



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

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

(11)



1-0052697

(51)^{2022.01} A61P 35/00; C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2022-07822

(22) 28/05/2021

(86) PCT/US2021/034852 28/05/2021

(87) WO 2021/243204 02/12/2021

(30) 63/032,508 29/05/2020 US

(45) 27/10/2025 451

(43) 25/07/2023 424A

(73) 23ANDME, INC. (US)

223 N. Mathilda Ave., Sunnyvale, CA 94086, United States of America

(72) CHEN, Yu (US); FENAUX, Jilean, Beth (US); FUH-KELLY, Germaine (US);
HUANG, Yao-Ming (US); CHUNG, Wei-Jen (US); KARRER, Erik, Edward (US);
LAY, Cecilia (US); PITTS, Steven, J. (US); SCHARF, Louise (US).

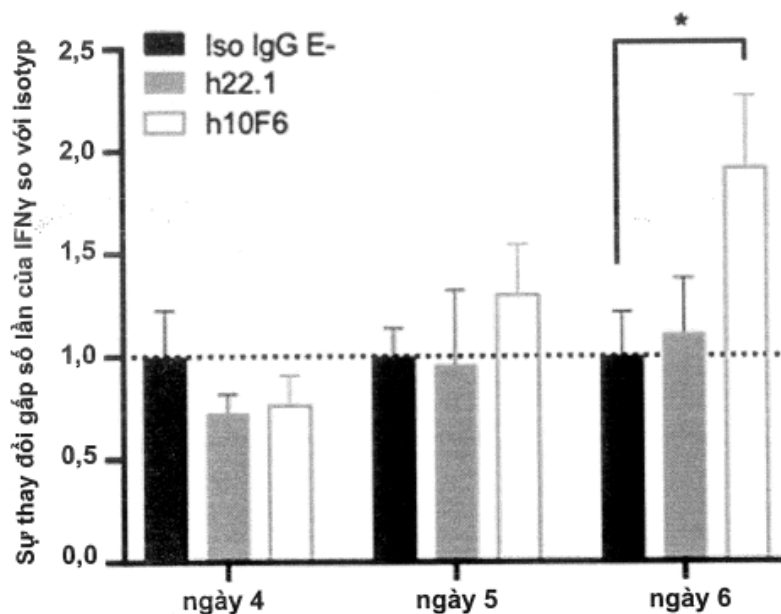
(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD200R1, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-07822

(57) Sáng chế đề cập đến các protein gắn kết, như các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên, gắn kết đặc hiệu với protein thụ thể CD200R1 của người (hu-CD200R1) và có khả năng làm giảm, ức chế, và/hoặc phong bế hoàn toàn tác dụng điều hòa miễn dịch qua trung gian hu-CD200R1. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể nêu trên và dược phẩm chứa kháng thể này dùng để điều trị bệnh và tình trạng bệnh đáp ứng với việc làm giảm, ức chế và/hoặc phong bế chức năng điều hòa miễn dịch hoặc hoạt tính do CD200 gắn kết với CD200R1 làm trung gian gây ra.

FIG. 8C



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến các protein gắn kết, như các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên, gắn kết với protein thụ thể CD200R1, phương pháp tạo ra và được phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể 1 của glycoprotein CD200 xuyên màng bề mặt tế bào (được gọi ở đây là “CD200R1” và còn được gọi trong lĩnh vực này là thụ thể 1 của CD200, CD200R, HCRTR2, OX2R, và MOX2R) là protein của người được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào tủy và tế bào T CD4+. CD200R1 là glycoprotein bề mặt tế bào chứa hai miền tương tự globulin miễn dịch. Cả CD200R và đối tác gắn kết của nó, CD200, đều là các glycoprotein màng được ghép cặp kiểu I được bảo toàn ở mức cao, gồm hai miền tương tự globulin miễn dịch (Ig) (V và C) thuộc về họ chung protein Ig. CD200R được biểu hiện chủ yếu trên tập hợp con của các tế bào T và các tế bào dòng tủy. Tuy nhiên, CD200 được biểu hiện rộng hơn trên nhiều loại tế bào khác nhau của người bao gồm các tế bào thần kinh, tế bào biểu mô, tế bào nội mô, nguyên bào sợi, và tế bào dạng lymphô. CD200R1 có tác dụng điều hòa sự biểu hiện của các phân tử tiền viêm như yếu tố hoại tử khối u (TNF- α), và interferon. Sự gắn kết của CD200R với phối tử CD200 của nó đã được phát hiện là truyền tín hiệu của hoạt tính ức chế miễn dịch bao gồm ức chế sự đáp ứng miễn dịch của tế bào T và hoạt tính gây độc tế bào của tế bào giết tự nhiên (natural killer: NK), kích thích đại thực bào tiết ra indolamin-2,3 dioxygenaza (indoleamine-2,3 dioxygenase: IDO), và tạo ra sự mở rộng của tế bào T điều hòa (Treg) (ví dụ, xem tài liệu: Gorczynski, “CD200:CD200R-mediated regulation of immunity.” ISRN Immunol. 2012; 2012). CD200 được hiểu là có chức năng kiểm soát miễn dịch đối với các tế bào đuôi gai và tế bào hiệu ứng dạng lymphô, điều biến sự hoạt hóa đáp ứng miễn dịch gây viêm và góp phần vào sự duy trì khả năng tự dung nạp (ví dụ, xem tài liệu: Rygiel TP, Meyaard L. “CD200R signaling in

tumor tolerance and inflammation: a tricky balance.” *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):233–8). CD200 được biểu hiện quá mức trong nhiều loại tế bào khối u dạng rắn và khối u huyết học, bao gồm bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính (chronic lymphocytic leukemia: CLL), bệnh đa u tủy (multiple myeloma: MM), bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (acute myeloid leukemia: AML) và các bệnh khác (ví dụ, xem tài liệu: McWhirter et al. “Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(4):1041–6). Việc phát hiện ra sự giảm mức độ đáp ứng của tế bào T gây độc tế bào (CTL) kháng khối u có tương quan với sự tiến triển của khối u xâm lấn, và sự giảm khả năng sống của bệnh nhân có liên quan với sự biểu hiện quá mức của CD200 trên các tế bào khối u và có tương quan với nhau. Theo đó, CD200 đã được hướng đích đối với các liệu pháp điều trị miễn dịch cho bệnh ung thư bao gồm sự phát triển kháng thể được làm cho giống với của người, Samalizumab, gắn kết đặc hiệu với CD200 và phong bế sự gắn của nó với CD200R1, và đang được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng để làm giảm gánh nặng khối u ở các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu dạng lymphô mạn tính (CLL) tiến triển (ví dụ, xem tài liệu: Mahadevan et al., “Phase I study of samalizumab in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: blockade of the immune checkpoint CD200,” *J. Immunotherapy Cancer* 7, 227 (2019)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu CD200R1 của người với ái lực cao. Các kháng thể này có khả năng làm giảm, ức chế, và/hoặc phong bế hoàn toàn tác dụng điều hòa miễn dịch qua trung gian CD200R1. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm và mô tả phương pháp điều trị bệnh và tình trạng bệnh đáp ứng với việc làm giảm, ức chế và/hoặc phong bế chức năng điều hòa miễn dịch hoặc hoạt tính qua trung gian CD200R1.

