,22E-09

NC: EC50 Không tính NT: Kháng thể không được thử nghiệm

Ví dụ 11: Độc tính tế bào được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy

Để theo dõi việc tiêu diệt các tế bào biểu hiện kháng nguyên đặc hiệu khối u (TSA) ở các kích cỡ khác nhau với sự kết hợp của kháng thể CD3 kháng TSA X và kháng thể EGFRxCD28, 22RV1 (PSMA +, STEAP2 +) hoặc PEO1 (MUC16 +) hoặc tế bào CAPAN2 (MUC16 +) hoặc SW1990 (MUC16 +) hoặc H292 (MUC16 +) được đánh dấu bằng 1µM thuốc nhuộm theo dõi huỳnh quang chất theo dấu tế bào tím. Sau khi đánh dấu, tế bào được để qua đêm ở 37°C. Riêng biệt, PBMC của người được để trong môi trường RPMI huyền phù ở 1×10^6 tế bào/mL và được ủ qua đêm ở 37°C để làm giàu tế bào bạch huyết bằng cách làm suy yếu đại thực bào bám dính, tế bào sao và một số tế bào bạch cầu đơn nhân khác. Ngày hôm sau, các tế bào đích được đồng ủ với PBMC chưa kết dính làm suy yếu tế bào (tỷ lệ tế bào tác động/đích là 4: 1), pha loãng liên tiếp kháng thể đặc hiệu kép TSAxCD3 hướng đích hoặc kháng thể đặc hiệu kép TSAxCD3 đối chứng (khoảng nồng độ: từ 66,7nM đến 0,2pM) và nồng độ cố định của phân tử kích thích môi trường EGFRxCD28 REGN6323 ở 2,5µg/ml (16,7nM) trong 96 giờ ở 37°C. Tế bào được lấy ra khỏi đĩa nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng đệm phân ly Trypsin-EDTA, và được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy trên máy FACS BD LSRFortessa-X20. Đối với phân tích đếm tế bào theo dòng chảy, tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm phản ứng gần IR (Invitrogen) chết/sống. Các đầu đếm 5E05 đã được thêm vào mỗi giếng ngay trước phân tích đếm tế bào theo dòng chảy. Đầu 1E05 được thu thập cho mỗi mẫu. Để đánh giá tính đặc hiệu của việc tiêu diệt, tế bào được giám sát trên quần thể được đánh dấu tím. Phần trăm quần thể sống được ghi lại và sử dụng để tính toán tỷ lệ sống sót.

Sự hoạt hóa tế bào T được đánh giá bằng cách ủ các tế bào có kháng thể liên hợp trực tiếp với CD2, CD4, CD8, CD25 và bằng cách báo cáo phần trăm tế bào T được kích hoạt muộn trong tổng số tế bào T (CD2 +) hoặc CD8 +.

Kết quả của xét nghiệm độc tính tế bào dựa trên phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (Xem Bảng 15 và Fig. 14 và 15)

Kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 REGN6323 đồng kích thích được thử nghiệm về khả năng tăng cường hiệu lực gây độc tế bào của các kháng thể TSAxCD3 hướng đích vào kháng nguyên bề mặt tế bào ở các kích thước khác nhau và trên một số dấu hiệu ung thư.

REGN6323 tăng cường thành công hiệu lực gây độc tế bào của các kháng thể đặc hiệu kép TSAxCD3 khác nhau hướng đích PSMA hoặc MUC16 hoặc STEAP2 khi có PBMC của người không được kích thích. Tiêu diệt tế bào đích được tăng cường khi có sự kết hợp kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 + TSAxCD3 so với điều trị đơn chất TSAxCD3 và tế bào bị giết theo cách phụ thuộc vào liều lượng với pM EC50.

Sự tăng cường ly giải tế bào đích quan sát được có liên quan đến việc tăng cường biểu hiện CD25 + trên tế bào T, một lần nữa với pM EC50.

Bảng 15

	Tiêu diệt (chỉ TSAxCD3) %, EC ₅₀ [M]	Hoạt hóa tế bào T (chỉ TSAxCD3) %, EC ₅₀ [M]	Tiêu diệt (TSAxCD3 + EGFRxCD28) %, EC ₅₀ [M]	Hoạt hóa tế bào T (TSAxCD3 + EGFRxCD28) %, EC ₅₀ [M]
22RV1 (với STEAP2xCD3)	54%, 4,31E-11	93%, 3,86E-11	50%, 1,11E-11	97%, 6,27E-12
22RV1 (với PSMAxCD3)	24%, N/C	58%, 7,28E-10	46%, 5,5E-11	95%, 2,53E-11
PEO1 (với MUC16xCD3)	58%, 1,87E-10	44%, 1,51E-10	79%, 4,75E-11	60%, 1,71E-11
CAPAN2 (với MUC16xCD3)	Không hoạt	Không hoạt	7%, 5,29E-11	55%, 5,78E-11

MUC16xCD3)	tính	tính		
SW1990 (với MUC16xCD3)	49%, 3,14E-10	30%, 1,64E-10	60%, 2,31E-11	85%, 2,14E-11
H292 (với MUC16xCD3)	Không hoạt tính	Không hoạt tính	32%, 3,96E-10	35%, 1,49E-10

Ví dụ 12: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên trên EGFR với REGN7075, REGN6323 và REGN6322 bằng HDX-MS

Phép đo khối phổ trao đổi hydro-đơteri (HDX-MS) được thực hiện để xác định dư lượng axit amin của thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR người tái tổ hợp, trình tự axit amin trong phụ lục) tương tác với REGN7075 (mAb12999P2 x mAb14226P2), mAb13006FR (nhánh REGN6323 EGFR mẹ) và mAb35193P (nhánh REGN6322 EGFR mẹ). Mô tả chung về phương pháp trao đổi HDX-MS được nêu trong, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252--259; và Engen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 16, 17 và Bảng 18.

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

Dung dịch đánh dấu được chuẩn bị là đệm PBS trong D₂O ở pD 7,0 (10 mM đệm phosphat, 140 mM NaCl, và 3 mM KCl, tương đương pH 7,4 ở 25°C). Đối với đánh dấu đơteri, 11 μ L 52,0 μ M hEGFR.mmh (Regeneron trong protein nội bộ REGN355) hoặc hEGFR.mmh được trộn trước với REGN7075 theo tỷ lệ mol 1: 1 (phức hợp Ag-Ab), 11 μ L trong 34,3 μ M hEGFR.mmH (Regeneron trong protein nội bộ REGN355) hoặc hEGFR.mmH trộn với mAb13006P2 theo tỷ lệ mol 1: 0,6 (phức hợp Ag-Ab), 11 μ L của 31,4 μ M hEGFR.mmH (Regeneron trong protein nội bộ REGN355) hoặc hEGFR.mmH trộn với mAb35193P2 trong 1: 0,6 tỷ lệ mol (phức hợp Ag-Ab) được ủ ở 20°C với 44 μ L dung dịch dán nhãn D₂O trong các thời điểm lặp lại khác nhau (ví dụ, đối chứng không đơteri= 0 giây; được đánh dấu đơteri trong 5

phút và 10 phút). Phản ứng đoteri được dập tắt bằng cách thêm 55 μ L đệm dập tắt của đệm dập tắt được làm mát trước (0,5 M TCEP-HCl, 8 M urea và 1% axit formic) vào mỗi mẫu để ủ trong 5 phút ở 20 °C. Mẫu được dập tắt sau đó được tiêm vào máy quản lý Waters HDX Manager để tiêu hóa XIII pepsin/proteaza trực tuyến. Peptit được tiêu hóa được phân tách bởi cột C8 (1,0 mm x 50 mm, NovaBioassays) -9,5 °C với gradien 22 phút từ 0%-90% B (pha động A: 0,5% axit formic và 4,5% axetonitril trong nước, pha động B: 0,5% axit formic trong axetonitril). Peptit được rửa giải được phân tích bởi máy khối phổ Thermo Q Exactive HF ở chế độ LC-MS/MS hoặc LC-MS.

Dữ liệu LC-MS/MS của mẫu EGFR không được đoteri hóa được dò tìm lại ở kho dữ liệu bao gồm trình tự hEGFR.mmH (REGN355) và trình tự ngẫu nhiên của nó sử dụng máy dò tìm Byonic (Protein Metrics). Thông số dò tìm được thiết lập mặc định sử dụng tiêu hóa enzym không đặc hiệu và glycosyl ở người làm cải biến biến đổi chung. Sau đó danh sách các peptit được định danh được nhập vào phần mềm HDX Workbench (phiên bản 3.3) để tính toán lượng hấp thụ đoteri của mỗi peptit được phát hiện bởi LC-MS từ tất cả các mẫu được đoteri hóa. Đối với từng peptit nhất định, khối lượng tâm (khối lượng trung bình cổ trọng số cường độ) tại mỗi thời điểm được sử dụng để tính độ hấp thụ đoteri (D) và phần trăm hấp thụ đoteri (%D).

Hấp thụ đoteri (hấp thụ D) = Khối lượng trung bình (đoteri hóa) - Khối lượng trung bình (không được đoteri hóa)

$$\text{Phần trăm hấp thụ đoteri (\%D)} = \frac{\text{Hấp thụ D đối với peptit ở thời điểm X} \times 100\%}{\text{Hấp thụ D tối đa của peptit}}$$

Tổng số 271 peptit từ hEGFR.mmH (REGN355) được xác định từ cả hEGFR.mmH đơn lẻ và hEGFR.mmH phức hợp với các mẫu REGN7075, chiếm 84,4% độ bao phủ trình tự của hEGFR.mmH. Bất kỳ peptit nào có giá trị hấp thụ D dưới dạng phần trăm khác nhau trên 5% được xác định là được bảo vệ đáng kể. Peptit tương ứng với axit amin 345-368 (LHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEL SEQ ID NO: 70) và 399-416 (LEIIRGRTKQHGQFSLAV SEQ ID NO: 71) trên hEGFR.mmH được bảo vệ đáng kể bởi REGN7075 (dư lượng hEGFR.mmH được đánh số theo trình tự hEGFR.mmH).

Tổng số 341 peptit từ hEGFR.mmH (REGN355) được xác định từ cả hEGFR.mmH đơn lẻ và hEGFR.mmH phức hợp với các mẫu mAb13006P, chiếm 85,8% độ bao phủ trình tự của hEGFR.mmH. Bất kỳ peptit nào có giá trị hấp thụ D dưới dạng phần trăm khác nhau trên 5% được xác định là được bảo vệ đáng kể. Peptit tương ứng với axit amin 345-368 (LHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEL SEQ ID NO: 70) và 399-416 (LEIIRGRTKQHGQFSLAV SEQ ID NO: 71) trên hEGFR.mmH được bảo vệ đáng kể bởi mAb13006P (dư lượng hEGFR.mmH được đánh số theo trình tự hEGFR.mmH trong phụ lục).

Tổng số 335 peptit từ hEGFR.mmH (REGN355) được xác định từ cả hEGFR.mmH đơn lẻ và hEGFR.mmH phức hợp với các mẫu mAb35193P, chiếm 85,5% độ bao phủ trình tự của hEGFR.mmH. Bất kỳ peptit nào có giá trị hấp thụ D dưới dạng phần trăm khác nhau trên 5% được xác định là được bảo vệ đáng kể. Peptit tương ứng với axit amin 133-154 (CNVESIQWRDIVSSDFLSNMSM SEQ ID NO: 72) trên hEGFR.mmH được bảo vệ đáng kể bởi mAb35193P (dư lượng hEGFR.mmH được đánh số theo trình tự hEGFR.mmH).

Bảng 16: peptit hEGFR.mmH với khả năng bảo vệ đáng kể khi hình thành phức hợp hEGFR.mmH-REGN7075 so với một mình hEGFR.mmH

hEGFR Gốc	Điện tử (+)	5 phút			10 phút			
		hEGFR- REGN7075	hEGFR		hEGFR- REGN7075	hEGFR		
		Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Δ%D
345-352	2	455,74	456,12	-0,38	455,78	456,19	-0,42	-19,3
346-351	1	650,00	650,39	-0,38	650,06	650,50	-0,45	-16,9
346-352	1	797,35	797,97	-0,62	797,43	798,14	-0,71	-20,3
346-352	2	399,07	399,28	-0,21	399,08	399,32	-0,24	-14,1
346-355	2	563,57	564,01	-0,44	563,64	564,17	-0,53	-16,1

346-356	2	607,27	607,74	-0,47	607,35	607,91	-0,56	-15,9
346-367	3	826,78	827,17	-0,39	826,87	827,38	-0,51	-10,3
346-368	3	864,65	865,06	-0,41	864,81	865,31	-0,50	-10,0
399-412	2	843,25	843,57	-0,32	843,38	843,77	-0,39	-7,3
400-412	2	786,85	787,12	-0,27	786,97	787,33	-0,36	-7,0
400-412	3	524,89	525,07	-0,18	524,96	525,19	-0,23	-6,9
400-416	2	972,10	972,37	-0,26	972,15	972,62	-0,47	-6,0
401-412	2	722,21	722,47	-0,26	722,34	722,71	-0,37	-7,7
401-412	3	481,82	482,02	-0,20	481,90	482,16	-0,26	-8,5

Bảng 17: peptit hEGFR.mmH với khả năng bảo vệ đáng kể khi hình thành phức hợp hEGFR.mmH-mAb13006P so với một mình hEGFR.mmH

hEGFR	Điện tử (+)	5 phút			10 phút			
		hEGFR- mAb13006P	hEGFR		hEGFR- mAb13006P	hEGFR		
		Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	
345- 352	2	455,74	456,16	-0,41	455,82	456,18	-0,36	-18,7
346- 351	1	650,01	650,40	-0,40	650,08	650,50	-0,42	-16,4
346- 352	1	797,35	797,99	-0,64	797,47	798,12	-0,65	-19,6
346- 354	2	505,90	506,44	-0,54	505,99	506,57	-0,58	-22,8
346- 355	2	563,51	564,07	-0,56	563,62	564,18	-0,56	-19,6

346-								
356	2	607,23	607,78	-0,55	607,34	607,92	-0,57	-17,3
346-								
367	3	826,80	827,22	-0,42	826,93	827,37	-0,44	-10,0
346-								
368	2	1296,50	1297,08	-0,58	1296,77	1297,40	-0,63	-8,9
346-								
368	3	864,63	865,06	-0,43	864,80	865,29	-0,48	-10,0
399-								
412	2	843,24	843,64	-0,41	843,32	843,76	-0,44	-8,7
400-								
412	2	786,75	787,15	-0,40	786,84	787,29	-0,45	-9,6
400-								
412	3	524,83	525,10	-0,28	524,88	525,18	-0,30	-9,6
400-								
415	2	922,54	922,99	-0,45	922,65	923,09	-0,44	-7,9
400-								
416	2	972,04	972,46	-0,42	972,11	972,57	-0,46	-7,3
401-								
412	2	722,13	722,56	-0,43	722,23	722,67	-0,44	-10,8
401-								
412	3	481,79	482,09	-0,31	481,86	482,17	-0,32	-11,5

Bảng 18: peptit hEGFR.mmH với khả năng bảo vệ đáng kể khi hình thành phức hợp hEGFR.mmH-mAb35193P so với một mình hEGFR.mmH

hEGFR	Điện tử (+)	5 phút			10 phút			
		hEGFR- mAb35193P	hEGFR		hEGFR- mAb35193P	hEGFR		
		Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	Tâm MH ⁺	Tâm MH ⁺	ΔD	
Gốc								
133- 139	1	793,31	793,75	-0,45	793,33	793,96	-0,64	-13,3
133- 142	2	626,18	626,65	-0,47	626,23	626,80	-0,57	-15,8
133- 147	2	877,53	878,02	-0,49	877,56	878,27	-0,71	-11,4

137-								
141	1	690,43	690,70	-0,28	690,48	690,86	-0,38	-13,2
137-								
147	2	654,56	654,79	-0,22	654,63	654,91	-0,28	-6,9
138-								
147	2	610,96	611,19	-0,23	611,06	611,31	-0,25	-7,4
140-								
142	1	476,68	476,72	-0,03	476,70	476,81	-0,11	-8,4
143-								
148	1	668,39	668,72	-0,33	668,47	668,88	-0,41	-11,3
148-								
152	1	612,31	612,48	-0,17	612,38	612,59	-0,21	-7,5
148-								
154	2	1220,00	1220,45	-0,45	1220,17	1220,51	-0,34	-18,6

Trình tự axit amin của hEGFR.mmh

hEGFR(ECD).CPGG.MMH6 (REGN355): EGFR của người (axit amin L25-A647, số đăng ký NM_005228.4), với quyết định kháng nguyên CPGG.myc(E1-L10).GlyGly.myc đầu C đuôi quyết định kháng nguyên(E1-L10).SerGly.6XHis.SSG (đuôi mmh được gạch chân)

LEEKKVCQGTSNKLTLQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYD
 LSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDA
 NKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSM
 DFQNHLLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRRCRGKSPS
 DCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDV
 NPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKK
 CEGPCRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFT
 HTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQ
 FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT
 KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKC
 NLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHC
 VKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPPTNG
 PKIPSIACCPGGEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLSGHHHHHHSSG (SEQ ID NO:

69)

Ví dụ 13: Cộng hưởng plasmon bề mặt bắt nguồn từ cộng hưởng và hằng số động học của kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 và kháng thể mẹ liên quan với EGFR và CD28

Quy trình thử nghiệm EGFR

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) cho hEGFR.mmH (REGN355) liên kết với Ab phản ứng đặc hiệu kép bắt giữ EGFRxCD28 được xác định bằng cách sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực sử dụng thiết bị Biacore 4000. Bề mặt cảm biến CM5 Biacore được tạo dẫn xuất bằng cách kết hợp amin với kháng thể đơn dòng kháng Fc của chuột (REGN2567, Lô # REGN2567-L1) để thu nhận Ab đặc hiệu kép kháng EGFRxCD28 được tinh sạch. Nghiên cứu liên kết Biacore được thực hiện trong đệm chứa 0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v Chất hoạt động bề mặt P20 (đệm chạy HBS-EP). Các nồng độ khác nhau của hEGFR.mmH với đuôi myc-myc-hexahistidin ở đầu C (REGN355) được điều chế trong đệm chạy HBS-EP (nằm trong khoảng từ 30 nM đến 120 nM, pha loãng 3 lần) được tiêm vào bề mặt được bắt bởi mAb ở tốc độ dòng là 30 μ L/phút. Sự kết hợp được theo dõi trong 5 phút, và sự phân ly của hEGFR.mmH trong đệm chạy HBS-EP được dùng để theo dõi 10 phút. Tất cả thí nghiệm động năng liên kết được thực hiện ở 25°C. Hằng số tốc độ kết hợp động năng (k_a) và phân ly động năng (k_d) được xác định bằng cách khớp với biểu đồ cảm biến thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán hủy phân ly ($t^{1/2}$) được tính toán từ hằng số tốc độ động năng như sau:

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

Các thông số động học liên kết cho liên kết hEGFR.mmH với EGFRxCD28 Ab tinh sạch ở 25°C được trình bày dưới đây trong Bảng 19.

Quy trình thử nghiệm CD28

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) đối với liên kết Abs đặc hiệu kép tinh khiết với hCD28.mFc thu được (REGN2012) được xác định bằng cách sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực sử dụng thiết bị Biacore T-200. Bề mặt cảm biến CM5 Biacore được tạo dẫn xuất bằng cách kết hợp amin với

kháng thể Fc kháng chuột của tổ đa dòng (GE Healthcare, Cat # BR100838) để thu hCD28 tinh sạch bằng đuôi Fc của chuột đầu C (hCD28.mFc, REGN2012). Nghiên cứu liên kết Biacore được thực hiện trong đệm chứa 0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% v/v Chất hoạt động bề mặt P20 (đệm chạy HBS-EP). Các nồng độ khác nhau của Ab đặc hiệu kép được chuẩn bị trong HBS-EP (dao động từ 90 nM đến 1,1 nM, độ pha loãng nối tiếp 3 lần) được tiêm trên bề mặt bắt hCD28.mFc với tốc độ dòng 50µL/phút. Sự kết hợp được theo dõi trong 4 phút, và sự phân ly của Ab đặc hiệu trong HBS-EP được theo dõi trong 10 phút. Tất cả thí nghiệm động năng liên kết được thực hiện ở 25°C. Hằng số tốc độ kết hợp động năng (k_a) và phân ly động năng (k_d) được xác định bằng cách khớp với biểu đồ cảm biến thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán từ hằng số tốc độ động năng như sau:

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

Các thông số động học liên kết cho EGFRxCD28 Liên kết Abs với hCD28.mFc ở 25°C được trình bày dưới đây ở Bảng 20.