Theo ít nhất một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD200R1 bao gồm (i) vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ nhất (HVR-L1), vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ hai (HVR-L2), và vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ ba (HVR-L3), và/hoặc (ii) vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ nhất (HVR-H1),

vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ hai (HVR-H2), và vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ ba (HVR-H3), trong đó:

(a) vùng HVR-L1 chứa trình tự axit amin được chọn từ RASESVDYSGNSFMH (SEQ ID NO: 11), SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 19), RASKSISKYLA (SEQ ID NO: 27), RASKSISKYLA (SEQ ID NO: 35), QASHTINLN (SEQ ID NO: 43), QASHTINLN (SEQ ID NO: 51), RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO: 59), và RASESVDYSGNSFMH (SEQ ID NO: 77);

(b) vùng HVR-L2 chứa trình tự axit amin được chọn từ RASNLES (SEQ ID NO: 12), LTSKLAS (SEQ ID NO: 20), SGSTLQS (SEQ ID NO: 28), SGSTLQS (SEQ ID NO: 36), GTSNLED (SEQ ID NO: 44), GTSNLED (SEQ ID NO: 52), LASNLES (SEQ ID NO: 60), và RASNLES (SEQ ID NO: 78);

(c) vùng HVR-L3 chứa trình tự axit amin được chọn từ HQSNEDPPT (SEQ ID NO: 13), QQWSSYPLT (SEQ ID NO: 21), QQYNEYPWT (SEQ ID NO: 29), QQYNEYPWT (SEQ ID NO: 37), LQHTYLPWT (SEQ ID NO: 45), LQHTYLPWT (SEQ ID NO: 53), QHNRELLT (SEQ ID NO: 61), và HQSNWDPPT (SEQ ID NO: 79);

(d) vùng HVR-H1 chứa trình tự axit amin được chọn từ TNYAVS (SEQ ID NO: 15), KDDYMH (SEQ ID NO: 23), KDDYMH (SEQ ID NO: 31), KDDYIH (SEQ ID NO: 39), KDDYIH (SEQ ID NO: 47), TSYWMH (SEQ ID NO: 55), TSYVMF (SEQ ID NO: 63), TNYRVS (SEQ ID NO: 81), và TNYWVS (SEQ ID NO: 85);

(e) vùng HVR-H2 chứa trình tự axit amin được chọn từ VMWAGGGTNYNS (SEQ ID NO: 16), RIDPANDNTKYAP (SEQ ID NO: 24), RIDPENGNTKYGP (SEQ ID NO: 32), RIDPANGNTKYAP (SEQ ID NO: 40), RIDPANGNTKYAP (SEQ ID NO: 48), AIYPGNSDTNYNQ (SEQ ID NO: 56), YINPYNDDTKYNE (SEQ ID NO: 64), VMYAGGGTNYNS (SEQ ID NO: 82), và TMWAGGGTNYNS (SEQ ID NO: 86);

(f) vùng HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ ARERPLTGVMDDY (SEQ ID NO: 17), TRVEGRTGTYFDY (SEQ ID NO: 25), TRQLGLRRVWYALDY (SEQ ID NO: 33), ARQLGLRRTWYSLDY (SEQ ID NO: 41), TRQLGLRRTWYAMDY (SEQ ID NO: 49), TTAVGSY

(SEQ ID NO: 57), AREDYYGSRFVYW (SEQ ID NO: 65), ARERPLTGVM DN (SEQ ID NO: 83), và ARERPLTGPMDY (SEQ ID NO: 87).

Theo ít nhất một phương án của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể này bao gồm:

(a) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 15, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 16, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 17;

(b) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 19, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 20, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 21; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 23, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 24, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 25;

(c) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 27, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 28, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 29; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 31, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 32, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 33;

(d) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 35, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 36, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 37; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 39, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 40, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 41;

(e) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 43, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 44, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 45; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 47, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 48, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 49;

(f) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 51, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 52, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 53; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 55, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 56, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 57;

(g) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 59, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 60, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 61; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 63, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ

ID NO: 64, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 65;

(h) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 77, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 78, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 79; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 81, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 82, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 83;

(i) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 85, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 86, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 87;

(j) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 81, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 82, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 83; hoặc

(k) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 77, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 78, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 79; và/hoặc vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 85, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 86, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 87.

Theo ít nhất một phương án của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, hoặc 76; và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 67, 80, hoặc 84.

Theo ít nhất một phương án của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể này chứa:

- (a) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 10, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 14;
- (b) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 18, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình

tự SEQ ID NO: 22;

- (c) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 26, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 30;
- (d) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 34, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 38;
- (e) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 42, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 46;
- (f) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 50, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 54;
- (g) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 58, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 62;
- (h) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 66, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 67;
- (i) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 76, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 80;
- (j) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 66, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình

tự SEQ ID NO: 84;

- (k) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 66, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 80; hoặc
- (l) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 76, và/hoặc trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 84.

Theo ít nhất một phương án của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể này chứa trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (light chain: LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 68, 71, và 74; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (heavy chain: HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 69, 70, 72, 73, 75, 88, và 89.

Theo ít nhất một phương án của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể này chứa:

- (a) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 69;
- (b) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 70;
- (c) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 71; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 88;
- (d) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 71; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 72;
- (e) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 89;
- (f) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với

- trình tự SEQ ID NO: 68; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 73;
- (g) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 88;
- (h) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 71; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 89; hoặc
- (i) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 74; và/hoặc trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 75.

Theo ít nhất một phương án của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể này khác biệt bởi một hoặc nhiều đặc tính sau:

- (a) gắn kết với hu-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, và/hoặc 4;
- (b) gắn kết với hu-CD200R1-iso4 và hu-CD200R1-iso1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4 của trình tự SEQ ID NO: 1 và/hoặc 2, và polypeptit hu-CD200R1-iso1 của trình tự SEQ ID NO: 3 và/hoặc 4;
- (c) gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt và hu-CD200R1-iso4-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1, và polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2;
- (d) gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt, hu-CD200R1-iso4-Ref, hu-CD200R1-iso1-Alt, và hu-CD200R1-iso1-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn

- hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1, polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2, polypeptit hu-CD200R1-iso1-Alt của trình tự SEQ ID NO: 3, và polypeptit hu-CD200R1-iso1-Ref của trình tự SEQ ID NO: 4;
- (e) gắn kết với cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit cyno-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5;
- (f) gắn kết với hu-CD200R1 và cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R của trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, và/hoặc 4, và polypeptit cyno-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5;
- (g) phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1-iso4-Alt (SEQ ID NO: 1), hu-CD200R1-iso4-Ref (SEQ ID NO: 2), hu-CD200R1-iso1-Alt (SEQ ID NO: 3), và hu-CD200R1-iso1-Ref (SEQ ID NO: 4) được xác định bằng thử nghiệm ELISA với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 7nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 2nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM;
- (h) phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1 được biểu hiện trên tế bào với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,5nM; tùy ý, trong đó tế bào này là tế bào U937 biểu hiện ổn định hu-CD200R1;
- (i) gắn kết với các tế bào T của người với giá trị EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,5nM; tùy ý, trong đó các tế bào T của người là tế bào T CD4+ hoặc tế bào T CD8+;
- (j) làm gia tăng sự sản sinh IFN γ từ các tế bào khối u của người ít nhất là

1,2 lần, 1,5 lần, 2 lần, hoặc cao hơn, với nồng độ kháng thể nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, nhỏ hơn hoặc bằng 50nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM; tùy ý, trong đó loại tế bào khối u được chọn từ kết-trực tràng, màng trong tử cung, phổi, u melanin, buồng trứng, tụy, hoặc tuyến tiền liệt;

- (k) làm gia tăng sự sản sinh IFN γ và/hoặc IL-2 từ các tế bào T của người được phủ hu-CD200-Fc so với đối chứng IgG ít nhất là 1,2 lần, 1,5 lần, 2 lần, hoặc cao hơn;
- (l) làm gia tăng sự hoạt hóa các tế bào T CD4 $^{+}$ của người hoặc các tế bào T CD8 $^{+}$ của người ít nhất là 1,5 lần, ít nhất là 2 lần, ít nhất là 2,5 lần, ít nhất là 3 lần hoặc cao hơn;
- (m) không có hoạt tính chủ vận đối với sự truyền tín hiệu CD200R1;
- (n) phong bế sự cảm ứng hoạt tính của pDok2 trong các dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to U937 được điều trị bằng hu-CD200-Fc hòa tan; và/hoặc
- (o) phong bế sự phiên mã NF κ B do các dòng tế bào biểu hiện hu-CD200R1 gắn kết hu-CD200 gây ra; tùy ý, trong đó các dòng tế bào là tế bào thông báo K562 biểu hiện CD200R1 và tế bào 293T biểu hiện CD200.

Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị bằng ít nhất khoảng 1 mg/kg, ít nhất khoảng 2 mg/kg, ít nhất khoảng 10 mg/kg, ít nhất khoảng 20 mg/kg. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị bằng ít nhất khoảng 0,3mg, ít nhất khoảng 1,0mg, ít nhất khoảng 3,0mg, ít nhất khoảng 10mg, ít nhất khoảng 30mg, ít nhất khoảng 100mg, ít nhất khoảng 300mg, hoặc ít nhất khoảng 900mg. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị bằng ít nhất khoảng 10 mg/kg, ít nhất khoảng 20 mg/kg, hoặc ít nhất khoảng 100 mg/kg. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế với lượng có hiệu quả điều trị có hiệu quả ngoài đích không đáng kể. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế với liều không quá 10 mg/kg có hiệu quả ngoài đích không đáng kể. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế với liều không quá 20 mg/kg có hiệu quả ngoài đích không đáng kể.

Sáng chế cũng đề xuất các phương án của kháng thể kháng CD200R1, trong đó: (i) kháng thể là kháng thể đơn dòng; (ii) kháng thể là kháng thể của

người, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể thể khảm; (iii) kháng thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ của nhóm IgG, tùy ý, trong đó kháng thể nhóm IgG có isotyp được chọn từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, và IgG4 S228P và IgG4 S228P/L235E; (iv) kháng thể là biến thể vùng Fc, tùy ý, biến thể vùng Fc làm thay đổi chức năng hiệu ứng (ví dụ, biến thể dẫn đến kháng thể không có tác dụng), hoặc biến thể vùng Fc làm thay đổi thời gian bán hủy của kháng thể, hoặc biến thể vùng Fc làm thay đổi cả chức năng hiệu ứng và thời gian bán hủy của kháng thể, bao gồm cả trong tất cả các trường hợp mà trong đó vùng Fc có thể chứa hoặc có thể không chứa lysin ở đầu tận cùng C; (v) kháng thể là mảnh kháng thể, tùy ý được chọn từ nhóm bao gồm F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, kháng thể miền đơn (single domain antibody: VHH), và scFv; (vi) kháng thể là thể liên hợp miễn dịch, tùy ý, trong đó thể liên hợp miễn dịch này chứa chất điều trị để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh qua trung gian CD200R1; (vii) kháng thể là kháng thể đa đặc hiệu, tùy ý là kháng thể đặc hiệu kép; và (viii) kháng thể là kháng thể tổng hợp, trong đó các vùng HVR được ghép vào khung hoặc vùng khung khác với khung hoặc vùng khung của globulin miễn dịch; tùy ý, khung được chọn từ khung protein thay thế và khung polyme nhân tạo.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng CD200R1 được bộc lộ ở đây.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD200R1 như được bộc lộ ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể kháng CD200R1, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic (hoặc vector) mã hóa kháng thể kháng CD200R1 sao cho kháng thể được tạo ra.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 như được bộc lộ ở đây và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm này còn chứa chất điều trị để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 là chất có hoạt tính duy nhất của dược phẩm. Theo một số phương án, dược phẩm này chứa kháng thể kháng CD200R1 và chất có hoạt tính bổ sung ví dụ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế điểm kiểm soát

nhu kháng thể thứ hai có tính đặc hiệu đối với kháng nguyên là phân tử kiểm soát miễn dịch; tùy ý, trong đó phân tử kiểm soát miễn dịch được chọn từ PD-1, PDL-1/TIGIT, LAG3, PVRIg, KIR, TIM-3, CRTAM, CTLA-4, BTLA, CD96, CD244, CD160, LIGHT, GITR, 4-1BB, OX40, CD27, TMIGD2, ICOS, CD40, CD47, SIRPa, NKG2D, NKG2A, TNFRSF25, CD33, CEA, Epcam, GPC3, CD73, CD83, CD39, TRAIL, CD226, VEGF, và VISTA.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng CD200R1 như được bộc lộ ở đây, hoặc lượng có hiệu quả điều trị của dạng bào chế được phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 là chất có hoạt tính duy nhất được sử dụng cho đối tượng để điều trị tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra. Theo một số phương án, đối tượng được cho sử dụng nhiều hơn một chất có hoạt tính bao gồm, ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 2, lớn hơn hoặc bằng 3, lớn hơn hoặc bằng 4, hoặc lớn hơn hoặc bằng 5 chất có hoạt tính hữu hiệu để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra. Theo một số phương án, nhiều hơn một chất có hoạt tính được sử dụng cho đối tượng bao gồm kháng thể kháng CD200R1 và ít nhất một chất có hoạt tính bổ sung, như chất ức chế điểm kiểm soát, ví dụ, kháng thể có tính đặc hiệu đối với kháng nguyên là phân tử kiểm soát miễn dịch.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh do sự gắn kết của CD200 với CD200R1 làm trung gian gây ra được biểu hiện trên tế bào ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng CD200R1 như được bộc lộ ở đây, hoặc lượng có hiệu quả điều trị của dạng bào chế được phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 là chất có hoạt tính duy nhất được sử dụng cho đối tượng để điều trị cho đối tượng mắc bệnh do sự gắn kết của CD200 với CD200R1 làm trung gian gây ra được biểu hiện trên tế bào ở đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng được cho sử dụng nhiều chất có hoạt tính hữu hiệu để điều trị cho đối tượng này bao gồm, ví dụ, trong đó nhiều chất có hoạt tính bao gồm kháng thể kháng CD200R1 và

chất có hoạt tính bổ sung ví dụ như, nhưng không chỉ giới hạn ở ví dụ, chất ức chế điểm kiểm soát, kháng thể thứ hai có tính đặc hiệu đối với kháng nguyên là phân tử kiểm soát miễn dịch. Theo ít nhất một phương án, kháng thể kháng CD200R1 gắn kết với hu-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc 1×10^{-11} M; tùy ý, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với một hoặc nhiều thể đồng dạng bất kỳ trong số bốn thể đồng dạng hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, và/hoặc 4.