Tóm tắt dữ liệu được lập bảng

Bảng 19: Động năng liên kết hEGFR.mmH của người với mAb đặc hiệu kép kháng EGFRxCD28 ở 25°C

REGN # / Ab PID#	κ	Nhánh EGFR	Nhánh CD28	Tên chung	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
REGN6321	REGN6321-L4	13008P5	14226P5	EGFRx CD28	7,30E+04	4,63E-05	6,34E-10	249,4
REGN6322	REGN6322-L3	35193P2	14226P2	EGFRx CD28	1,56E+05	1,46E-03	9,38E-09	7,9
REGN6323	REGN6323-L2	13006P2	14226P2	EGFRx CD28	2,06E+05	7,74E-04	3,75E-09	14,9

Bảng 20: Động năng liên kết hCD28.mFc của người với mAb đặc hiệu kép kháng EGFRxCD28 ở 25°C

REGN # / Ab PID #	κ	Nhánh EGFR	Nhánh CD28	Tên chung	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
REGN6321	REGN6321-L4	13008P5	14226P5	EGFRx CD28	2,59E+05	2,81E-03	1,08E-08	4,1

REGN6322	REGN6322-L3	35193P2	14226P2	EGFRx CD28	2,61E+05	2,68E-03	1,03E-08	4,3
REGN6323	REGN6323-L2	13006P2	14226P2	EGFRx CD28	2,65E+05	2,65E-03	1,00E-08	4,4

Ví dụ 14: Xác định đặc tính của kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 trong thử nghiệm tăng trưởng tế bào qua trung gian phối tử bằng cách sử dụng tế bào BaF3 được thiết kế để biểu hiện quá mức EGFR của người.

Thụ thể EGFR (ErbB1, HER1) là thành viên của họ thụ thể tyrosin kinaza (RTK), có chức năng điều chỉnh sự tăng sinh, tồn tại, biệt hóa và di cư của tế bào của sinh vật đa bào. Sự hoạt hóa của thụ thể xảy ra thông qua liên kết của các phối tử hòa tan của nó, ví dụ: EGF hoặc TGF β , thúc đẩy quá trình đồng hóa và tự động hóa phosphoryl hóa EGFR, cuối cùng dẫn đến việc kích hoạt nhiều tín hiệu nội bào như Ras/MAPK, PLC γ 1/PKC, PI3-kinaza/Akt và các con đường STAT (Wieduwilt *et al.* 2008; *Cell Mol Life Sci. May*; 65(10): 1566-1584).

Để nghiên cứu tác động phong bế của các kháng thể kháng EGFR x CD28 đối với tín hiệu EGFR, thử nghiệm tăng sinh đã được triển khai bằng cách sử dụng dòng tế bào tạo máu Ba/F3 phụ thuộc IL-3 được biến đổi gen để biến đổi gen thành thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô ở người biểu hiện quá mức ổn định (EGFR - amino axit M1 đến A1210 có số đăng ký ngân hàng gen # NP_005219.2) (Kong *et al.* 2017; *Oncotarget*, Vol. 8, (No. 22), pp: 35488-35489). Tế bào BaF3/hEGFR được thiết kế đã được kích thích bằng phối tử (EGF ở người hoặc TGF β) với sự hiện diện của kháng thể đã được chuẩn độ và sự tăng trưởng của tế bào được đo bằng sự kết hợp triti như chức năng của tế bào tăng sinh.

Quy trình thí nghiệm:

Tế bào BaF3/hEGFR được thiết kế được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy (RPMI1640 + 10% FBS + Penicilin/Streptomycin/ L-Glutamin + 10 μ g / mL IL-3 của chuột + 0,5 μ g / mL puromycin), được bỏ đói trong môi trường (RPMI1640 + 1% FBS) không có IL-3, trong 24 giờ trước khi sử dụng chúng trong các thử nghiệm tăng sinh tế bào. Tóm lại, trong đĩa nuôi cấy mô 96 giếng đáy tròn 12,5 x 10⁵ tế bào/giếng đã được thêm vào kháng thể pha loãng liên tục với tỷ lệ 1: 3, nằm trong khoảng từ 15,2pM đến 100nM, bao gồm cả đối chứng không chứa kháng thể, với sự hiện diện của các phối tử không đổi, hEGF (0,5nM) hoặc hTGF β (0,5nM). Đĩa được

ủ trong 72 giờ ở 37°C/5% CO₂, và 0,3 µCi/giếng thymidin siêu nặng được thêm vào tế bào và đĩa được ủ trong 16 giờ nữa. Thymidin, và do đó là triti, sẽ được kết hợp với lượng cao hơn vào ADN mới được tổng hợp của tế bào đang phân chia. Sau khi ủ, tế bào được thu hoạch vào đĩa UniFilter 96 giếng và 30 µL dịch soi cầu được thêm vào mỗi giếng. Sự kết hợp triti được đo dưới dạng số đếm mỗi phút (CPM) bằng cách sử dụng công cụ TopCount NXT Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount NXT. Tế bào, kháng thể và phối tử được chuẩn bị trong môi trường xét nghiệm (Opti-MEM + 0,1% Albumin huyết thanh bò) và tất cả các dung dịch pha loãng liên tiếp đều được thử nghiệm lặp lại.

Giá trị IC₅₀/EC₅₀ đối với kháng thể được xác định từ phương trình logarit 4 thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm sử dụng phần mềm GraphPad Prism™. Sự ức chế tối đa sự tăng sinh được xác định theo phương trình sau:

$$\text{Sự ức chế (\%)} = \frac{100\% \times (\text{CPM trung bình ở } 0,5\text{nM phối tử} + 100 \text{ nM mAb} - \text{CPM nền})}{100\% - (\text{CPM trung bình ở } 0,5\text{nM phối tử} + 0 \text{ nM mAb} - \text{CPM nền})}$$

Tóm tắt kết quả

EGFR x CD28 đặc hiệu kép (REGN6322; REGN6323 và REGN7075) và kháng thể EGFR mẹ tương ứng của chúng (mAb35193P2; mAb13006P2 và mAb12999P2) được thử nghiệm cùng với kháng thể so sánh được tạo ra nội bộ (Erbitux) và mẫu đối chứng âm tính phù hợp với kiểu tương đương với sự hiện diện của 0,5nM hEGF hoặc hTGFβ (xem Bảng 21).

Có mặt 0,5nM EGF:

Không kháng thể nào trong số các kháng thể đặc hiệu kép (REGN6322; REGN6323 và REGN7075) cho thấy sự ức chế tăng sinh phụ thuộc vào liều lượng. Giá trị ức chế tối đa của chúng nằm trong khoảng từ 30,5 đến -6,8% (giá trị âm có nghĩa là tăng sinh). Trong khi mAb35193P2, mAb12999P2 và Erbitux nội bộ ức chế sự tăng sinh của các tế bào BaF3/hEGFR với IC₅₀ và các giá trị ức chế tối đa lần lượt là 2,55nM/29,6%, 19,8nM/91,8% và 6,69nM/97,6%. mAb13006P2 thể hiện sự ức chế tối đa 93,2%, không thể tính giá trị IC₅₀. Kháng thể đối chứng tương đương âm tính cho thấy không có sự ức chế như mong đợi.

Có mặt 0,5nM hTGFβ:

REGN6322 cho thấy sự gia tăng 40,6% với EC_{50} là 3,67nM, trong khi REGN6323 và REGN7075 cho thấy không có phản ứng tương tự như kháng thể đối chứng tương đương âm tính. Ngược lại, mAb13006P2, mAb12999P2 và Erbitux nội bộ ức chế sự gia tăng với IC_{50} và các giá trị ức chế tối đa lần lượt là 6,55nM/97,2%, 7,79nM/95,9% và 1,38nM/99,8%. mAb35193P2 thể hiện sự gia tăng 32,7% với giá trị EC_{50} là 914pM.

Bảng 21: Giá trị ức chế và hiệu lực tối đa của kháng thể

	Có mặt 0,5nM hEGF			Có mặt 0,5nM hTGF β		
Kháng thể	Ức chế [%]	IC_{50} [M]	EC_{50} [M]	Ức chế [%]	IC_{50} [M]	EC_{50} [M]
REGN6322	30,5	ND		-40,6		3,67E-09
REGN6323	28,5	ND		-7,3	ND	
REGN7075	-6,8	ND		11,2	ND	
mAb35193P2	29,6	2,55E-09		-32,7		9,14E-10
mAb13006P2	93,2	NC		97,2	6,55E-09	
mAb12999P2	91,8	1,98E-08		95,9	7,79E-09	
Erbitux nội bộ	97,6	6,69E-09		99,8	1,38E-09	
Đối chứng kiểu tương đương I	7,8	ND		18,9	ND	
Đối chứng kiểu tương đương II	14,1	ND		-1,4	ND	

Từ viết tắt: ND: Không xác định; NC: Không tính được; giá trị hiệu lực không thể được xác định bởi PRISM.

Ví dụ 15: Xác định đặc tính của kháng thể đặc hiệu kép EGFR x CD28 trong các thử nghiệm hoạt hóa tế bào T dị sinh sử dụng NCI-H292 và tế bào T sơ cấp của người.

Bảng 22: Chất phản ứng/thông tin kháng thể/vật liệu:

AbPID/REGN#	Mô tả
REGN6322	EGFRxCD28
REGN6323	EGFRxCD28
REGN7075	EGFRxCD28
Không TAA x CD28	REGN6157 = không TAA (kháng nguyên liên quan đến khối u) x CD28
Cemiplimab	REGN2810 (kháng thể PD-1)
IsoC-1	Đối chứng tương đương đối với Cemiplimab
IsoC-2	Đối chứng tương đương đặc hiệu kép CD28

Nền

Hai tín hiệu, “tín hiệu 1” & “tín hiệu 2,” cần thiết để kích hoạt tế bào T thích hợp. “Tín hiệu 1” được tạo ra bằng cách liên kết thụ thể tế bào T (TCR) trên tế bào T với các phân tử phức hợp tương thích mô chính (MHC) liên kết peptit trên tế bào trình diện kháng nguyên (APC). Trong khi đó, “tín hiệu 2” được tạo ra bằng cách tham gia vào thụ thể CD28 đồng kích thích trên tế bào T với cụm phối tử của nó là biệt hóa 80 hoặc 86 (CD80/CD86) hiện diện trên APC. (Martin *et al.* 1986; June *et al.* 1987; Harding *et al.* 1992). Do đó, hoạt hóa tín hiệu CD28 đem lại cách tiếp cận hướng đích để tăng cường tín hiệu TCR hiện có.

Kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 được thiết kế để bắt chước các phối tử tự nhiên của CD28, bằng cách bắc cầu các tế bào đích EGFR + với các tế bào T CD28, để tạo ra “tín hiệu 2” nhằm tăng cường sự hoạt hóa của các tế bào T khi có “tín hiệu 1” hiện có ở thể dị hợp thử nghiệm hoạt hóa tế bào T. Tuy nhiên, sự hoạt hóa tế bào T có thể bị ức chế bởi sự thắt chặt của thụ thể protein chết tế bào 1 theo chương trình (PD-1) trên tế bào T với phối tử PD-L1 của nó trên APC. PD-1 được buộc dẫn đến việc tập hợp phosphatase vào CD28 và phức hợp TCR (Zou *et al.* 2008, Francisco *et al.* 2010, Hui *et al.* 2017), do đó chống lại tín hiệu TCR và kích thích CD28. Do đó, phong bế tương tác PD-1 / PD-L1 với cemiplimab kết hợp với kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 có thể tăng cường chức năng tế bào T và thúc đẩy tiêu diệt tế bào đích như trong ung thư.

Quy trình thí nghiệm:

Khả năng của kháng thể đặc hiệu kép EGFRxCD28 trong việc kích hoạt

các tế bào T chính của người bằng cách kết hợp với EGFR và CD28 để cung cấp “tín hiệu 2”, được xác định bởi sự phóng thích IL-2 và sự tăng sinh tế bào T, đã được đánh giá khi có sự hiện diện của EGFR⁺/PD-L1⁺ dòng tế bào ung thư phổi ở người (NCI-H292) tạo ra phản ứng TCR dị sinh đủ để đóng vai trò là “tín hiệu 1”.

Phân lập tế bào T CD3⁺ sơ cấp của người:

Tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMC) được phân lập từ gói bạch cầu của người hiến tặng khỏe mạnh từ Precision for Medicine (Người cho 555015) bằng cách sử dụng kit phân lập PBMC trực tiếp của người của EasySep™, theo quy trình khuyến nghị của nhà sản xuất và đông lạnh. Tế bào T CD3⁺ được phân lập bằng cách làm tan băng các lọ PBMC đông lạnh. PBMC của người cho được làm giàu cho tế bào T CD3⁺ bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào EasySep™ Human CD3⁺ T của StemCell Technologies và làm theo hướng dẫn được khuyến nghị của nhà sản xuất.

Thử nghiệm giải phóng IL-2:

Tế bào T CD3⁺ được làm giàu, được tiếp tục trong môi trường kích thích, được thêm vào đĩa đáy tròn 96 giếng ở nồng độ 1×10^5 tế bào/giếng. Tế bào NCI-H292 bắt giữ tăng trưởng, biểu hiện nội sinh EGFR và PD-L1, được thêm vào tế bào T CD3⁺ ở nồng độ cuối cùng là 5×10^4 tế bào/giếng. Sau đó, REGN6322, REGN6323, REGN7075, không TAAxCD28, và đối chứng tương đương phù hợp của chúng (IsoC-2) được chuẩn độ từ 0,76pM đến 50nM trong độ pha loãng 1: 4 và thêm vào các giếng. Điểm cuối của phân pha loãng 10 điểm là không có kháng thể được chuẩn độ. Sau khi bổ sung kháng thể đã chuẩn độ, 20nM không đổi của cemiplimab hoặc đối chứng tương đương phù hợp của nó (IsoC-1) được thêm vào các giếng. Các đĩa được ủ trong 96 giờ ở 37°C, 5% CO₂ và 50 µL tổng phần nổi phía trên được loại bỏ và 5 µL từ phần nổi phía trên được thu thập được sử dụng để đo IL-2. Lượng IL-2 trong phần nổi của xét nghiệm được xác định bằng cách sử dụng bộ AlphaLisa từ PerkinElmer theo quy trình của nhà sản xuất. Sự xác định IL-2 được thực hiện trên máy đọc đĩa nhiều nhãn Envision của Perkin Elmer và các giá trị được báo cáo là pg/mL. Tất cả phân pha loại được thử nghiệm ba lần.

Giá trị EC₅₀ của kháng thể được xác định từ phương trình logarit bốn thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm sử dụng phần mềm GraphPad Prism™. IL-2 tối đa được đưa ra dưới dạng đáp ứng tối đa trung bình nằm trong khoảng liều được

thử nghiệm.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào T:

Sau khi ủ 96 giờ ở 37°C, 5% CO₂ và loại bỏ phần nổi phía trên (xem thử nghiệm giải phóng IL-2), 0,25 mCi/thymidin được tritiated tốt được thêm vào tế bào và các đĩa được ủ thêm 6-8 giờ. Thymidin, và do đó là triti, sẽ được kết hợp với lượng cao hơn vào ADN mới được tổng hợp của tế bào đang phân chia. Sau khi ủ, tế bào được thu hoạch vào đĩa UniFilter 96 giếng và 30 µL dịch soi cầu được thêm vào mỗi giếng. Sự kết hợp triti được đo dưới dạng số đếm mỗi phút (CPM) bằng cách sử dụng công cụ TopCount NXT Microplate Scintillation & Luminescence Counter TopCount NXT. Tất cả phân pha loại được thử nghiệm ba lần.

Giá trị EC₅₀ của kháng thể được xác định từ phương trình logarit bốn thông số trên đường cong đáp ứng liều 10 điểm sử dụng phần mềm GraphPad Prism™. CPM tối đa được đưa ra dưới dạng đáp ứng tối đa trung bình nằm trong khoảng liều được thử nghiệm.

Tóm tắt kết quả (Bảng 23)

Khi điều trị bằng kháng thể cemiplimab EGFRxCD28 (REGN6322, REGN6323, và REGN7075) dẫn đến IL-2 và đáp ứng tăng sinh cao hơn so với không TAA x CD28 và IsoC-2, đối chứng tương đương tương ứng đối với đặc hiệu kép CD28. Trong khi đó, trong trường hợp không điều trị bằng cemiplimab, điều trị bằng kháng thể EGFRxCD28 dẫn đến IL-2 và đáp ứng tăng sinh cao hơn so với không TAA x CD28 và IsoC-1, tuy nhiên giá trị tối đa thấp hơn.

Bảng 23: Giá trị giải phóng & tăng sinh IL-2 và hiệu lực tối đa của kháng thể

Kháng thể	Giải phóng IL-2		Tăng sinh	
	MAX (pg/mL)	EC ₅₀ [M]	MAX (CPM)	EC ₅₀ [M]
REGN6322 + cemiplimab	21,8	NC	2382	NC
REGN6323 + cemiplimab	36,7	NC	2345	3,13E-11
REGN7075 + cemiplimab	27,2	NC	3250	2,16E-11
Không TAAxCD28 + cemiplimab	10,5	NC	1215	ND

IsoC-2 + cemiplimab	8,99	ND	1106	ND
REGN6322 + IsoC-1	8,02	ND	1863	NC
REGN6323 + IsoC-1	13,2	ND	1665	2,29E-11
REGN7075 + IsoC-1	12,7	NC	1880	3,92E-11
Không TAAxCD28 + IsoC-1	6,10	ND	632	ND
IsoC-2 + IsoC-1	5,96	ND	875	ND

Từ viết tắt: ND: Không xác định; NC: Không tính được; giá trị hiệu lực không thể được xác định bởi PRISM.

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 của người, và miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với EGFR của người,

(a) trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 của người bao gồm ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3),

trong đó HCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 12; HCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 6; HCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14, LCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, LCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, và LCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22; và

(b) trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với EGFR của người bao gồm ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3),

trong đó HCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, HCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, HCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, LCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, LCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, và LCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22.

2. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này liên kết với các tế bào T biểu hiện CD28 với giá trị EC_{50} nằm trong

khoảng từ 1×10^{-12} M đến 1×10^{-5} M.

3. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 2, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này liên kết với các tế bào T biểu hiện CD28 với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} M đến 1×10^{-5} M.

4. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) bao gồm SEQ ID NO: 10, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm SEQ ID NO: 16; và trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm HCVR bao gồm SEQ ID NO: 2, và LCVR bao gồm SEQ ID NO: 16.

5. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó phân tử này là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng của isotyp IgG1.

6. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó phân tử này là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng của isotyp IgG4.

7. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó phân tử này là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó:

(a) miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 của người bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 26, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 28; và

(b) miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với EGFR của người bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 24, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 28.

8. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép này tương tác với một hoặc nhiều gốc axit amin 345-368 của EGFR như được nêu trong SEQ ID NO: 70, hoặc các gốc axit amin 399-416 của EGFR như được nêu trong SEQ ID NO: 71.

9. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 của người, và miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với EGFR của người,

(a) trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 của người bao gồm ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3),

trong đó HCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 12; HCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 6; HCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 14, LCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, LCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, và LCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22; và

(b) trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với EGFR của người bao gồm ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba vùng xác định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3), trong đó:

(i) HCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 32, HCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 34, HCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 36, LCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, LCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, và LCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22;

(ii) HCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 42, HCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 44, HCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 46, LCDR1 của miền

liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, LCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, và LCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22; hoặc

(iii) HCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 52, HCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 54, HCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 56, LCDR1 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, LCDR2 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, và LCDR3 của miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 22.

10. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 9, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này liên kết với các tế bào T biểu hiện CD28 với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 1×10^{-12} M đến 1×10^{-5} M.

11. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 10, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này liên kết với các tế bào T biểu hiện CD28 với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} M đến 1×10^{-5} M.

12. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 9, trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) bao gồm SEQ ID NO: 10, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm SEQ ID NO: 16; và trong đó miền liên kết kháng nguyên thứ hai bao gồm:

(a) HCVR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 30, và LCVR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 16;

(b) HCVR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 40, và LCVR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 16; hoặc

(c) HCVR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 50, và LCVR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 16.

13. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 9 là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng có isotyp IgG1.

14. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 9 là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng có isotyp IgG4.

15. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 1 là kháng thể đặc hiệu kép, trong đó:

(a) miền liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD28 của người bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 26, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 28; và

(b) miền liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với EGFR của người bao gồm:

(i) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 38, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 28;

(ii) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 48, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 28; hoặc

(iii) chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 58, và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 28.

16. Phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm 9, trong đó phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép này tương tác với một hoặc nhiều gốc axit amin 133-154 của EGFR như được nêu trong SEQ ID NO: 72, một hoặc nhiều gốc axit amin 345-368 của EGFR như được nêu trong SEQ ID NO: 70, hoặc các gốc axit amin 399-416 của EGFR như được nêu trong SEQ ID NO: 71.

17. Dược phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

18. Thiết bị chứa hoặc tiêm bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16 hoặc dược phẩm theo điểm 17.

19. Polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, hoặc bộ polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16.

20. Vector được phân lập bao gồm polynucleotit theo điểm 19, hoặc bộ vector bao gồm bộ polynucleotit theo điểm 19.

21. Tế bào vật chủ được phân lập bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, polynucleotit hoặc bộ polynucleotit theo điểm 19, và/hoặc vector hoặc bộ vector theo điểm 20.

22. Phương pháp sản xuất các chuỗi globulin miễn dịch của phân tử liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, bao gồm:

(a) đưa một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa chuỗi globulin miễn dịch của phân tử liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16 vào trong tế bào vật chủ;

(b) nuôi cấy tế bào vật chủ trong các điều kiện thuận lợi để biểu hiện polynucleotit này; và

(c) tùy ý, phân lập phân tử liên kết kháng nguyên hoặc chuỗi globulin miễn dịch từ tế bào vật chủ và/hoặc môi trường trong đó tế bào vật chủ sinh trưởng.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó tế bào vật chủ là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc.

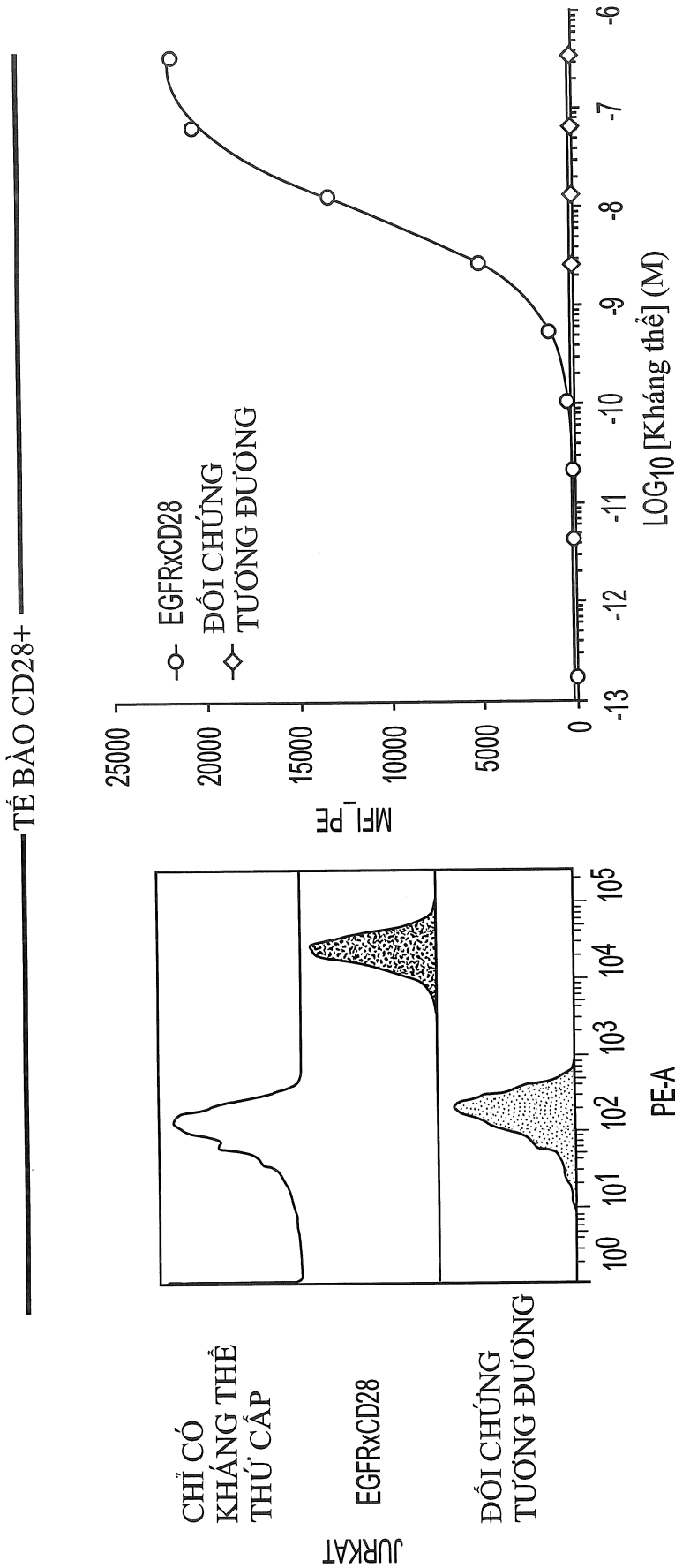


FIG. 1A

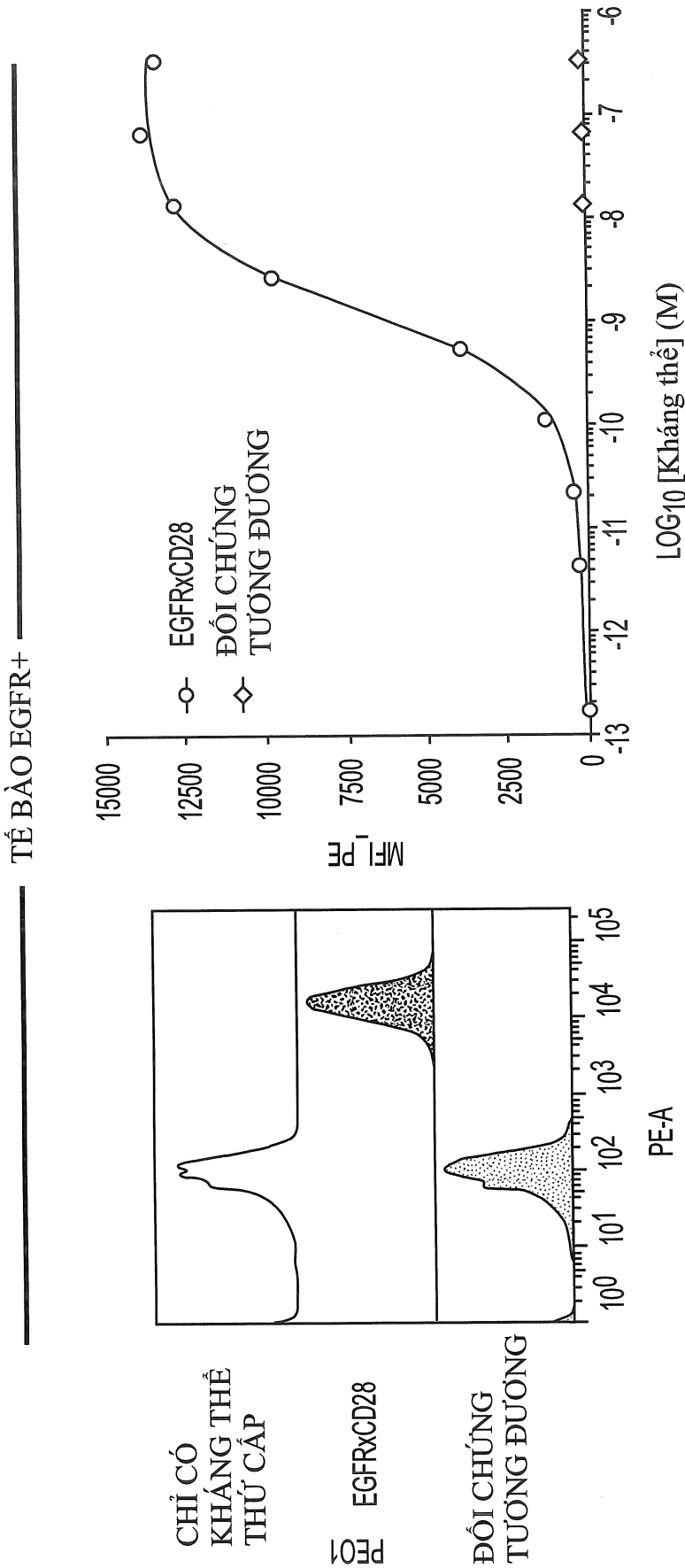


FIG. 1B

3/29

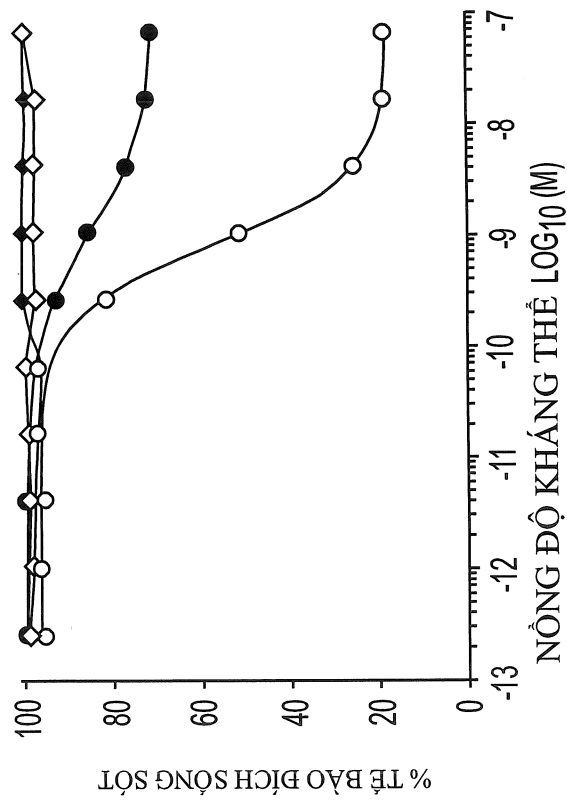


FIG. 1C

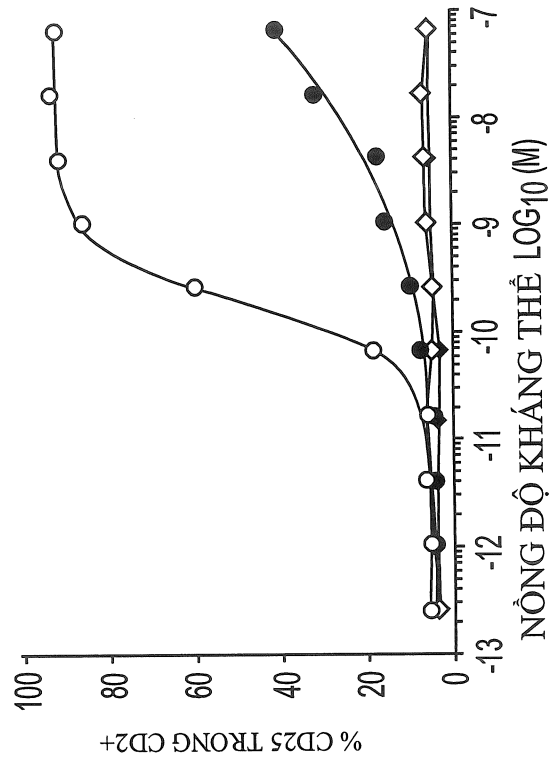


FIG. 1D

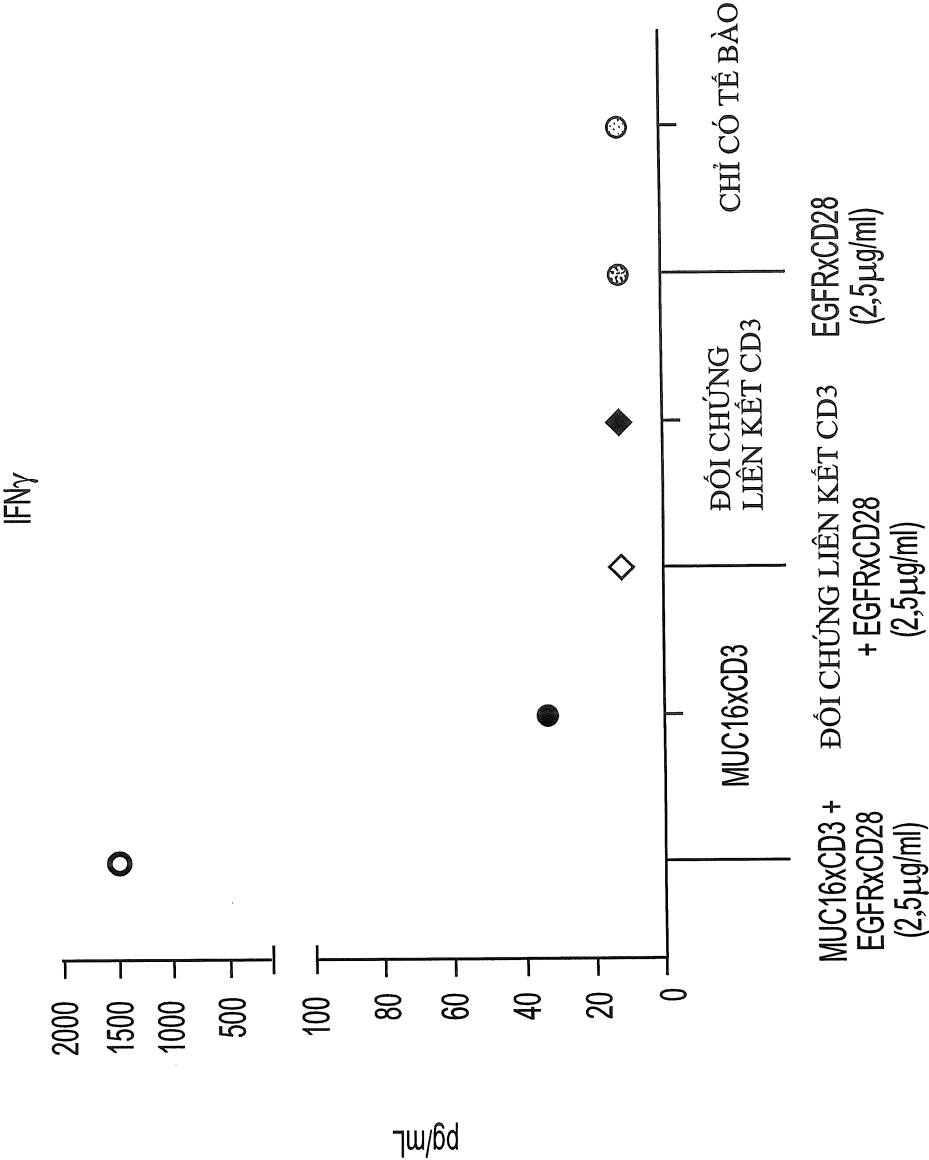


FIG. 1E

5/29

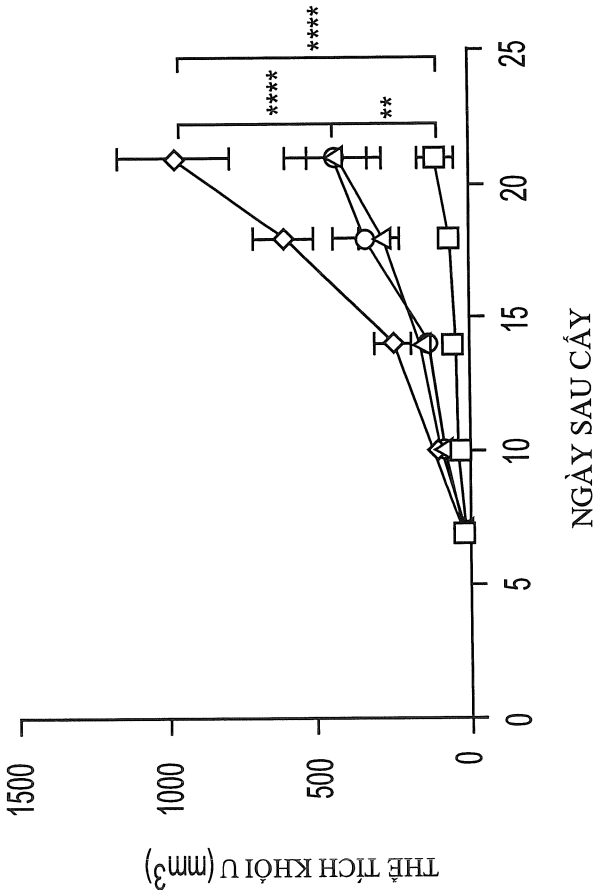
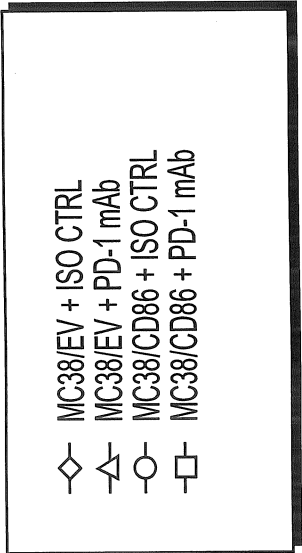


FIG. 2A

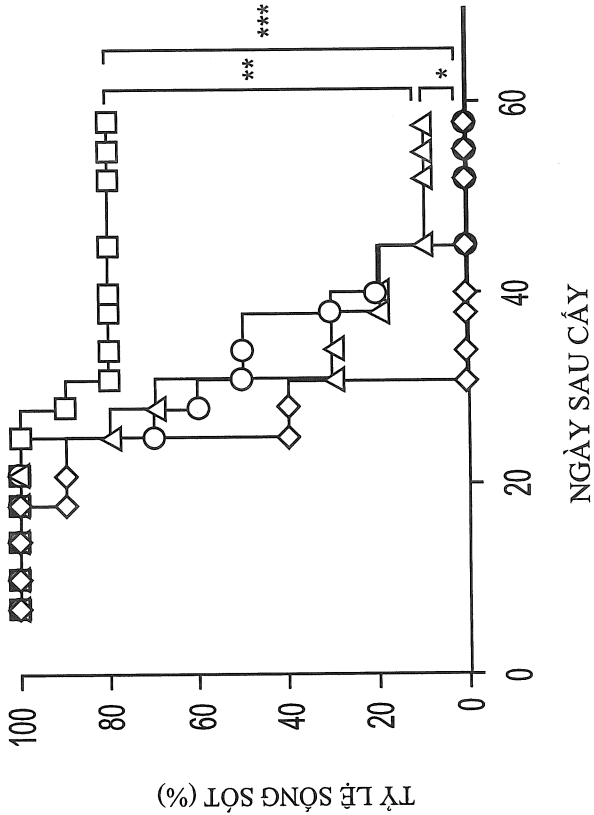


FIG. 2B

6/29

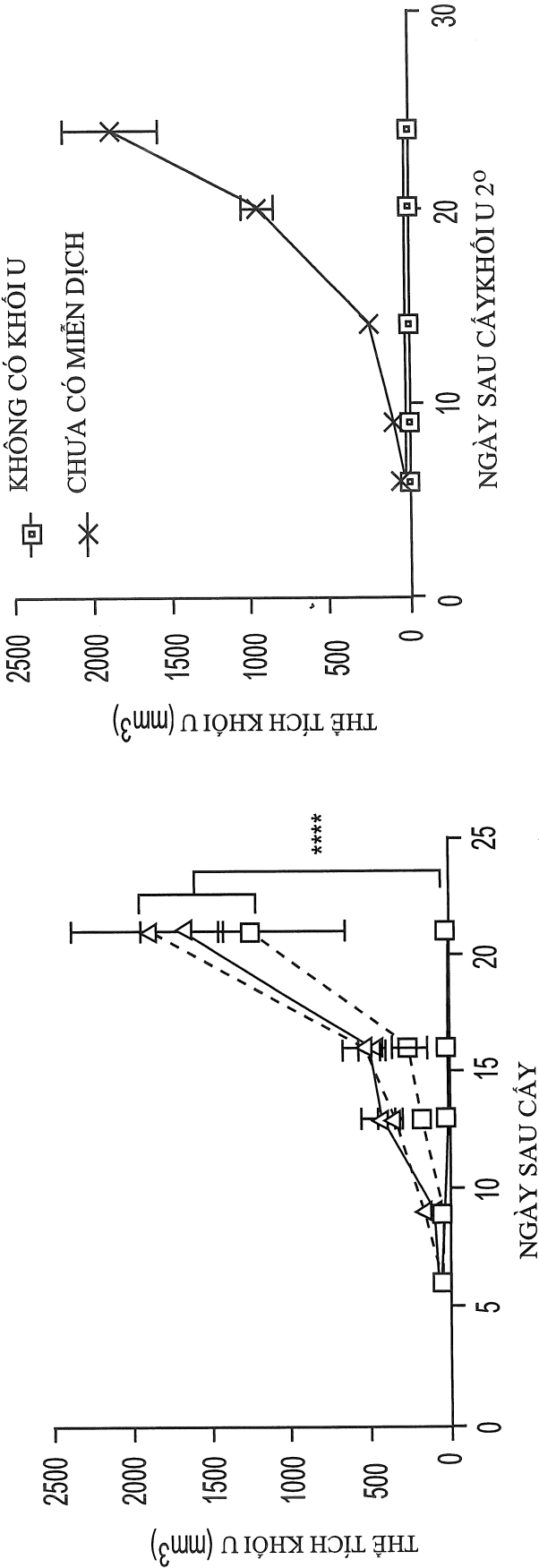
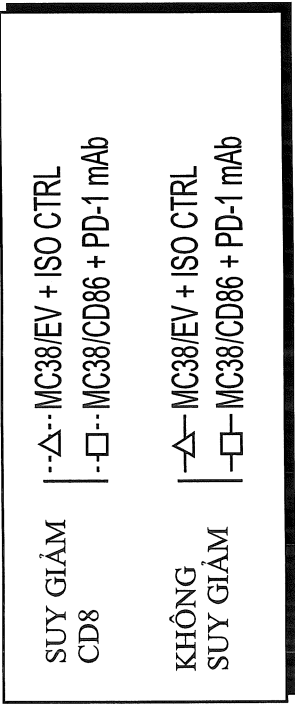


FIG. 2C

FIG. 2D

% CỦA TẾ BÀO CD45+ CỦA NGƯỜI TRONG MÁU NGOẠI VI

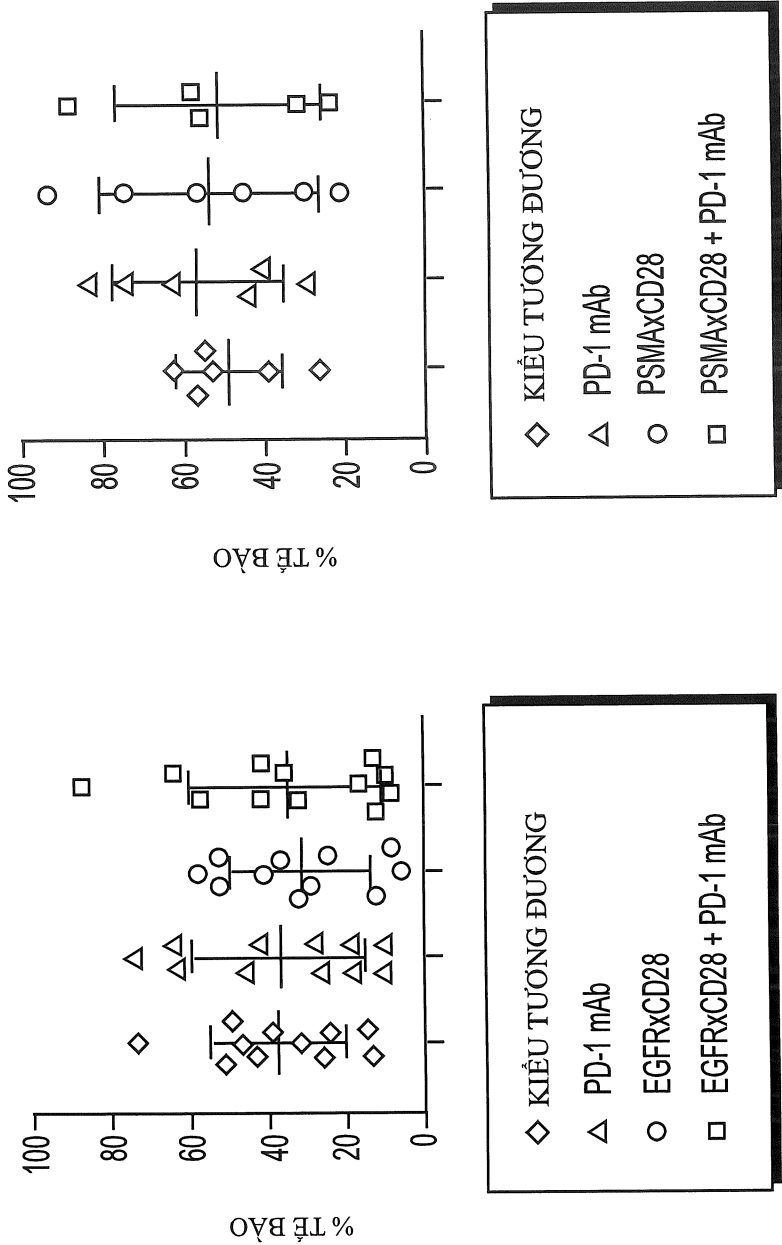


FIG. 3A

8/29

ĐỐI CHỨNG TƯƠNG ĐƯƠNG
NHUỘM KHÁNG THỂ

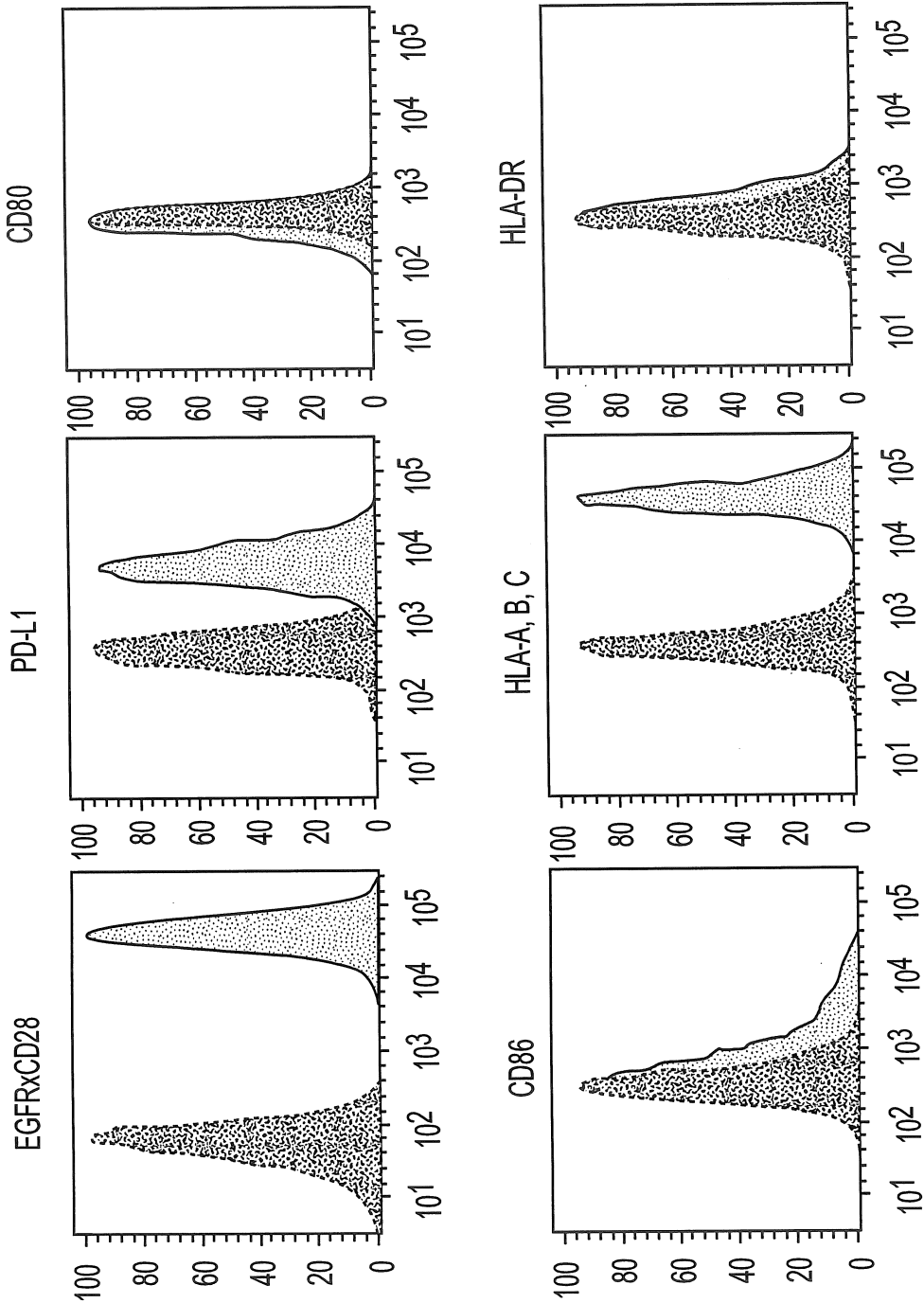
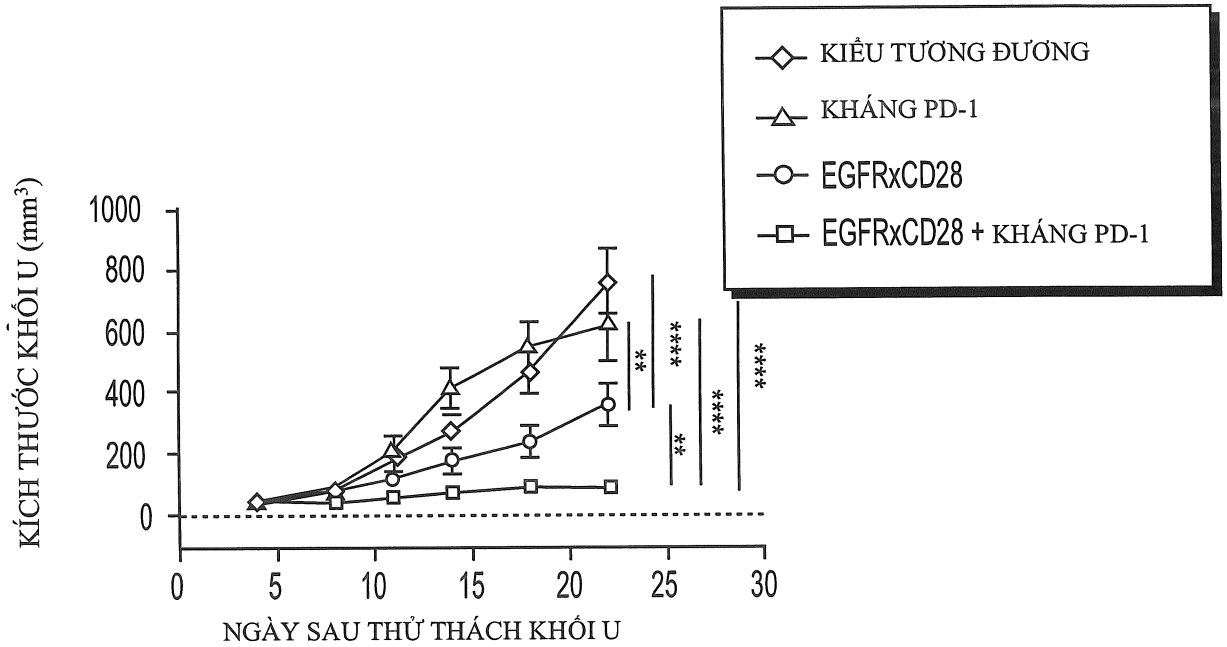
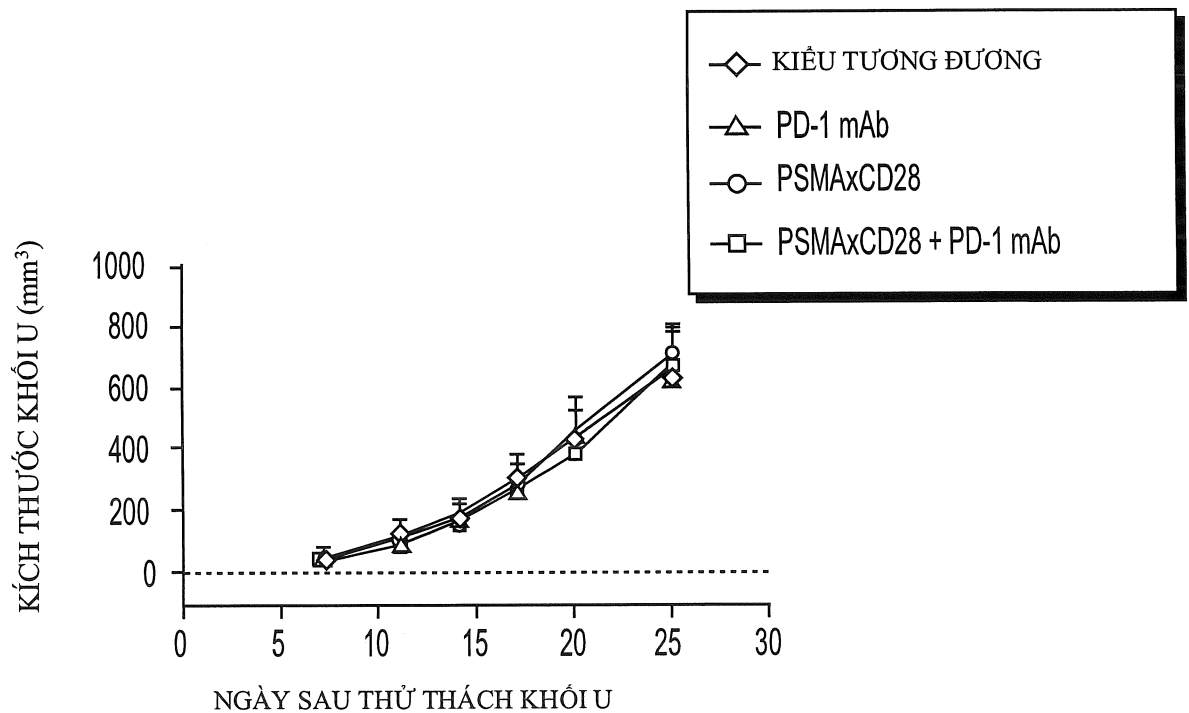