Theo một số phương án về việc sử dụng và phương pháp điều trị được bộc lộ ở đây, bệnh hoặc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra, hoặc các bệnh do CD200 làm trung gian gây ra có thể được điều trị bằng kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế, hoặc các dược phẩm của nó, bao gồm cả bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, các bệnh sacôm, bệnh ung thư có sự mất ổn định vi vệ tinh ở mức cao (microsatellite instability-high: MSI-H) (bao gồm cả bệnh ung thư MSI thể rắn), khối u có gánh nặng đột biến của khối u (tumor mutational burden: TMB) ở mức cao, bệnh ung thư do thiếu sự sửa chữa bất cặp sai (dMMR), bệnh ung thư não, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh caxinom tuyến EGJ, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư vùng dạ dày (ví dụ, bệnh caxinoit đường dạ dày-ruột (bệnh caxinoit GI)), bệnh ung thư vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tim, bệnh caxinom tế bào gan, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư gan, u melanin, u trung biểu mô (ví dụ, u trung biểu mô màng phổi), bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư buồng trứng biểu mô, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư thể rắn ở trẻ em, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư lách, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư tuyến giáp thể thủy hoặc bệnh ung thư tuyến giáp thể nang), các bệnh ung thư máu (ví dụ, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa (diffuse large B cell lymphoma: DLBCL), các bệnh bạch cầu, u lymphô, u tủy), bệnh caxinom tế bào thận, bệnh caxinom thận tế bào sáng, các khối u thần kinh nội tiết (ví dụ, u tế bào ưa crom và u cận hạch ác tính), và bệnh ung thư tử cung. Theo một số

phương án, bệnh ung thư được chọn từ bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ), bệnh ung thư da (ví dụ, u melanin), bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư buồng trứng, u trung biểu mô, và bệnh ung thư bàng quang.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A và **Fig.1B** thể hiện sự đóng thẳng hàng các trình tự miền VL và miền VH từ các kháng thể kháng CD200R1 được chọn của sáng chế và kháng thể có bán trên thị trường, OX108. Các vùng HVR được đánh dấu bằng màu xám và các vị trí được đánh số dựa trên cách đánh số của Kabat.

Fig.2 thể hiện sự đóng thẳng hàng các trình tự miền VL và miền VH của kháng thể kháng CD200R1 của chuột, 10F6, với các trình tự dòng mầm gần nhất của người, và các trình tự của phiên bản được làm cho giống với của người của 10F6. Các vị trí được đánh số dựa trên cách đánh số của Kabat.

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA để phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1 (thể đồng dạng 1 hoặc 4 và haplotyp Ref hoặc Alt) bằng kháng thể kháng CD200R1 được chọn của sáng chế. hu-CD200-Fc 1 $\mu\text{g/ml}$ được phủ trong đĩa. Hệ pha loãng theo bậc của kháng thể trong dung dịch với hu-CD200R1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$ hoặc 0,4 $\mu\text{g/ml}$) được ủ với hu-CD200-Fc đã gắn với đĩa. Kháng thể Streptavidin poly-HRP (Thermo-Fisher) được sử dụng để phát hiện.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm cho thấy khả năng của các kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế trong việc phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với các tế bào biểu hiện CD200R1.

Fig.5A và **Fig.5B** là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm cho thấy sự gắn kết của kháng thể kháng CD200R1 h10F6 và h22.1 với các tế bào T của người hoặc khỉ cyno

Fig.6 là đồ thị thể hiện dữ liệu cho thấy rằng việc điều trị bằng các kháng thể phong bế kháng CD200R1 dẫn đến sự hoạt hóa miễn dịch (sự tiết ra IFN γ tăng lên) của các mẫu tế bào PBMC sơ cấp được thu thập từ 9 bệnh nhân ung thư. Các tế bào PBMC được xử lý bằng kháng thể kháng CD200R1, h22.1 hoặc h10F6 nồng độ 100nM, hoặc đối chứng isotyp không có chức năng hiệu ứng, và

thử nghiệm được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 5.

Fig.7A, Fig.7B, Fig.7C, và Fig.7D là các đồ thị thể hiện rằng các kháng thể kháng CD200R1 hòa tan, h10F6 và h22.1, có thể phục hồi sự tiết ra IL-2 và IFN γ bị ức chế bởi CD200-Fc ở các tế bào T pan từ những người cho khỏe mạnh so với đối chứng isotyp (Lyso IgG). Các kháng thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng nồng độ đáp ứng liều cố định 100nM hoặc liều cao nhất. Các cột sai số được thể hiện là đại diện cho độ lệch chuẩn hoặc sai số chuẩn trung bình từ ba bộ mẫu. Phôi tử CD200-Fc được làm cho giống với của người đã gắn với đĩa ức chế chức năng của tế bào T pan. Nồng độ của IL-2 và IFN γ được xác định bằng thử nghiệm ELISA như được mô tả trong Ví dụ 5.

Fig.8A, Fig.8B, và Fig.8C là các biểu đồ thể hiện phương pháp xử lý các tế bào T bằng kháng thể kháng CD200R1, h10F6 và h22.1, sự biểu hiện bề mặt dẫn đến sự ức chế tế bào đuôi gai sinh dung nạp đối với các tế bào T hoặc sự hoạt hóa bằng các tế bào đuôi gai sinh miễn dịch. Sự biểu hiện của dấu ấn hoạt hóa tế bào T sớm CD69 trên các tế bào T CD8 $^{+}$ (xem **Fig.8A**) và dấu ấn tăng sinh Ki67 trên các tế bào T CD4 $^{+}$ (xem **Fig.8B**) với các kháng thể CD200R1 được cố định ở nồng độ 10 μ g/ml được so sánh với đối chứng isotyp (được đánh dấu dưới dạng IgG E $^{-}$). **Fig.8C** thể hiện mức độ giải phóng IFN γ được tính toán khi xử lý bằng kháng thể CD200R1 được cố định ở nồng độ 10 μ g/ml so với đối chứng isotyp (được đánh dấu ở đây dưới dạng Iso IgG E $^{-}$) 4, 5, và 6 ngày sau khi MLR

Fig.9 thể hiện nồng độ pDok2 được tạo ra sau khi điều trị 30 phút bằng 22.1 được làm cho giống với của người hòa tan (được thể hiện là sol 22.1 IgG trên hình vẽ), 10F6 được làm cho giống với của người (sol 10F6 IgG), OX108 (sol OX108 IgG), CD200-Fc (sol CD200Fc), và đối chứng isotyp IgG (sol Iso IgG). U937 biểu hiện ổn định CD200R1 được thể hiện là “CD200R $^{+}$ ” trên hình vẽ và được xử lý bằng hệ pha loãng 6 lần bắt đầu ở nồng độ 200nM. Các tế bào gốc được xử lý bằng liều cao nhất, 200nM, và được thể hiện là “WT” trên hình vẽ. Hàng trên cùng thể hiện pDok2 và hàng dưới cùng thể hiện Dok2 toàn phần.

Fig.10A và Fig.10B là đồ thị thể hiện dữ liệu cho thấy sự đối kháng của các kháng thể hòa tan kháng CD200R1 h10F6 và h22.1 đối với K562-CD200R1 được đồng nuôi cấy với các tế bào biểu hiện CD200. **Fig.10A**: thể hiện dạng

IgG của các kháng thể; **Fig.10B**: thể hiện dạng Fab của các kháng thể.

Fig.11 là đồ thị thể hiện dữ liệu từ các nghiên cứu được động học trên chuột của kháng thể kháng CD200R1, h10F6 và h22.1, được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 7.

Fig.12 thể hiện nồng độ h10F6 trong huyết thanh của hai con khỉ đực và hai con khỉ cái theo thời gian sau khi sử dụng h10F6 với liều 2 mg/kg hoặc 20 mg/kg của.

Fig.13 là đồ thị thể hiện dữ liệu từ các nghiên cứu đếm tế bào theo dòng của sự gắn kết h10F6 với kiểu phụ của tế bào T, được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 10.

Fig.14 thể hiện giá trị EC50 đối với sự gắn kết của các tế bào MoDC được ủ với các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 được biotinyl hóa và được nhuộm bằng thuốc nhuộm streptavidin-PE và thuốc nhuộm tỷ lệ sống/chết.

Fig.15 thể hiện các tế bào PBMC từ khỉ cynomolgus, khỉ rhesus, khỉ marmoset, chó săn thỏ, thỏ, và chuột Sprague-Dawley được ủ với h10F6 được biotinyl hóa nồng độ 50 hoặc 200nM hoặc đối chứng isotyp và được nhuộm bằng thuốc nhuộm streptavidin-PE và thuốc nhuộm tỷ lệ sống/chết.

Fig.16 thể hiện mức độ gắn kết của h10F6 với các tế bào CHO được chuyển nhiễm bằng CD200-R1 có chiều dài đầy đủ từ người, thỏ, khỉ marmoset, khỉ rhesus, hoặc khỉ cynomolgus và được ủ với các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 được biotinyl hóa, sau đó là thuốc nhuộm streptavidin-PE và tỷ lệ sống/chết.

Fig.17 thể hiện mức độ biểu hiện của CD200 trên TIL và tế bào PBMC ở các bệnh nhân ung thư và nhóm đối chứng khỏe mạnh. Sự biểu hiện của CD200 được đánh giá trong các tập hợp con của tế bào miễn dịch có nguồn gốc từ khối u và tế bào PBMC từ các bệnh nhân ung thư và tế bào PBMC từ các đối tượng khỏe mạnh. Các tập hợp con của tế bào miễn dịch đơn lẻ được tạo cổng dựa trên các tế bào T hỗ trợ CD45+ (CD3+CD4+), các tế bào T gây độc tế bào (CD3+CD8+), và các tế bào B (CD3-CD19+); các tế bào tủy được xác định là CD11b+, (dòng âm tính). Sự biểu hiện của CD200 khi được xác định bằng phương pháp MFI (cường độ phát huỳnh quang trung bình) được so sánh trên tập hợp con của TIL với các tế bào PBMC được ghép cặp.

Fig.18 thể hiện mức độ biểu hiện của CD200R1 được đánh giá trong các tập hợp con của tế bào miễn dịch có nguồn gốc từ khối u và các tế bào PBMC từ các bệnh nhân ung thư và các tế bào PBMC từ các đối tượng khỏe mạnh. Các tập hợp con của tế bào miễn dịch đơn lẻ được tạo cổng dựa trên các tế bào T hỗ trợ CD45+ (CD3+CD4+), các tế bào T gây độc tế bào (CD3+CD8+), và các tế bào B (CD3-CD19+); các tế bào tủy được xác định là CD11b+, (dòng âm tính). Sự biểu hiện của CD200R1 khi được xác định bằng phương pháp MFI (cường độ phát huỳnh quang trung bình) được so sánh trên tập hợp con của TIL với các tế bào PBMC được ghép cặp.

Fig.19 thể hiện dòng tế bào U937 được thiết kế để biểu hiện các nồng độ của hCD200R1 được dự kiến là quần thể biểu hiện cao (khoảng 28% tổng số tế bào T). Hình A thể hiện sự dịch chuyển các nồng độ khác nhau của hCD200-Fc được biotinyl hóa từ U937-CD

Fig.20 thể hiện mức độ gắn kết dưới dạng hàm số nồng độ của các DC được biệt hóa bằng bạch cầu đơn nhân to *in-vitro* được phép gắn kết với nồng độ h10F6 gia tăng.

Fig.21 thể hiện sự huy động gây phong bế của DOK2 với CD200R1 ở các tế bào Jurkat của người được thiết kế để biểu hiện CD200R1 và DOK2 được đồng nuôi cấy với các tế bào HEK293 biểu hiện CD200.

Fig.22 thể hiện hiệu quả của h10F6 đối với sự hoạt hóa NFκB do CD200-R1 gây ra của các đặc tính của dòng tế bào tủy của người, K562, được thiết kế để biểu hiện ổn định CD200R1 và gen thông báo NFκB-luxiferaza. Hình A thể hiện sự đồng nuôi cấy tế bào K562 biểu hiện CD200R1 với các tế bào HEK293T biểu hiện hoạt tính của gen thông báo NFκB do CD200 gây ra theo cách phụ thuộc số lượng tế bào. Hình B thể hiện khả năng của h10F6 trong việc phong bế sự truyền tín hiệu NFκB bằng cách sử dụng các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 hoặc đối chứng isotyp cho các tế bào K562 được đồng nuôi cấy biểu hiện CD200R1 với các tế bào HEK293T biểu hiện CD200.