FIG. 3B

9/29

**FIG. 4****FIG. 5**

10/29

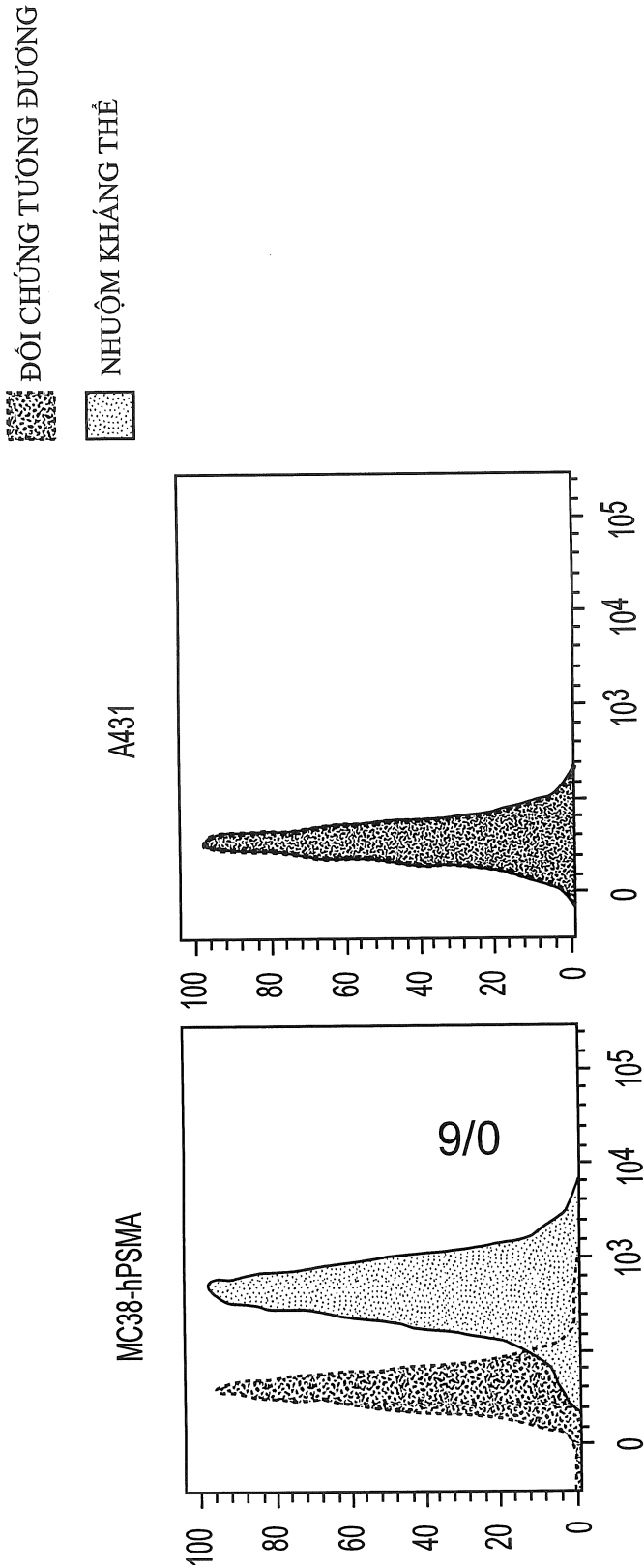
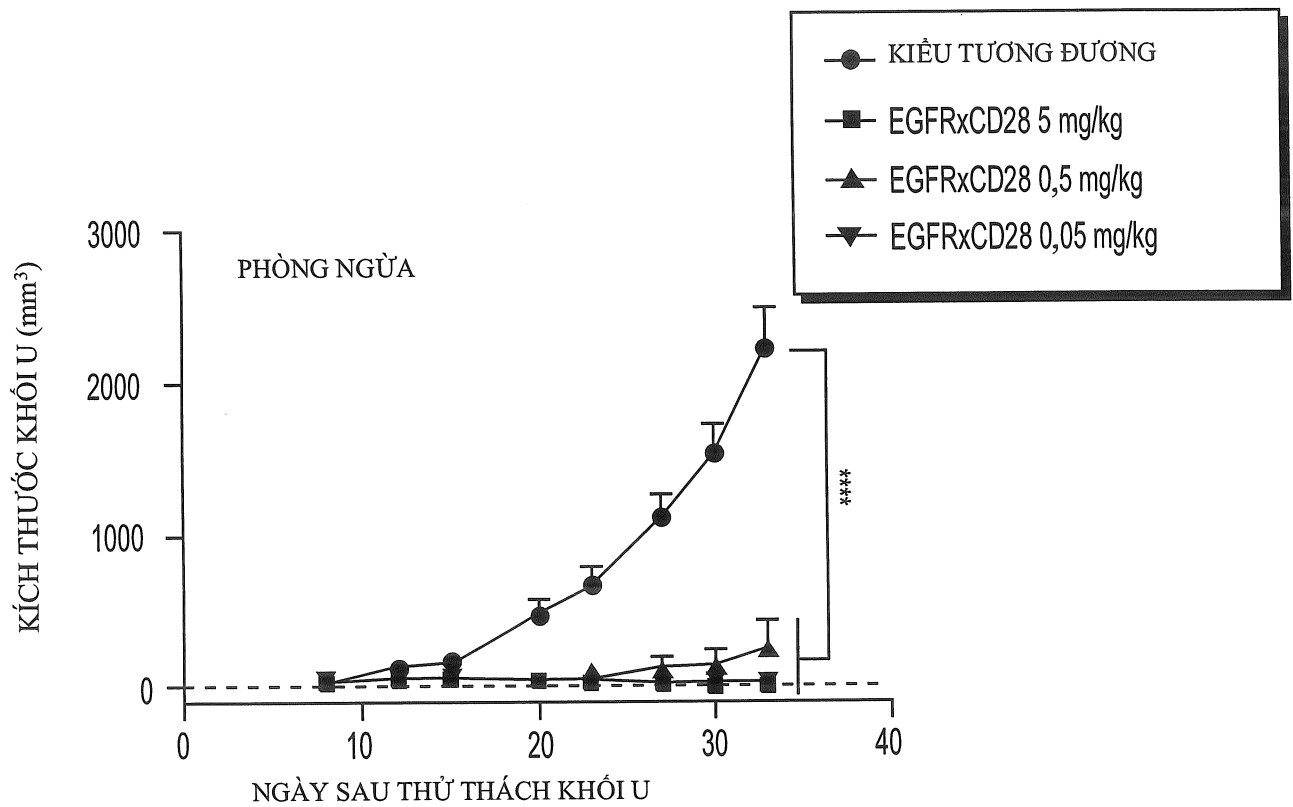
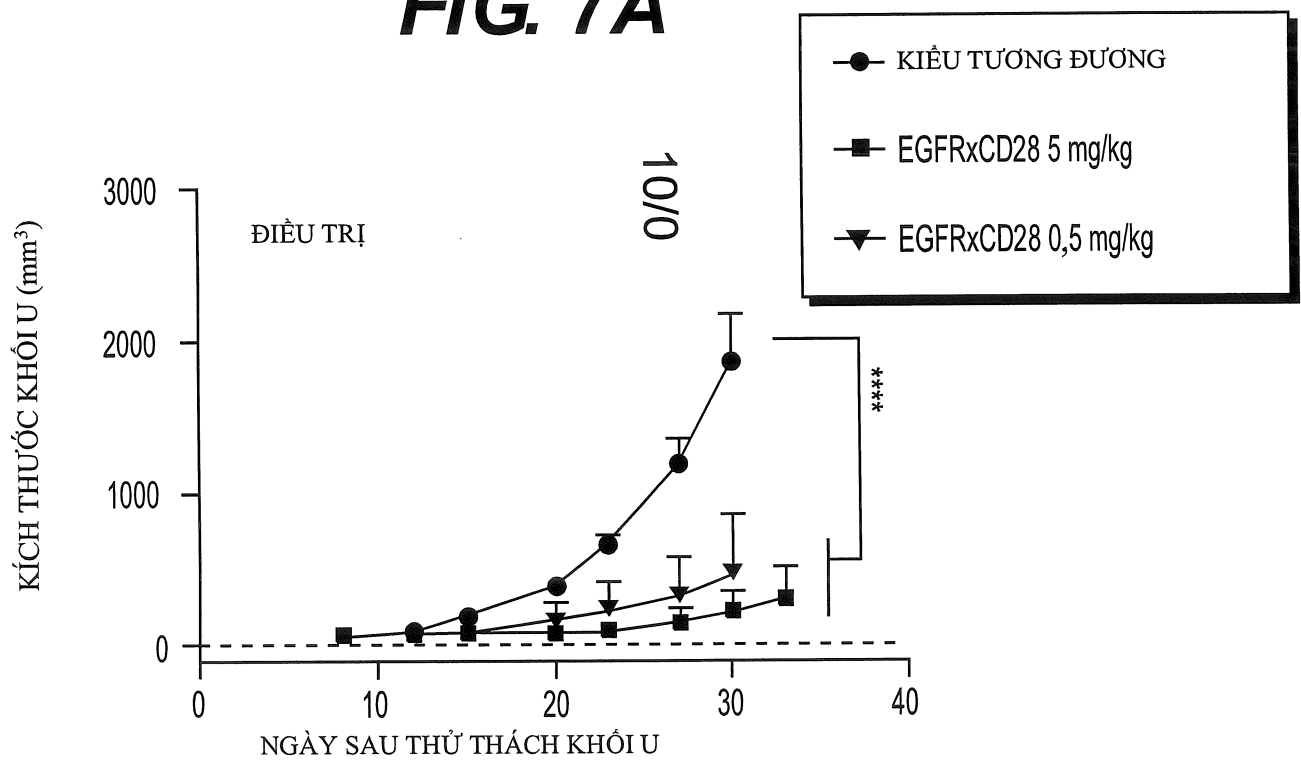


FIG. 6

11/29

**FIG. 7A****FIG. 7B**

12/29

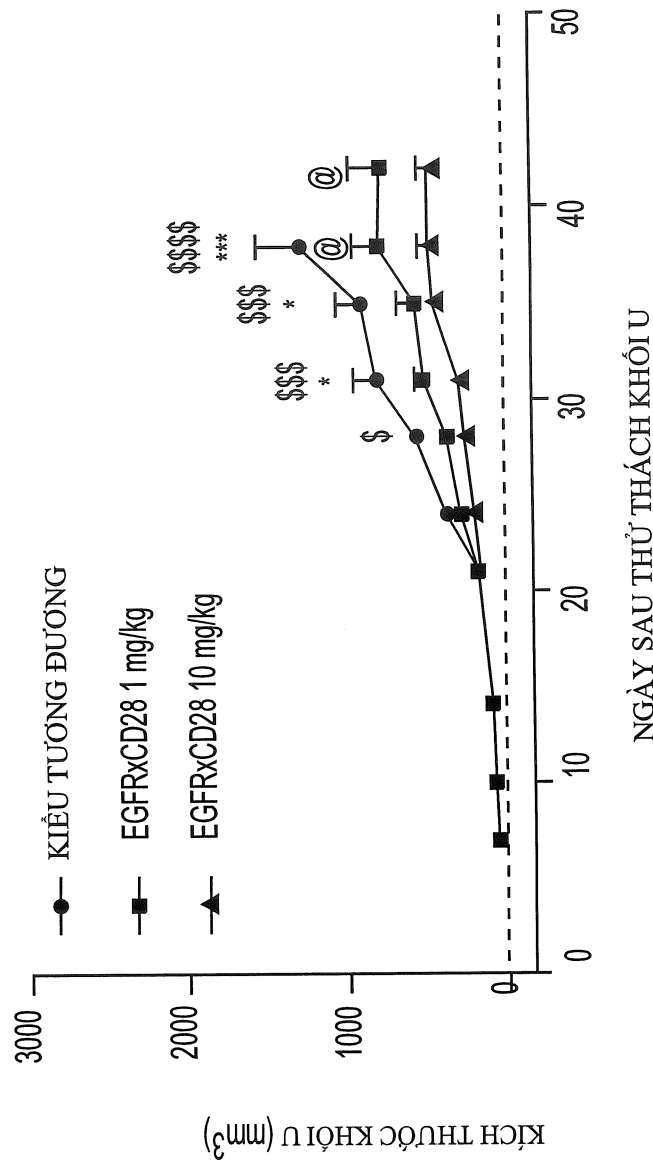


FIG. 8

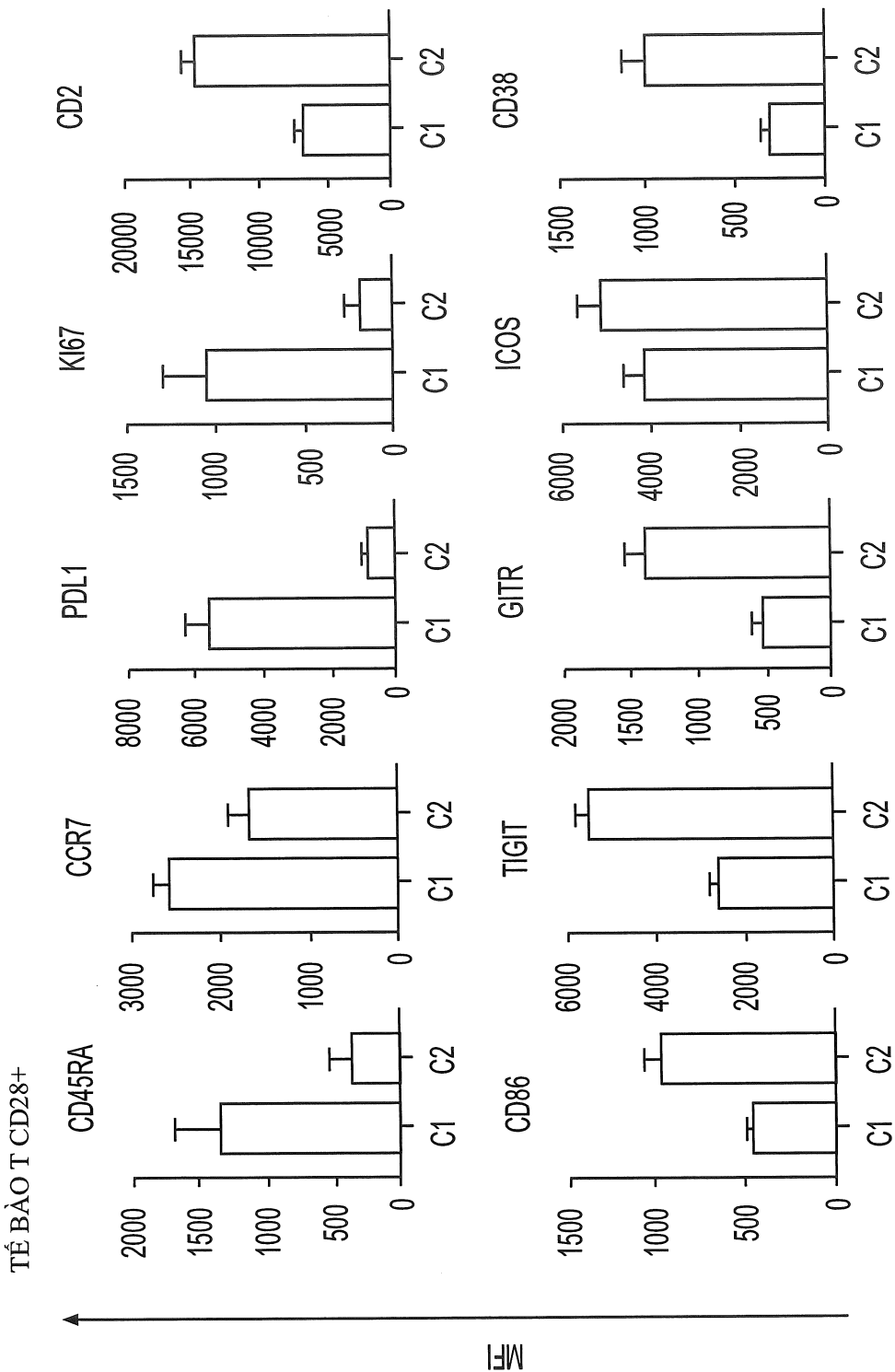
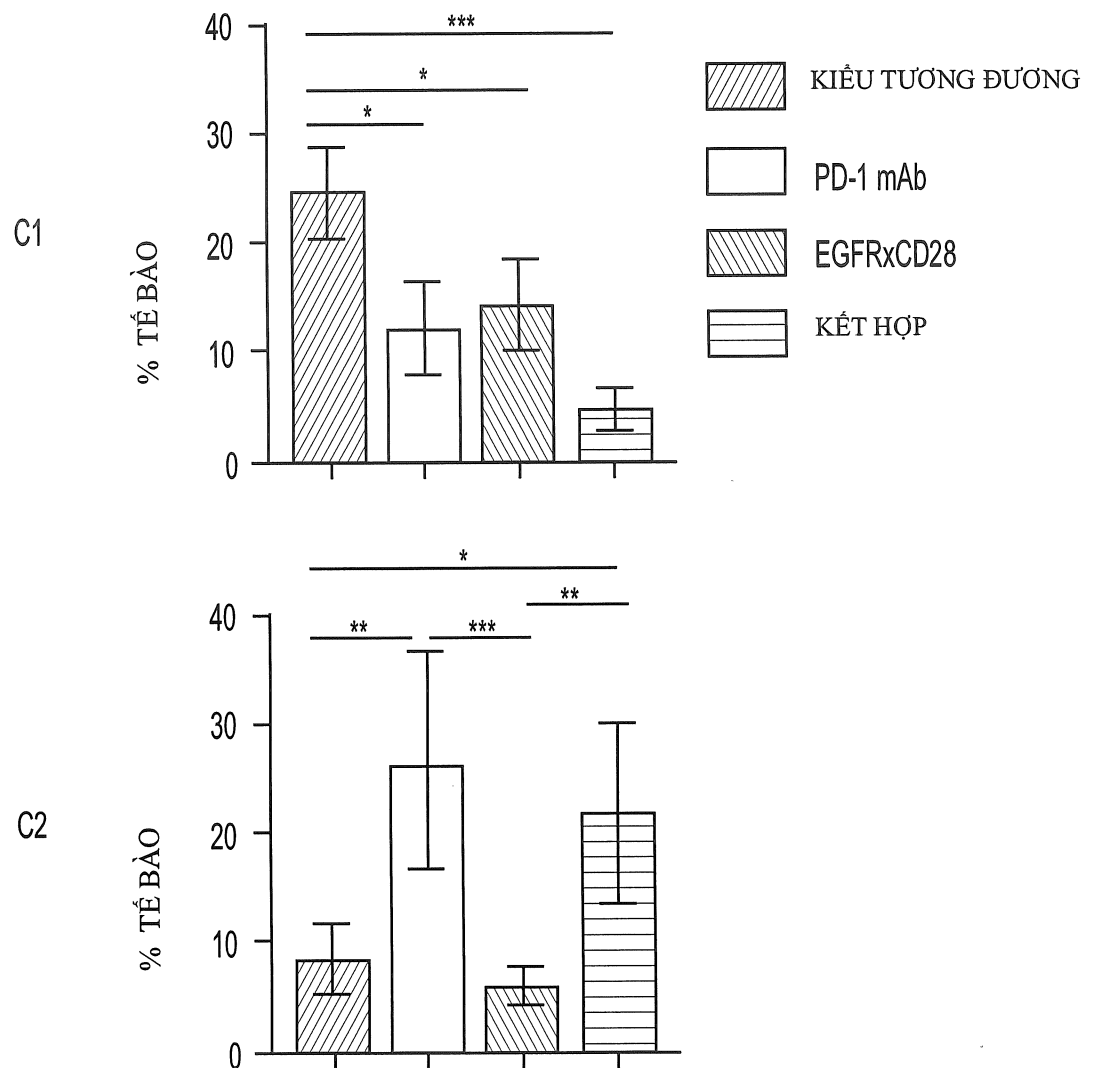