Fig.23 thể hiện các bạch cầu đơn nhân to được biệt hóa thành các tế bào đuôi gai bằng cách nuôi cấy trong 7 ngày với GM-CSF 20 ng/ml và IL-4 20 ng/ml. Các tế bào đuôi gai được phân cực thành DC sinh dung nạp (với IL-10 và IFNα-2b nồng độ 20 ng/ml) hoặc được phân cực thành DC sinh miễn dịch

(với LPS 100 ng/ml và TNF- α 50 ng/ml). Sau 3 ngày phân cực, các tế bào T-pan và các tế bào DC trưởng thành được trộn lẫn với nhau theo tỷ lệ 20:1 (T:DC) với h10F6 10 μ g/ml hoặc đối chứng isotyp. Môi trường đã xử lý được thu hoạch sau 4, 5, và 6 ngày để xác định nồng độ xytokin. Các dấu ấn về sự hoạt hóa tế bào T được xác định bằng phương pháp phân tích FACS (kháng CD69, kháng CD25 và kháng Ki67). Cả dấu ấn về sự sản sinh xytokin (hình A; IFN γ , IL-12, và IL-18) và dấu ấn về sự hoạt hóa tế bào T (hình B, CD4+Ki67+ và CD8+CD69+) được xác định; mức độ tiết ra IFN γ theo thời gian vào các ngày 4, 5, và 6 (hình C) thể hiện sự phụ thuộc vào thời gian.

Fig.24 thể hiện các tế bào T-pan của người được phân lập từ người cho tế bào PBMC khỏe mạnh và được kích thích thường xuyên bằng PHA 2 μ g/ml và IL-2 của người 4 ng/ml trong 7 ngày trong môi trường hoàn chỉnh. Sau đó, các tế bào được thu hoạch, được để yên với các tác nhân kích thích và gắn mỗi với IL-4 của người 40 ng/ml trong 24 giờ. Trước khi đàn mỏng các tế bào, các đĩa được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bằng dòng OKT3 kháng CD3 1 μ g/ml và hCD200-Fc 15 μ g/ml hoặc đối chứng Fc được ghép cặp isotyp, được gọi là lớp phủ đối chứng được pha loãng trong PBS. Các tế bào được thu hoạch, rửa và đàn mỏng với 50nM kháng thể trong 24 giờ. Dịch nổi bề mặt tế bào được thu hoạch và sự tiết ra IL-2 được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Ở hình A, mức độ tiết ra IL-2 trung bình từ ba mẫu sinh học và SEM được vẽ biểu đồ đối với mỗi người cho. Kiểm định t-test không ghép cặp được thực hiện để xác định hiệu quả điều trị đáng kể của h10F6 so với đối chứng isotyp (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Ở hình B, đường cong đáp ứng liều đối với h10F6 trong việc phục hồi sự tiết ra IFN γ minh họa ba mẫu sinh học từ một người cho.

Fig.25 thể hiện sự gia tăng tỷ lệ tiêu diệt tế bào khối u bằng cách xử lý bằng các tế bào PBMC gắn mỗi với SEB bằng h10F6 (các tế bào khối u COV644 GFP+ biểu hiện nội sinh CD200) so với các tế bào PBMC được xử lý bằng đối chứng isotyp. Hình A thể hiện các đường cong về sự phát triển (được xác định bằng diện tích màu xanh lá cây trong mỗi lỗ) đối với các tế bào từ 1 đến 3 người cho (RG1212) được xử lý bằng nồng độ chỉ định của h10F6 hoặc đối chứng isotyp. Hình B thể hiện sự giảm mức độ phụ thuộc liều dùng của tín hiệu GFP của tế bào khối u được xác định bằng cách sử dụng diện tích màu

xanh lá cây dưới đường cong trong khung thời gian của pha tiêu diệt từ cùng người cho được thể hiện trong hình A (RG1212); các dữ liệu được vẽ đồ thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM của từ 4 đến 6 phép đo riêng biệt.

Fig.26 thể hiện tỷ lệ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC được gia tăng bởi h10F6 theo cách phụ thuộc nồng độ ở 3 người cho duy nhất (các hình vẽ từ A đến C). Sự gia tăng tỷ lệ % tế bào khối u bị giết trung bình từ $n = 4$ mẫu lặp được vẽ biểu đồ theo nồng độ h10F6 và được phân tách theo người cho (hình D). Dữ liệu từ các thử nghiệm lặp lại trong RG1939 ($N = 2$) và RG1307 ($N = 3$) được thu thập và làm khớp với mô hình hồi quy không tuyến tính ba giai đoạn. Tỷ lệ % tiêu diệt khối u lớn nhất và nhỏ nhất được làm khớp với mô hình và riêng biệt so với đối chứng isotyp được vẽ biểu đồ theo người cho để đánh giá phạm vi và tính biến đổi của hiệu quả của h10F6 giữa những người cho.

Fig.27 thể hiện kết quả của tế bào PBMC của khi được ủ với các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 được biotinyl hóa và được nhuộm bằng thuốc nhuộm streptavidin-PE, thuốc nhuộm tỷ lệ sống/chết, và hỗn hợp của các kháng thể có bán trên thị trường liên hợp với chất có huỳnh quang, bao gồm dòng SK7 kháng CD3, dòng M-T466 kháng CD4, dòng BW135/80 kháng CD8, dòng 2H7 kháng CD20, dòng M1/70 kháng CD11b, dòng TUK4 kháng CD14 và dòng REA-805 kháng HLA-DR. Các kiểu phụ của tế bào miễn dịch được định nghĩa là các tế bào T hỗ trợ ($CD3+CD4+$). Giá trị EC_{50} để gắn kết với tế bào T $CD4+$ của khi được xác định bằng cách sử dụng 3 tham số, $\log_{10}[h10F6]$ so với mức độ đáp ứng, sự làm khớp với đường cong không tuyến tính.

Fig.28 thể hiện khả năng của h10F6 trong việc phong bế sự gắn kết của MfCD200R1 được biotinyl hóa với MfCD200 gắn đuôi Fc, được cố định, khi được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA. Các hệ pha loãng theo bậc gấp bốn lần của h10F6 nằm trong khoảng từ $1\mu M$ đến $2,38 \times 10^{-7}\mu M$ được ủ sơ bộ với hCD200R1 ($0,04 \mu g/ml$) hoặc MfCD200R1 ($0,12 \mu g/ml$) trước khi bổ sung vào MfCD200 đã cố định với đĩa. Sự gắn kết được đánh giá bằng cách ủ với HRP-streptavidin và cơ chất so màu, sau đó theo dõi OD450 trong mỗi lỗ.

Fig.29 thể hiện kết quả về dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to của người, K562, được thiết kế để biểu hiện ổn định MfCD200R1. Sự gắn kết của

MfCD200 tái tổ hợp được dung hợp với đuôi Fc của hIgG1 không được glycosyl hóa với các tế bào K562 biểu hiện MfCD200R1 được khẳng định bằng phương pháp FACS. h10F6.V1 ức chế sự gắn kết của MfCD200-Fc với các tế bào K562 biểu hiện MfCD200R1 theo cách phụ thuộc liều dùng.