FIG. 9A

14/29

**FIG. 9B**

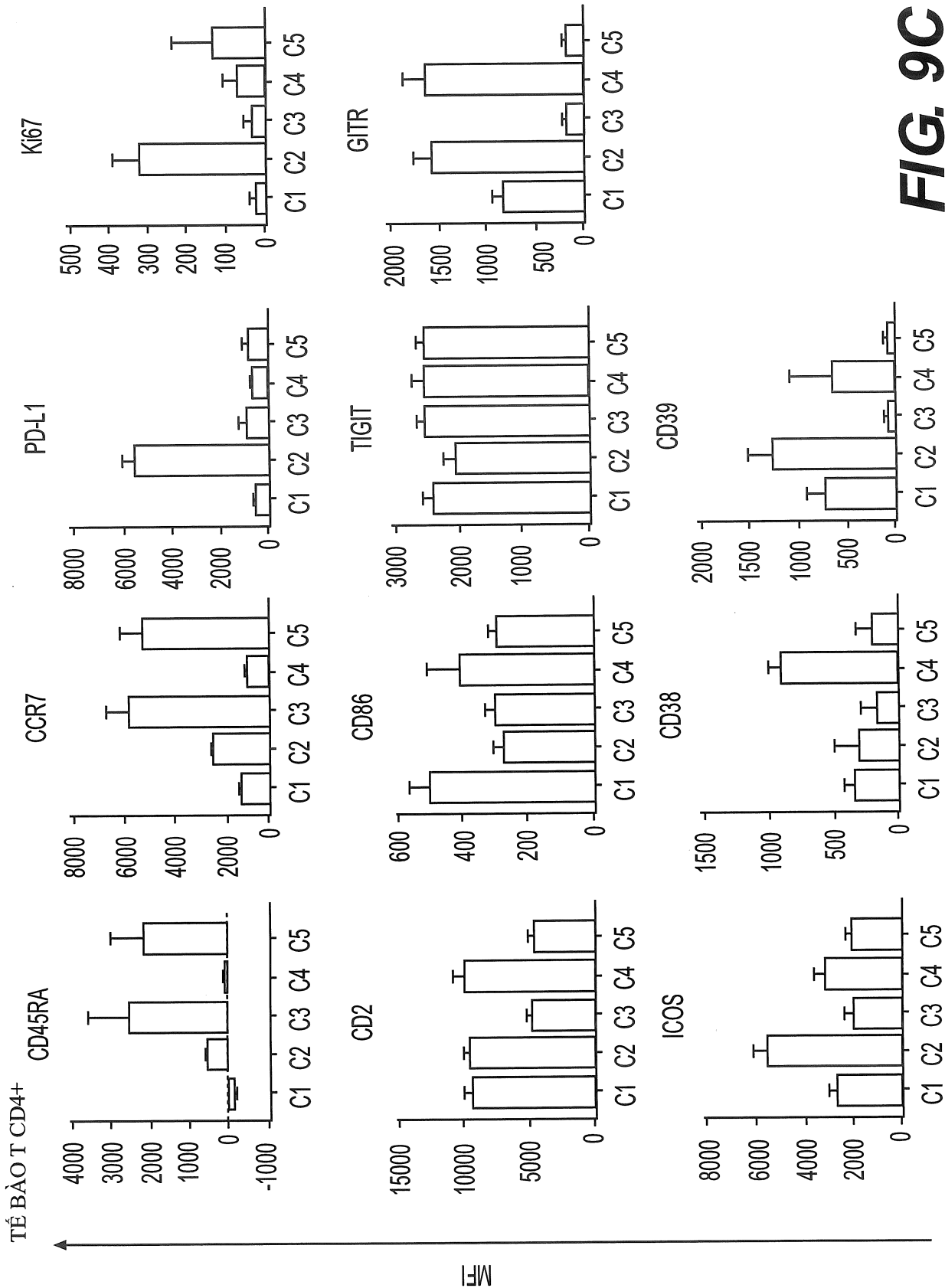


FIG. 9C

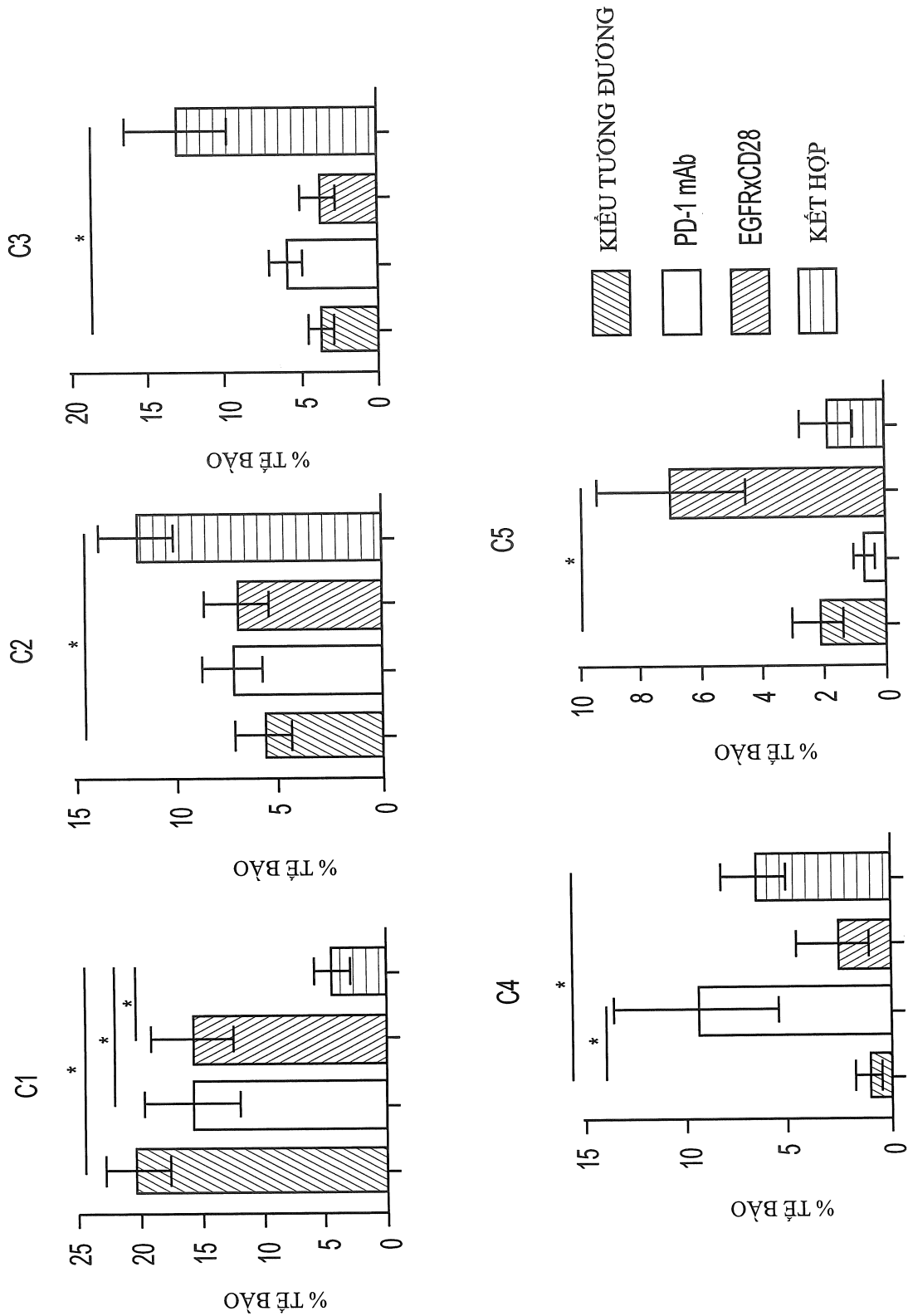


FIG. 9D

17/29

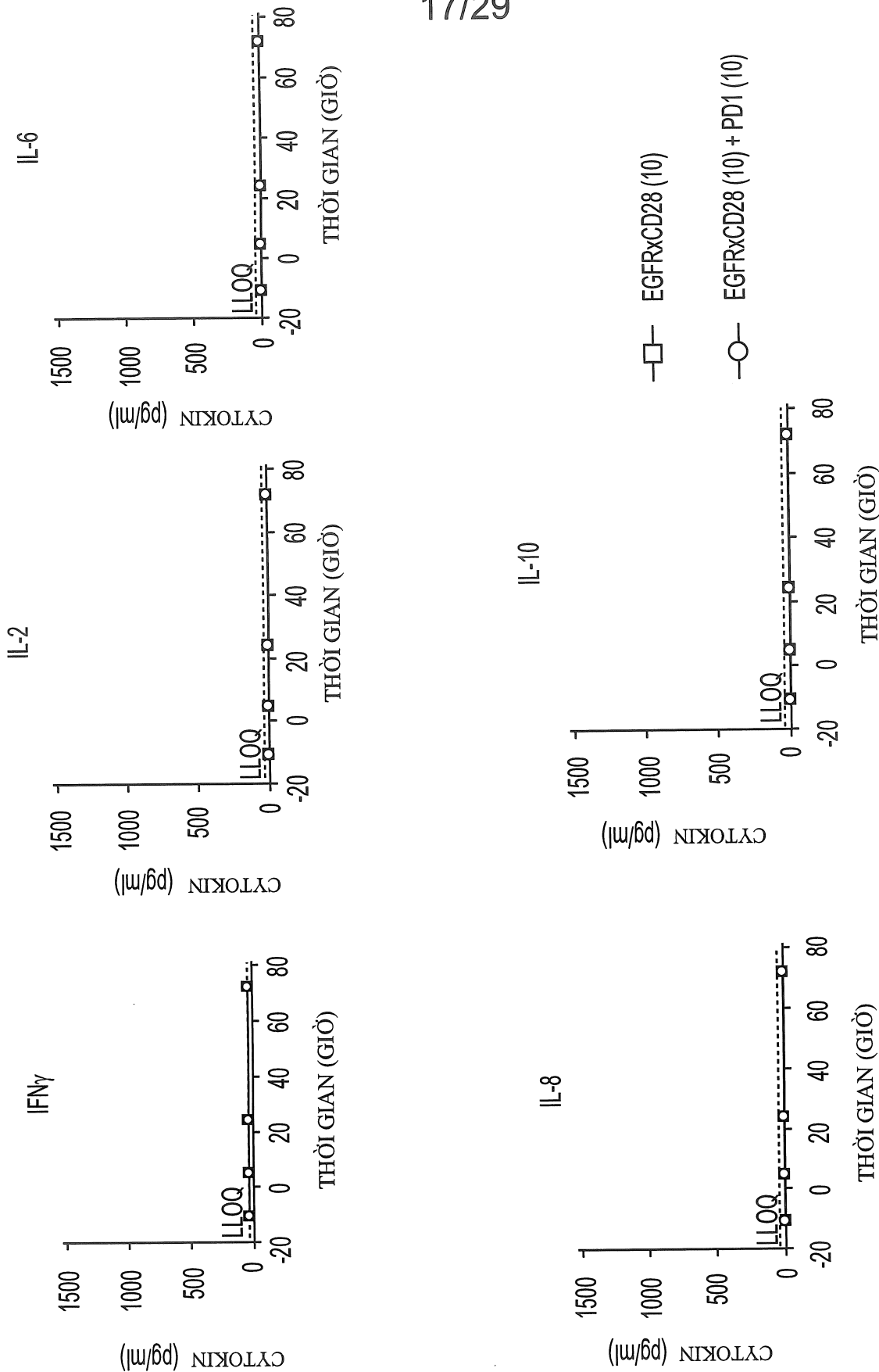


FIG. 10A

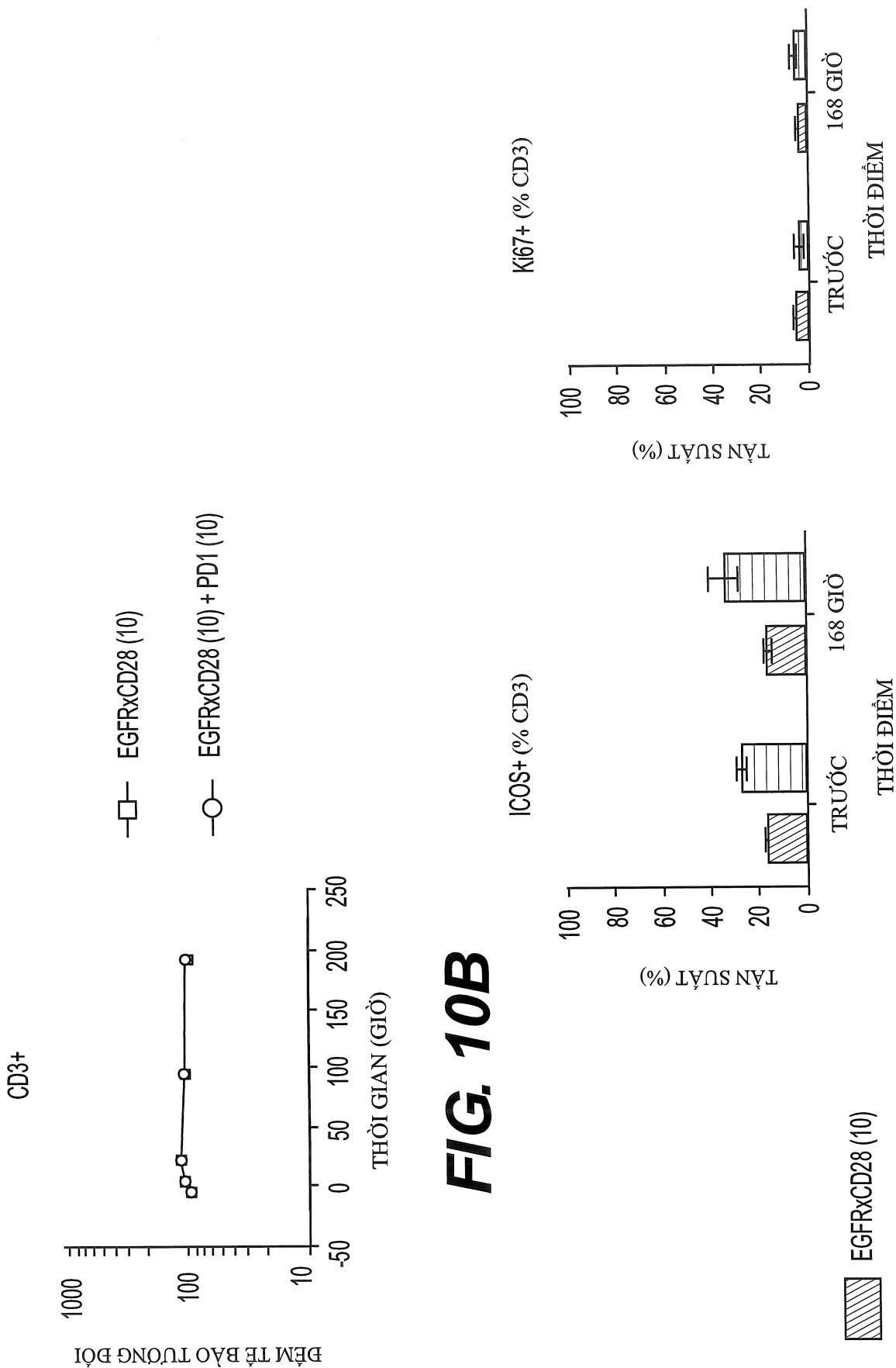


FIG. 10C

FIG. 10B

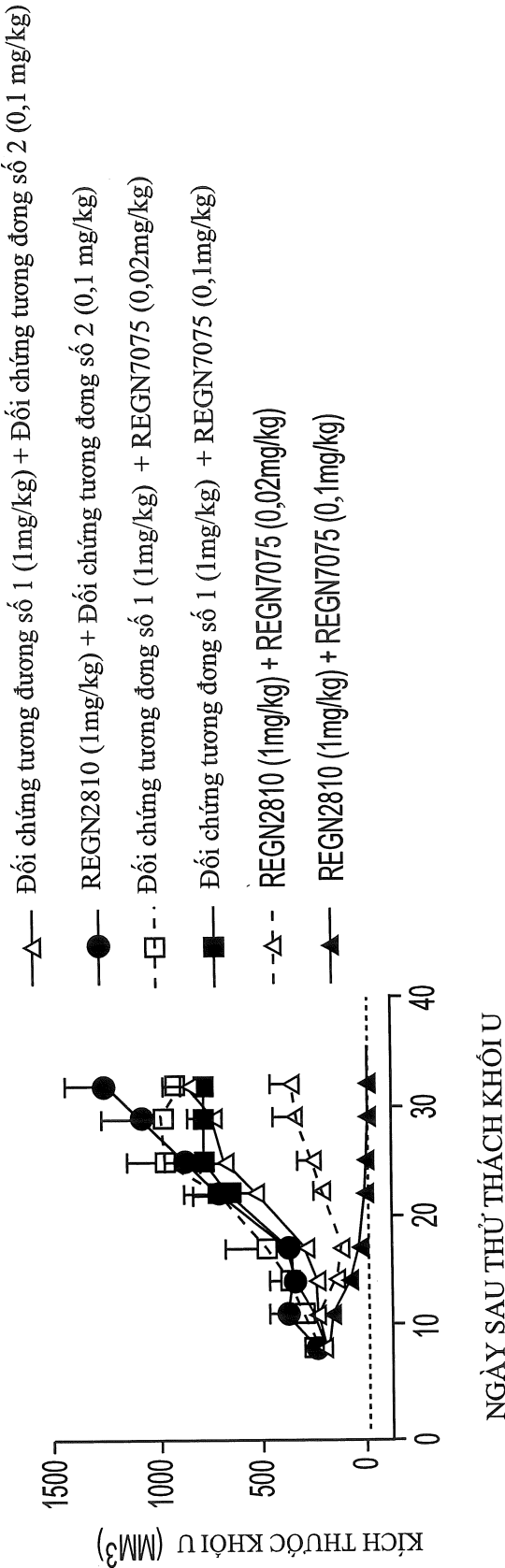


FIG. 11

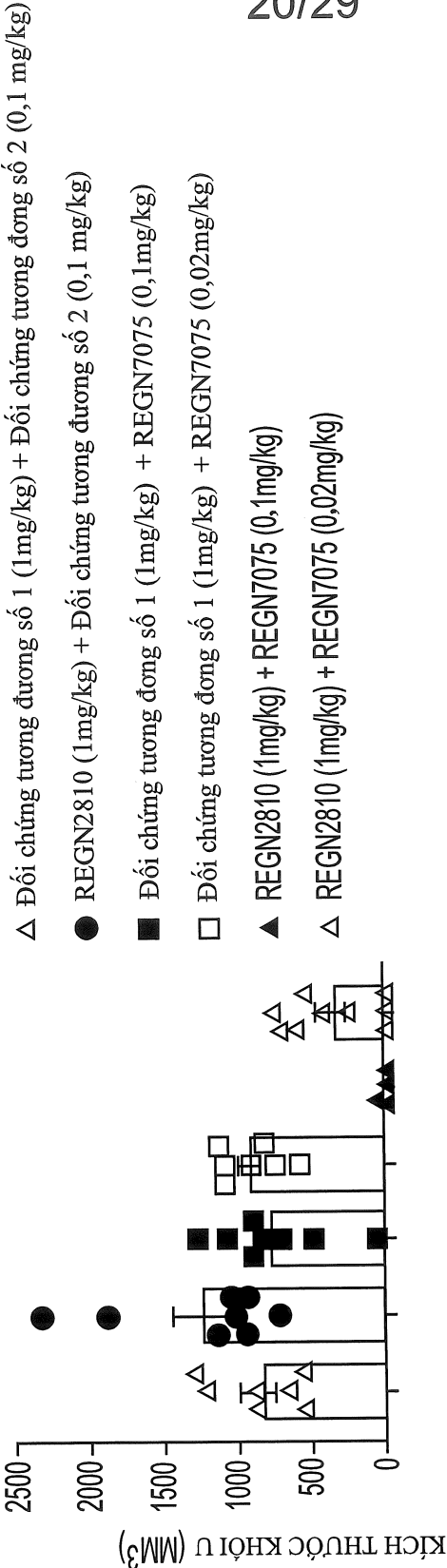


FIG. 12

21/29

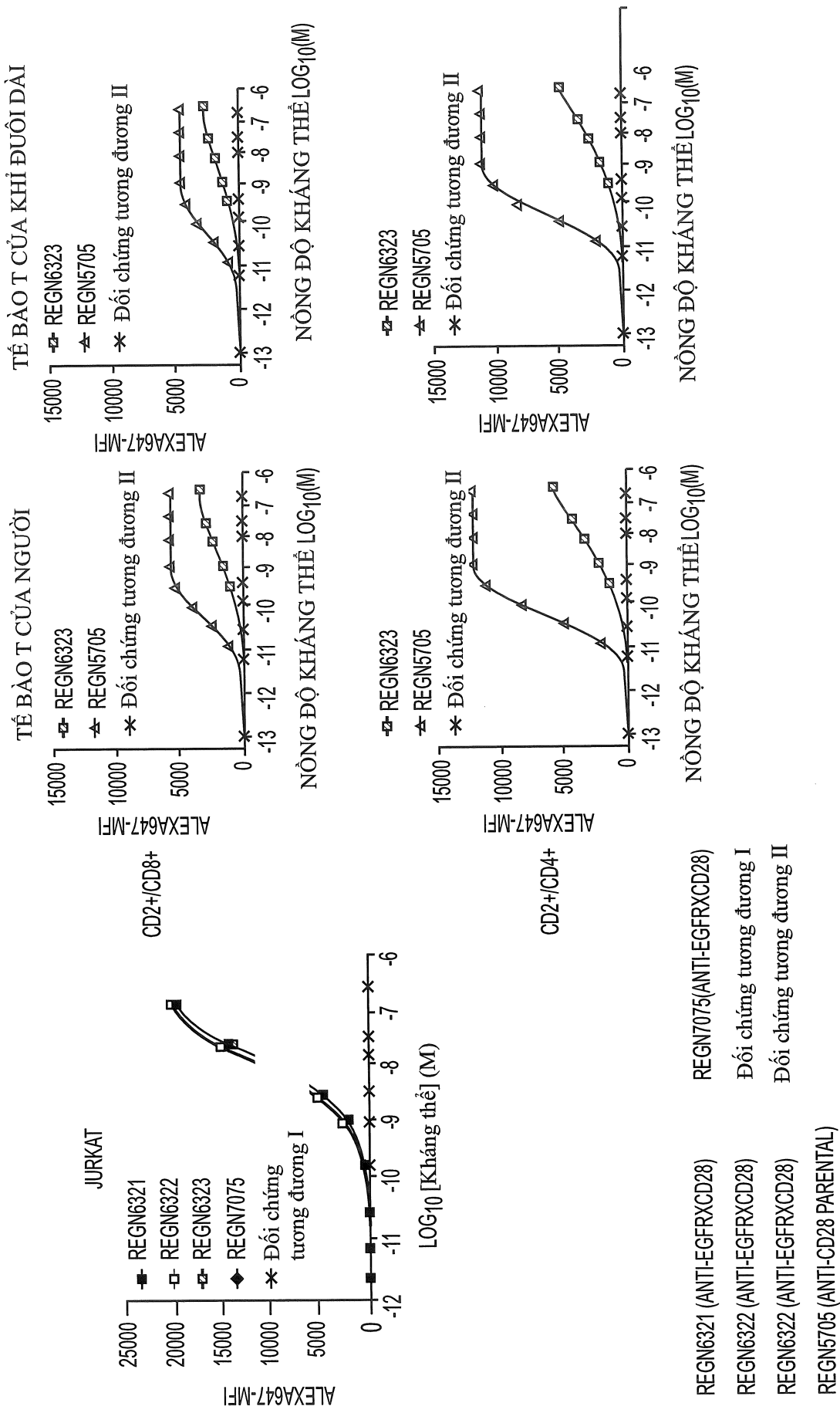


FIG. 13A