Fig.30 thể hiện nồng độ trong huyết thanh của h10F6.V1 trung bình và riêng biệt được vẽ đồ thị theo dạng đồ thị nửa loga. Giới hạn định lượng dưới (lower limit of quantitation: LLOQ) của thử nghiệm là 0,06 µg/ml.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể, bao gồm cả các kháng thể được làm cho giống với của người, gắn kết đặc hiệu CD200R1 với ái lực cao và nhờ đó ức chế, làm giảm, và/hoặc phong bế hoàn toàn chức năng của CD200R1 dưới dạng thụ thể bề mặt tế bào liên quan đến sự điều hòa miễn dịch, cụ thể là chức năng của CD200R1 làm chất ức chế sự hoạt hóa của tế bào lymphô (ví dụ, tế bào T và tế bào NK). Do đó, dự định rằng chế phẩm hoặc dạng bào chế bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc dạng bào chế chứa kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được sử dụng làm liệu pháp để điều trị các bệnh do chức năng của CD200R1 hoặc phối tử đích của nó, CD200, làm trung gian gây ra như các bệnh ung thư và bệnh nhiễm virus. Ngoài ra, dự định rằng kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được sử dụng làm liệu pháp kết hợp với các liệu pháp khác, như các kháng thể hướng đích phân tử kiểm soát miễn dịch đích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, và CRTAM. Trong số các liệu pháp được dự định bởi sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu gắn kết kháng CD200R1 của kháng thể theo sáng chế và tính đặc hiệu gắn kết khác của kháng thể với phân tử kiểm soát miễn dịch như PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, và CRTAM.

Tổng quan về các kỹ thuật và thuật ngữ

Đối với các phần mô tả ở đây và yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác. Do đó, ví dụ, sự viện dẫn đến “một protein” bao gồm cả nhiều hơn một protein, và sự viện dẫn đến “một hợp chất” để chỉ nhiều hơn một hợp chất. Cần lưu ý thêm rằng các điểm yêu cầu bảo hộ có thể được soạn thảo để loại trừ thành phần tùy

ý bất kỳ. Theo đó, tuyên bố này được dự định dùng làm cơ sở trước đây cho việc sử dụng thuật ngữ duy nhất như "chỉ có", "chỉ" và thuật ngữ tương tự liên quan đến việc nêu ra các thành phần của yêu cầu bảo hộ, hoặc việc sử dụng giới hạn "phủ định". Việc sử dụng các từ "chứa", "có chứa", "gồm có", "gồm", "bao gồm" và "bao gồm cả" có thể thay thế cho nhau và không dự định làm giới hạn. Cần hiểu thêm rằng khi phần mô tả của các phương án khác nhau sử dụng thuật ngữ "bao gồm", người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng trong một số trường hợp cụ thể, một phương án có thể được mô tả theo cách khác bằng cách sử dụng ngôn ngữ "chủ yếu bao gồm" hoặc "gồm có".

Khi một khoảng giá trị được đưa ra, nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác, cần hiểu rằng mỗi số nguyên xen giữa của giá trị này, và mỗi giá trị một phần mười của mỗi số nguyên xen giữa của giá trị này, nếu ngữ cảnh không chỉ rõ theo cách khác, nằm trong khoảng giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng này, và giá trị xen giữa hoặc được nêu khác bất kỳ nằm trong khoảng đã nêu này, được bao gồm trong sáng chế. Giới hạn trên và giới hạn dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể độc lập được đưa vào các khoảng nhỏ hơn, và cũng được bao gồm trong sáng chế, tùy thuộc giới hạn được loại trừ cụ thể bất kỳ trong khoảng đã nêu. Khi khoảng đã nêu bao gồm một hoặc cả hai giới hạn này, các khoảng loại trừ (i) một trong hai hoặc (ii) cả hai giới hạn được bao gồm như vậy cũng được bao gồm trong sáng chế. Ví dụ, "từ 1 đến 50" bao gồm "từ 2 đến 25", "từ 5 đến 20", "từ 25 đến 50", "từ 1 đến 10", v.v..

Nói chung, danh pháp được sử dụng ở đây và các kỹ thuật và quy trình được mô tả ở đây bao gồm các kỹ thuật và quy trình đã được hiểu rõ và thường được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như các kỹ thuật và phương pháp phổ biến được mô tả trong tài liệu: Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (sau đây được gọi là "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (được bổ sung đến năm 2011) (sau đây được gọi là "Ausubel"); Antibody Engineering, Vols. 1 and 2, R. Kontermann and S. Dubel, eds., Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg (2010); Monoclonal

Antibodies: Methods and Protocols, V. Ossipow and N. Fischer, eds., 2nd Ed., Humana Press (2014); Therapeutic Antibodies: From Bench to Clinic, Z. An, ed., J. Wiley & Sons, Hoboken, N.J. (2009); và Phage Display, Tim Clackson and Henry B. Lowman, eds., Oxford University Press, United Kingdom (2004).

Tất cả các tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, đơn sáng chế, và các tài liệu khác được đề cập trong đơn sáng chế này được đưa vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng cho tất cả các mục đích với phạm vi giống như mỗi tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, đơn sáng chế hoặc tài liệu khác riêng biệt được chỉ ra riêng biệt là được đưa vào đây để tham khảo ở đây cho tất cả các mục đích.

Nếu không được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa giống như thường được hiểu bởi một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không dự định làm giới hạn. Với mục đích giải thích đơn sáng chế này, phân mô tả các thuật ngữ sau đây sẽ được áp dụng và nếu thích hợp, một thuật ngữ được sử dụng ở dạng số ít cũng sẽ bao gồm dạng số nhiều và ngược lại.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “CD200R1” để chỉ thụ thể 1 của glycoprotein CD200 xuyên màng bề mặt tế bào, và bao gồm các protein CD200R1 của người, khỉ cynomolgus (trong một số trường hợp ở đây được gọi là “cyno”), khỉ rhesus, và các thể đồng dạng khác nhau của chúng. Các trình tự axit amin của các protein CD200R1 làm ví dụ khác nhau và các thể đồng dạng là đã biết trong lĩnh vực này và được cung cấp trong Bảng 2 dưới đây và Danh mục trình tự kèm theo.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra” hoặc “bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra” bao gồm tình trạng y tế bất kỳ liên quan đến sự gắn kết đặc hiệu của CD200R1 với phối tử (ví dụ, CD200). Ví dụ, sự gắn kết đặc hiệu của CD200 được biểu hiện trên bề mặt tế bào với các tế bào khác biểu hiện thụ thể CD200R1 có thể ảnh hưởng đến sự gắn kết của các tế bào biểu hiện CD200 với các phân tử điều hòa miễn dịch khác, có thể làm thay đổi sự hoạt hóa của các tế