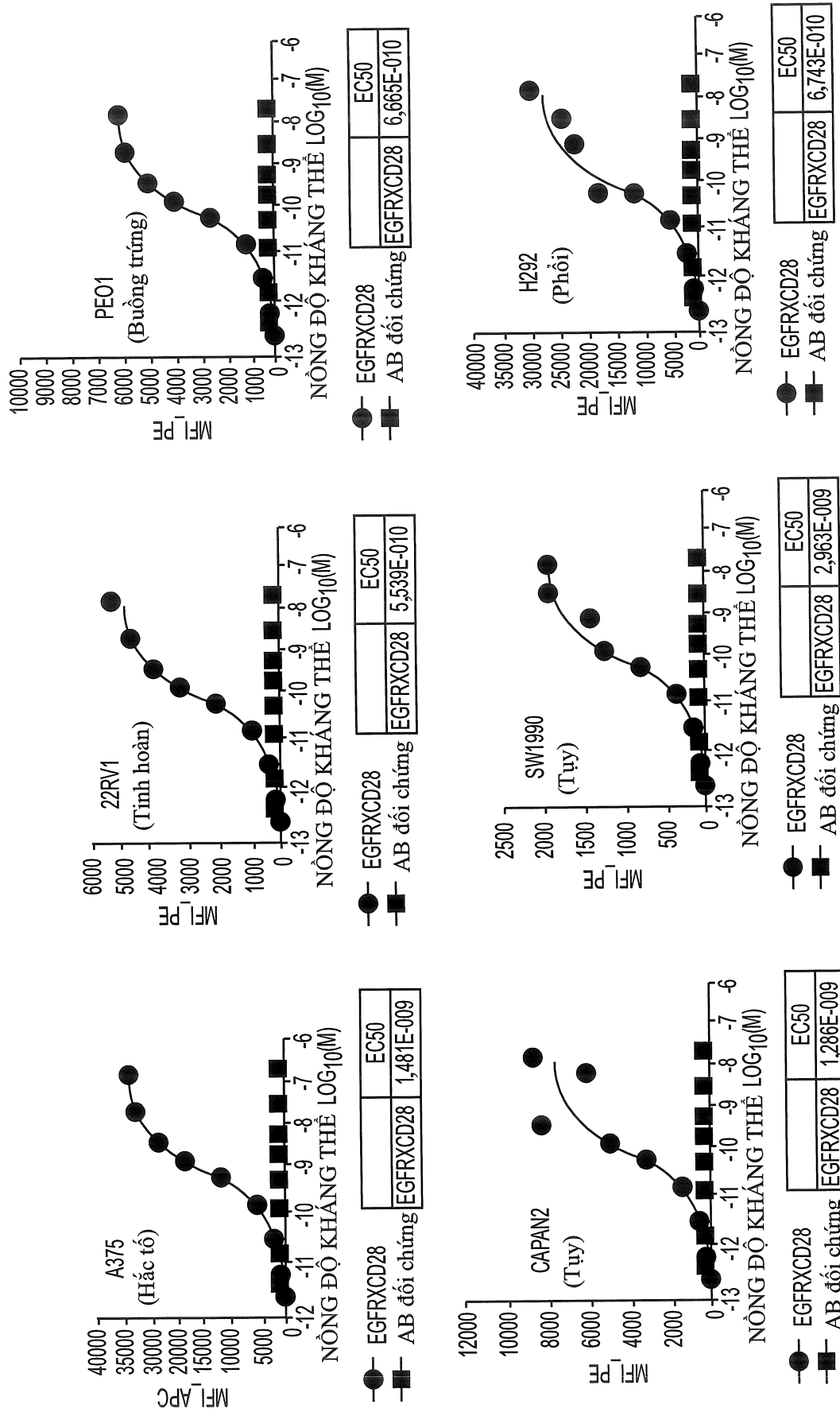


FIG. 13B

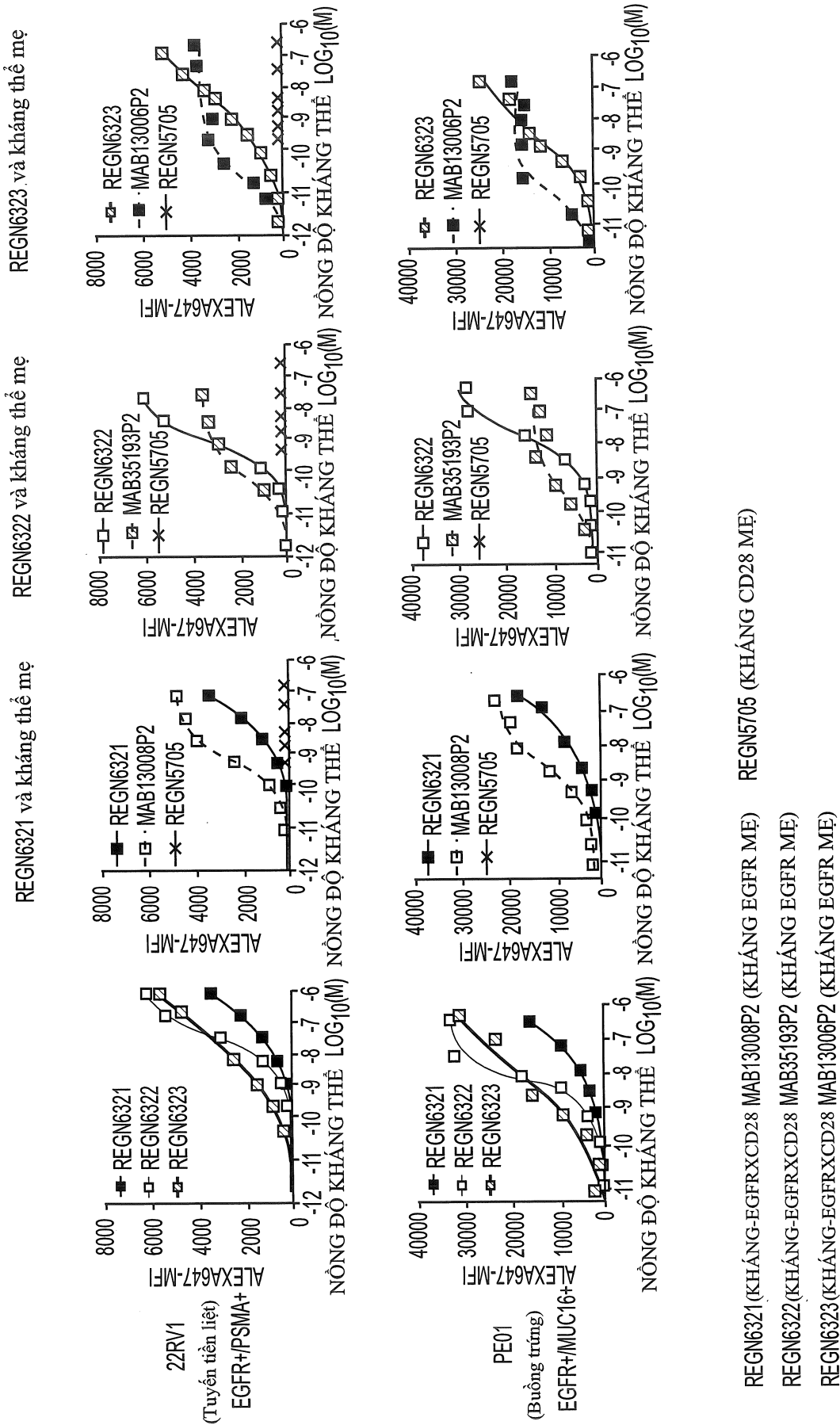


FIG. 13C

22RV1(với STEAP2 X CD3)

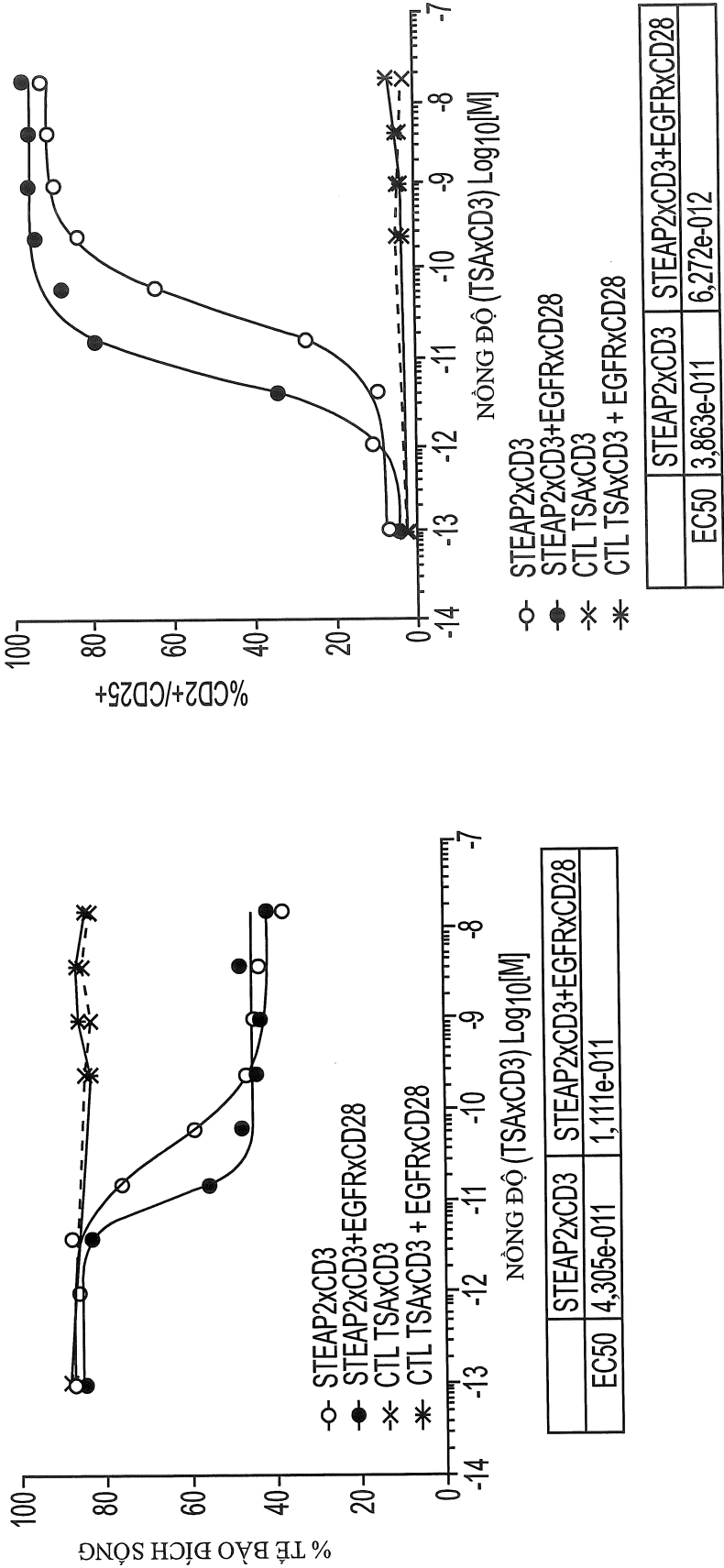


FIG. 14A

22RV1(với PSMAxCD3)

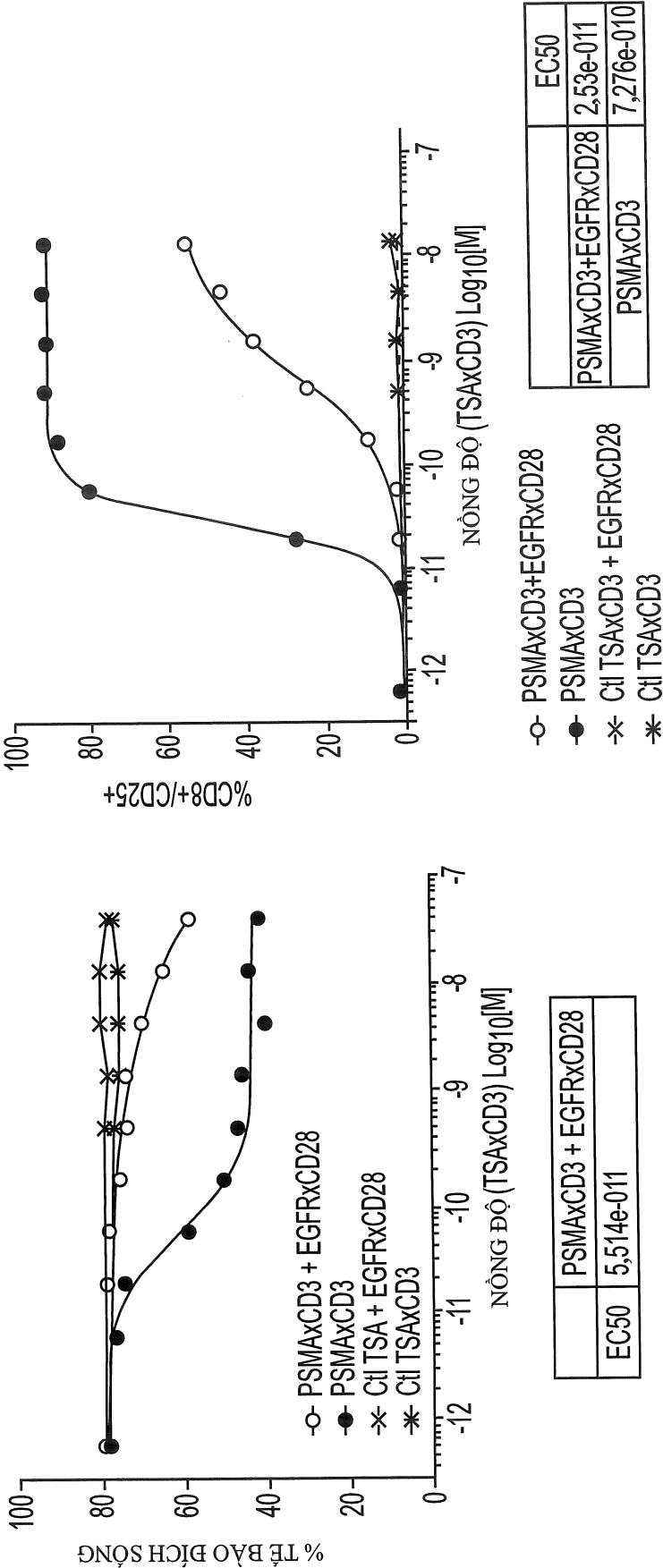


FIG. 14B

PEO1 (với MUC16 x CD3)

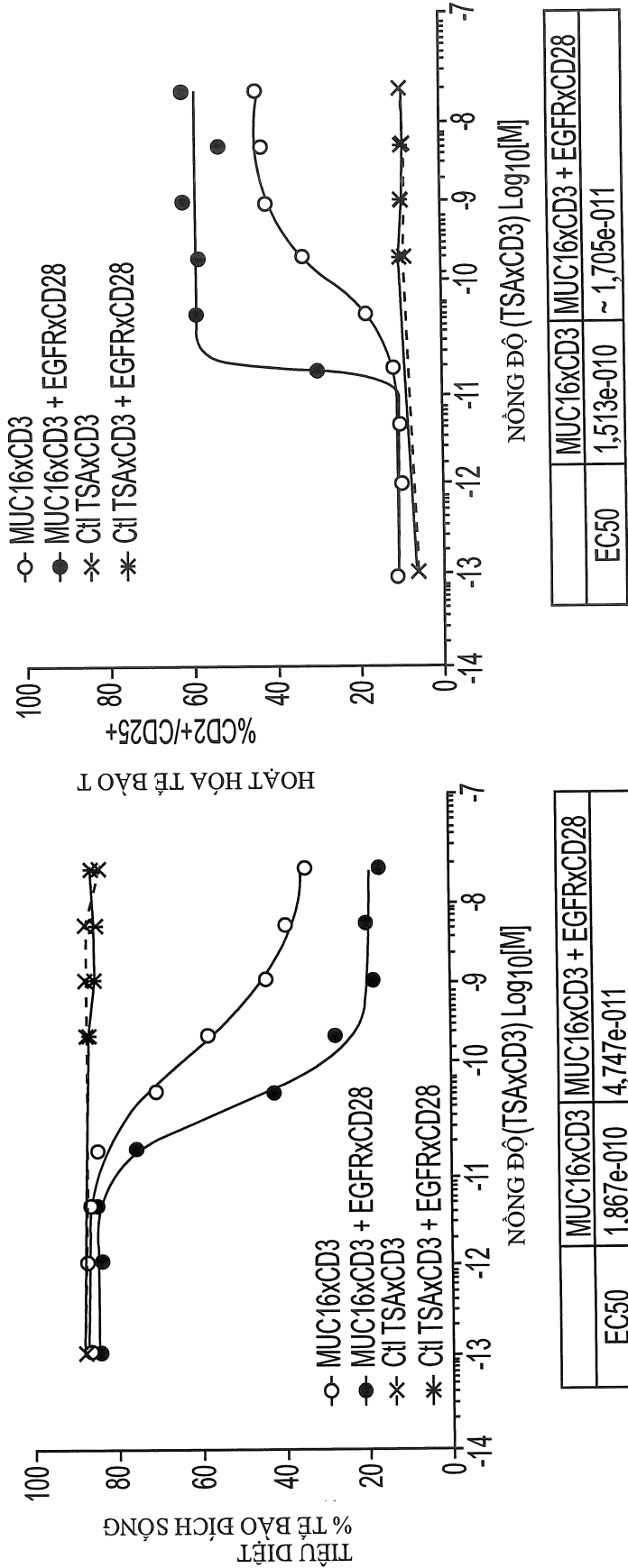


FIG. 15A

CAPAN2 (với MUC16 x CD3)

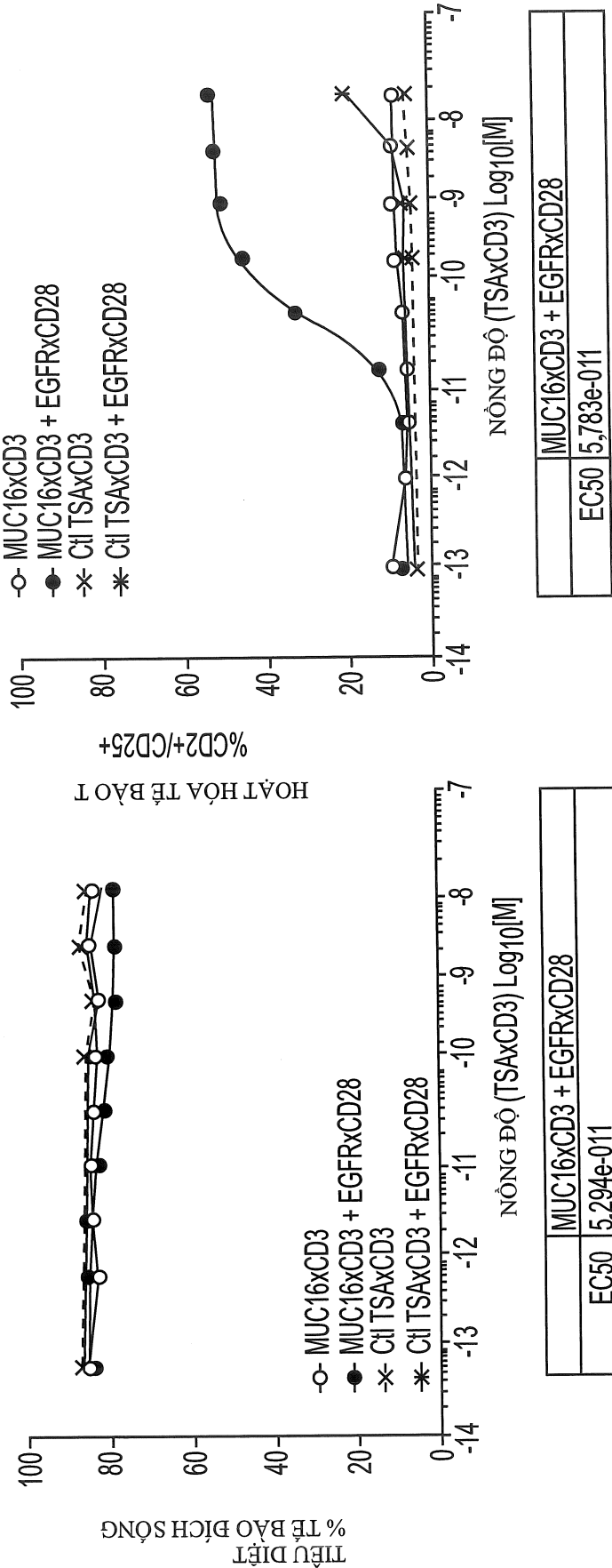


FIG. 15B

SW1990 (với MUC16 x CD3)

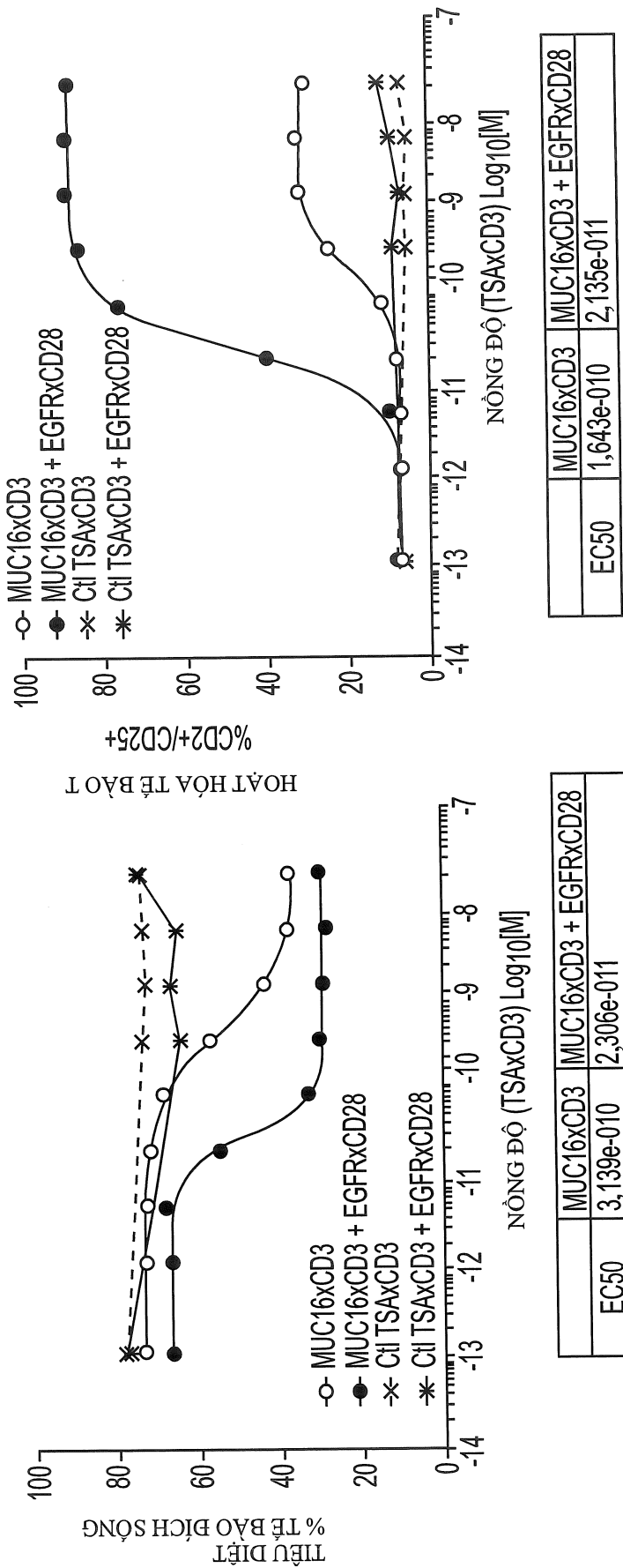


FIG. 15C

H292 (VỚI MUC16 x CD3)

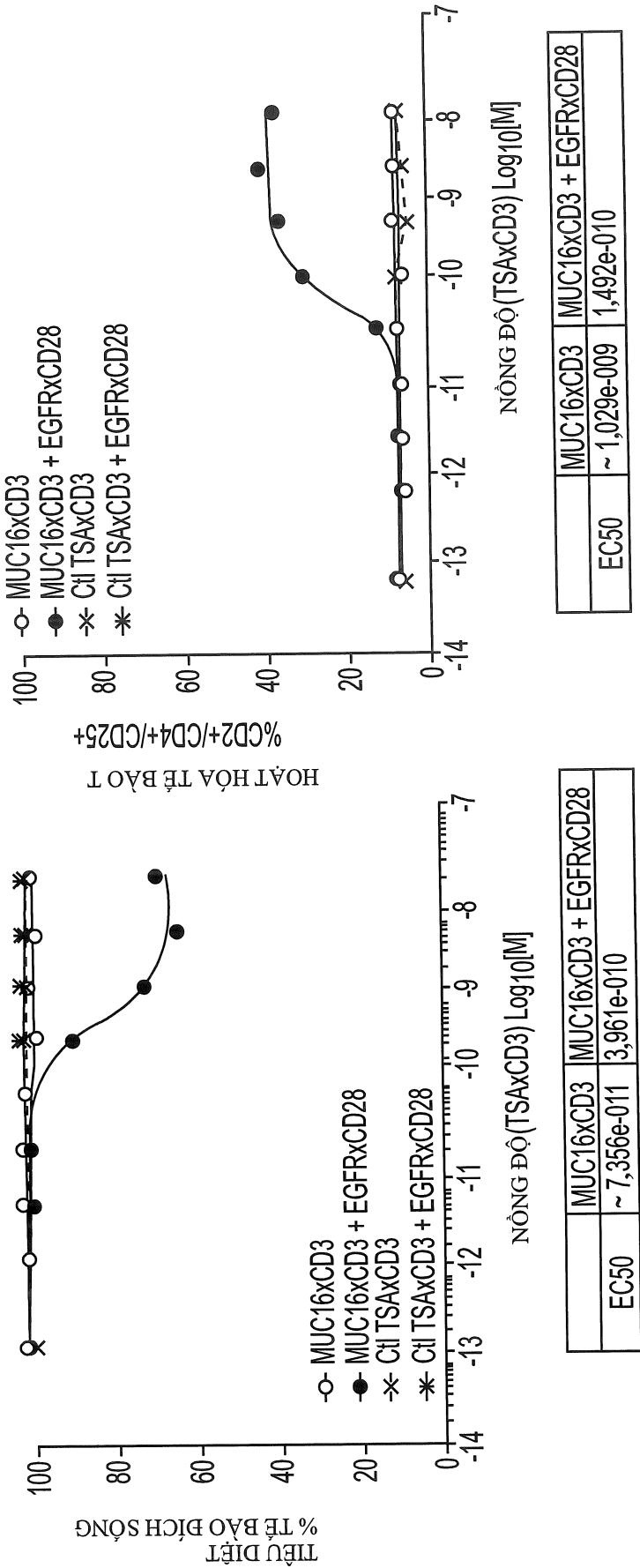


FIG. 15D

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
 SKOKOS, DIMITIS
 Haber, Laurie
 Lin, Chia-Yang
 MURPHY, ANDREW J.
 YANCOPOULOS, GEORGE D.

<120> KHÁNG THỂ ĐA ĐẶC HIỆU EGFR x CD28 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> 118003-10620

<140>

<141>

<150> 62/822,124

<151> 2019-03-22

<160> 72

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 1	
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtga ctccatcatt actttctact ggagctggat ccggcagccc	120
ccagggaggg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac caactacaat	180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca ggtctccctg	240
aaactgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agtgtccgag	300
gattcctact ttcactacgg gatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Arg Val Ser Glu Asp Ser Tyr Phe His Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 3

ggtgactcca tcattacttt ctac

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 4

Gly Asp Ser Ile Ile Thr Phe Tyr
1 5

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 5

atctattaca gtgggatcac c

21

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 6

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr
1 5

<210> 7

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 7

gcgagagtgt ccgaggattc ctactttcac tacgggatgg acgtc

45

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 8

Ala	Arg	Val	Ser	Glu	Asp	Ser	Tyr	Phe	His	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10				15	

<210> 9

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp

<400> 9

caggtgcagc	tcgaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctgggtg	ctccatcagt	agttactact	ggagctggat	cgggcagccc	120
ccagggaagg	gactggagtg	gattgggtat	atctattaca	gtgggatcac	ccactacaac	180
ccctccctca	agagtcgagt	caccatatca	gtagacacgt	ccaagatcca	gttctccctg	240
aagctgagtt	ctgtgaccgc	tgcggaacacg	gccgtgtatt	actgtgagag	atgggggggtt	300
cggaggggact	actactacta	cggtatggac	gtctggggcc	aagggaaccac	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

<210> 10

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 oligonucleotit tổng hợp

<400> 11

ggtaggctcca tcagtagtta ctac

24

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 12

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 13

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 13

gcgagatggg gggttcggag ggactactac tactacggta tggacgtc

48

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 14

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

<210> 15

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp

<400> 15

gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc

60

ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttata tcgcctggta ccagcagaag

120

ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc

180

gaccggttca gtggaagcgg aagcggaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag

240

ccagaggatt tcgccgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc

300

cagggcacga aggtagaaat caag

324

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 oligonucleotit tổng hợp

<400> 17

cagtcagtct ctagctctta t

21

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 18

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 19
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 19
ggggcaagt

9

<210> 20
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 20
Gly Ala Ser
1

<210> 21
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 21
caacagtacg gaagcagccc gtggacg

27

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 22
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 23
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 23
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtga ctccatcatt actttctact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaggg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac caactacaat 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca ggtctccctg 240
 aaactgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agtgtccgag 300
 gattcctact ttcactacgg gatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc ccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420
 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600
 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 tccaaatatg gtcccccattg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accatcagtc 720
 ttctctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
 tgctgtggtg tggacgtgag ccaggaagac ccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat ccaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctctta cagcaggctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagtcc 1320

ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

<210> 24

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Arg Val Ser Glu Asp Ser Tyr Phe His Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370

375

380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 25

<211> 1347

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 25

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc	120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggatcac ccactacaac	180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagatcca gttctccctg	240
aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag atgggggggtt	300
cggaggggact actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	360
tcctcagcct ctacaaaggg accttctgtg tttcctctgg ctccttggtc tagatctaca	420
tctgaatcta cagctgctct gggatgtctg gtgaaggatt attttctga acctgtgaca	480
gtgtcttgga attctggagc tctgacatct ggagtgcata catttctgc tgtgctgcag	540
tcttctggac tgtattctct gtcttctgtg gtgacagtgc cttcttcttc tctgggaaca	600
aagacatata catgtaatgt ggatcataag ctttctaata caaaggtgga taagagagtg	660
gaatctaagt atggacctcc ttgtcctcct tgtcctgctc ctctgtggc tggaccttct	720
gtgtttctgt ttcctcctaa gcctaaggat acactgatga tctctagaac acctgaagtg	780

```

acatgtgtgg tgggtggatgt gtctcaggaa gatcctgaag tgcagtttaa ttggtatgtg      840
gatggagtggt aagtgcataa tgctaagaca aagcctagag aagaacagtt taattctaca      900
tatagagtgg tgtctgtgct gacagtgtctg catcaggatt ggctgaatgg aaaggaatat      960
aagtgtgaagg tgtctaataa gggactgcct tcttctatcg aaaagacaat ctctaaggct     1020
aagggacagc ctagagaacc tcaggtgtat acactgcctc cttctcagga agaaatgaca     1080
aagaatcagg tgtctctgac atgtctgggtg aagggatttt atccttctga tatcgctgtg     1140
gaatgggaat ctaatggaca gcctgaaaat aattataaga caacacctcc tgtgctggat     1200
tctgatggat ctttttttct gtattctaga ctgacagtgg ataagtctag atggcaggaa     1260
ggaaatgtgt tttcttgttc tgtgatgcat gaagctctgc ataatagatt tacacagaag     1320
tctctgtctc tgtctcctgg aaagtag                                           1347

```

<210> 26

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 26

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

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

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

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

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

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 27

<211> 648

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp

<400> 27

gaaatagttt tgacacagag tcccggcaca ctgtcactct ctcccgggga aagagccacc	60
ttgtcatgta gagcaagtca gtcagtctct agctcttata tcgcctggta ccagcagaag	120
ccgggacagg cccctagact gctgatctac ggggcaagtt ccagggccac cggaatcccc	180
gaccggttca gtggaagcgg aagcggaacc gattttactt tgacgatttc tagactggag	240

ccagaggatt tcgccgttta ctattgtcaa cagtacggaa gcagcccgtg gacgtttggc 300
 cagggcacga aggtagaaat caagcgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 28

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polypeptit tổng hợp

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

115	120	125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
130	135	140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
145	150	155
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
165	170	175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
180	185	190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
195	200	205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 29

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp

<400> 29

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccggc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtacag cctctggatt caccttcagt acctttatta tgttctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg gactggaata tgtttcatcc attagtagta atgggggtac catatattat	180
gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctatat	240
cttcaaattg gcagcctgag agctgaggac atggctgtat attattgtac gagagggggc	300
gattttttgga gtggttatta tccttttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcacgcgc	360
tcctca	366

<210> 30

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Gly Gly Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 31

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 31

ggattcacct tcagttacctt tatt

<210> 32

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

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 32
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Ile
1 5

<210> 33
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 33
attagtagta atgggggtac cata

24

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 34
Ile Ser Ser Asn Gly Gly Thr Ile
1 5

<210> 35
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 35
acgagagggg gcgatttttg gagggttat tacccttttg actac

45

<210> 36

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 36
 Thr Arg Gly Gly Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 37
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccggc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt caccttcagt acctttatta tgttctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gactggaata tgtttcatcc attagtagta atgggggtac catatattat 180
 gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctatat 240
 cttcaaattg gcagcctgag agctgaggac atggctgtat attattgtac gagagggggc 300
 gattttttgga gtggttatta tccttttgac tactgggggc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctcagcct ccaccaaggc cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
 tccgagagca cagccgccct gggctgctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 600
 aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 660
 gagtccaaat atggtcccc atgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccatca 720
 gtcttcctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
 acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
 gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttctt ctacagcagg ctacaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260
gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1320
tccctctccc tgtctctggg taaatga 1347

<210> 38

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Gly Gly Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

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

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

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

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

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

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 39

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 39

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc	60
tcctgtacag cctccggatt ctccctcaga gacgcctgga tgacctgggt ccgccaggtt	120
ccaggaagc ggctggagtg ggttgccgt attaggaaca aaattgatgg tgggacgaca	180
gactacaata caccgtgaa agacagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg	240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ttgtaccaca	300
gatatttgga actacgttct cttctactac tacggtttgg acgtctgggg ccaagggacc	360
acggtcaccg tctcctca	378

<210> 40
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polypeptit tổng hợp

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Arg Asn Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Thr
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Asp Ile Trp Asn Tyr Val Leu Phe Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

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

<210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 oligonucleotit tổng hợp

<400> 41
 ggattctcct tcagagacgc ctgg

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 42
 Gly Phe Ser Phe Arg Asp Ala Trp
 1 5

<210> 43
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 oligonucleotit tổng hợp

<400> 43
 attaggaaca aaattgatgg tgggacgaca

30

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

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 44
 Ile Arg Asn Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 oligonucleotit tổng hợp

<400> 45
 accacagata tttggaacta cgttctcttc tactactacg gtttggacgt c

51

<210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 46
 Thr Thr Asp Ile Trp Asn Tyr Val Leu Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 47
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 47
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtacag cctccggatt ctccctcaga gacgcctgga tgacctgggt ccgccagggt 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaggaaca aaattgatgg tgggacgaca 180
 gactacaata caccctgaa agacagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ttgtaccaca 300
 gatatttgga actacgttct cttctactac tacggtttg acgtctgggg ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc 420
 tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
 gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctacgcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
 agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
 gacaagagag ttgagtccaa atatggtccc ccatgcccac cgtgcccagc accacctgtg 720

gcaggaccat cagtcttctt gttcccccca aaacccaagg acactctcat gatctcccgg 780
 acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc 840
 aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
 ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 960
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 1020
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag 1080
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca ggctcaccgt ggacaagagc 1260
 aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
 tacacacaga agtccctctc cctgtctctg ggtaaata 1359

<210> 48

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polypeptit tổng hợp

<400> 48

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Asn Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Thr
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Lys
450

<210> 49

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp

<400> 49

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctgatga ctccatcatt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccaggggaagg gactggaatg gattggatat atctattaca gtggg'gcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca ggtctcactg 240
 aagctgaact ctgtgattgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agtgtccgag 300
 gattcctact accactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 50

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polypeptit tổng hợp

<400> 50

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

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

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

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

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

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

Arg Val Ser Glu Asp Ser Tyr Tyr His Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 51
gatgactcca tcattagtta ctac

24

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 52
Asp Asp Ser Ile Ile Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 53
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
oligonucleotit tổng hợp

<400> 53
atctattaca gtgggcgcac c

21

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

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp

<400> 54
Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr
1 5

<210> 55
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 oligonucleotit tổng hợp

<400> 55
 gcgagagtgt ccgaggattc ctactaccac tacggatatg acgtc

45

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 56
 Ala Arg Val Ser Glu Asp Ser Tyr Tyr His Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polynucleotit tổng hợp

<400> 57
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgatga ctccatcatt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaaagg gactggaatg gattggatat atctattaca gtgggcgcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca ggtctcactg 240
 aagetgaact ctgtgattgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agtgtccgag 300
 gattcctact accactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggc caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420
 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 480
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

```

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag      600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag      660
tccaaatatg gtcccccatg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accatcagtc      720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag     1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag     1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc     1200
gacggctcct tcttcctcta cagcaggctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg     1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagtcc     1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga                                             1344

```

<210> 58

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 58

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

Arg Val Ser Glu Asp Ser Tyr Tyr His Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 59

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Ser Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Pro Asp Val Leu Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 61

Ile Ser Tyr Ala Gly Asn Asn Lys
 1 5

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 peptit tổng hợp

<400> 62

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

Ile

<210> 63

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polypeptit tổng hợp

<400> 63

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

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

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

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

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

```
<400> 66
Thr Arg Asp Asp Glu Leu Leu Ser Phe Asp Tyr
1          5          10
```

<210> 67
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 polypeptit tổng hợp

<400> 67
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 68
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo:
 6xHis tag

<400> 68
 His His His His His His
 1 5

<210> 69
 <211> 660

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 69

Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln
1				5					10					15	

Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His	Phe	Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn
			20					25					30		

Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg
		35					40					45			

Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr
	50					55					60				

Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val	Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu
65					70					75					80

Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala
				85					90					95	

Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn	Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro
			100					105					110		

Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn
		115					120					125			

Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val
	130					135					140				

Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met	Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu
145					150					155					160

Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp
				165					170					175	

Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln	Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala
			180					185					190		

Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys
 195 200 205

His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys
 210 215 220

Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys
 225 230 235 240

Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn
 245 250 255

Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro
 260 265 270

Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly
 275 280 285

Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys
 290 295 300

Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu
 305 310 315 320

Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys
 325 330 335

Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe
 340 345 350

Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
 355 360 365

Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln
 370 375 380

Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu
 385 390 395 400

Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val
 405 410 415

Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile
 420 425 430

Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala
 435 440 445

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr
 450 455 460

Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln
 465 470 475 480

Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro
 485 490 495

Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val
 500 505 510

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn
 515 520 525

Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn
 530 535 540

Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His
 545 550 555 560

Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met
 565 570 575

Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
 580 585 590

Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly
 595 600 605

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Cys
 610 615 620

Pro Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu
625 630 635 640

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Gly His His His His His
645 650 655

His Ser Ser Gly
660

<210> 70

<211> 24

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 70

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
1 5 10 15

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu
20

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 71

Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Val

<210> 72

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp

<400> 72

Cys	Asn	Val	Glu	Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe
1				5					10					15	

Leu	Ser	Asn	Met	Ser	Met
			20		