bào lymphô (ví dụ, các tế bào T). Theo đó, các bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ qua trung gian và/hoặc đáp ứng với các chất đối kháng hoặc chất ức chế sự gắn kết giữa các tế bào biểu hiện CD200R1 hoặc CD200, và/hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ đáp ứng với sự ức chế của các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh ung thư. Các bệnh ung thư làm ví dụ cụ thể được cung cấp trong phần khác của bản mô tả này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân tử kiểm soát miễn dịch” để chỉ phân tử có chức năng điều hòa con đường của hệ miễn dịch và nhờ đó ngăn ngừa nó tấn công các tế bào theo cách không cần thiết. Nhiều phân tử kiểm soát miễn dịch, cả ức chế và đồng kích thích, là đích cho liệu pháp miễn dịch (ví dụ, với các kháng thể phong bế để phong bế sự ức chế miễn dịch hoặc với các chất chủ vận để thúc đẩy sự kích thích miễn dịch) trong việc điều trị bệnh ung thư và các bệnh nhiễm virus. Các phân tử kiểm soát miễn dịch làm ví dụ được hướng đích cho liệu pháp miễn dịch của bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, CRTAM, CTLA-4, BTLA, CD244, CD160, LIGHT, GITR, 4-1BB, OX40, CD27, TMIGD2, ICOS, CD40, CD47, SIRPa, NKG2D, NKG2A, TNFRSF25, CD33, CEA, Epcam, GPC3, CD73, CD83, CD39, TRAIL, CD226, và VISTA.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể” để chỉ phân tử chứa một hoặc nhiều chuỗi polypeptit gắn kết đặc hiệu với, hoặc có khả năng phản ứng miễn dịch với, kháng nguyên cụ thể. Các kháng thể làm ví dụ của sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm cho giống với của người, kháng thể của người, kháng thể đa đặc hiệu (hoặc dị liên hợp) (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), kháng thể đơn hóa trị (ví dụ, các kháng thể một nhánh), kháng thể đa hóa trị, các mảnh gắn kết kháng nguyên (ví dụ, các mảnh Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, và scFv), các thể dung hợp của kháng thể, và các kháng thể tổng hợp (hoặc chất bắt chước kháng thể).

Thuật ngữ “kháng thể kháng CD200R1” hoặc “kháng thể gắn kết CD200R1” để chỉ kháng thể gắn kết CD200R1 với ái lực đủ để kháng thể này

hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc chất điều trị trong việc hướng đích CD200R1. Theo một số phương án, mức độ gắn kết của kháng thể đặc hiệu kháng CD200R1 với kháng nguyên không liên quan, không phải CD200R1 là nhỏ hơn khoảng 20%, nhỏ hơn khoảng 15%, nhỏ hơn khoảng 10%, hoặc nhỏ hơn khoảng 5% mức độ gắn kết của kháng thể với CD200R1 khi được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay: RIA) hoặc phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance: SPR). Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với CD200R1 có hằng số phân ly (K_D) $< 1\mu\text{M}$, $< 100\text{nM}$, $< 10\text{nM}$, $< 1\text{nM}$, $< 0,1\text{nM}$, $< 0,01\text{nM}$, hoặc $< 1\text{pM}$ (ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-8} M , ví dụ, nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Các thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn” hoặc “kháng thể toàn phần” được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản là tương tự với cấu trúc của kháng thể tự nhiên hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc như được định nghĩa ở đây.

Thuật ngữ “mảnh kháng thể” để chỉ phần kháng thể có chiều dài đầy đủ có khả năng gắn kết với cùng kháng nguyên như kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')_2 ; kháng thể hai mảnh; kháng thể mạch thẳng; kháng thể đơn hóa trị, hoặc kháng thể một nhánh; các phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Thuật ngữ “nhóm” của kháng thể để chỉ loại của miền ổn định hoặc vùng ổn định được sở hữu bởi chuỗi nặng của nó. Có năm nhóm kháng thể chính là: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một số trong số chúng được chia nhỏ thêm thành các phân nhóm (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2. Miền ổn định của chuỗi nặng tương ứng với các nhóm khác nhau của globulin miễn dịch được gọi tương ứng là α , δ , ϵ , γ , và μ .

Thuật ngữ “vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có liên quan đến sự gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (tương ứng là V_H và V_L) của kháng thể tự nhiên thường có cấu trúc tương tự, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (framework region: FR) được bảo toàn và ba vùng

siêu biến (hypervariable region: HVR) (ví dụ, xem tài liệu: Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91). Miền đơn V_H hoặc V_L có thể là đủ để tạo ra tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Hơn nữa, các kháng thể gắn kết kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền V_H hoặc V_L từ kháng thể gắn kết kháng nguyên để sàng lọc thư viện của các miền V_L hoặc V_H bổ trợ tương ứng (ví dụ, xem tài liệu: Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991)).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR” để chỉ mỗi vùng của miền biến đổi của kháng thể có tính siêu biến trong trình tự và/hoặc tạo thành các vòng được xác định về mặt cấu trúc (“các vòng siêu biến”). Nói chung, các kháng thể tự nhiên chứa bốn chuỗi với sáu vùng HVR; ba vùng trong miền biến đổi của chuỗi nặng, V_H (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3), và ba vùng trong miền biến đổi của chuỗi nhẹ, V_L (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). Các vùng HVR thường chứa các gốc axit amin từ vòng siêu biến và/hoặc từ “vùng quyết định tính bổ trợ” (complementarity determining region: CDR). Có nhiều phần mô tả về vùng siêu biến hiện đang được sử dụng và được bao gồm trong bản mô tả này. Các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) của Kabat dựa trên sự biến đổi của trình tự và được sử dụng phổ biến nhất (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Thay vào đó, Chothia đề cập đến vị trí của các vòng cấu trúc (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Các vùng siêu biến AbM thể hiện sự ảnh hưởng giữa các vùng CDR của Kabat và các vòng cấu trúc của Chothia, và được sử dụng bởi phần mềm mô hình hóa kháng thể AbM của công ty Oxford Molecular. Các vùng siêu biến “tiếp xúc” dựa trên sự phân tích các cấu trúc tinh thể phức tạp sẵn có. Các gốc từ mỗi vùng siêu biến này được ghi chú trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: CD200R1, CD200, và các trình tự liên quan

Vòng	Kabat	AbM	Chothia	Tiếp xúc
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B ¹ H31-H35 ²	H26-H35B ¹ H26-H35 ²	H26-H32 ¹ H26-H32 ²	H30-H35B ¹ H30-H35 ²

H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
¹ Cách đánh số của Kabat				
² Cách đánh số của Chothia				

Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, các gốc của vùng HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc của vùng FR) được đánh số ở đây theo tài liệu của Kabat và các đồng tác giả trên đây.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các vùng siêu biến có thể bao gồm các vùng siêu biến mở rộng hoặc thay thế như sau: 24-36 hoặc 24-34 (L1), 46-56 hoặc 50-56 (L2) và 89-97 hoặc 89-96 (L3) trong miền V_L và 26-35 hoặc 30-35 (H1), 50-61, 50-65 hoặc 49-65 (H2) và 93-102, 94-102, hoặc 95-102 (H3) trong miền V_H . Các gốc của miền biến đổi được đánh số theo tài liệu của Kabat và các đồng tác giả trên đây, đối với mỗi định nghĩa này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng quyết định tính hỗ trợ” hoặc “CDR” để chỉ các vùng trong HVR của miền biến đổi có tính biến đổi của trình tự cao nhất và/hoặc có liên quan đến sự nhận biết kháng nguyên. Nói chung, các kháng thể tự nhiên chứa bốn chuỗi với sáu vùng CDR; ba vùng trong các miền biến đổi của chuỗi nặng, V_H (H1, H2, H3), và ba vùng trong các miền biến đổi của chuỗi nhẹ, V_L (L1, L2, L3). Các vùng CDR làm ví dụ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3) xuất hiện ở các gốc axit amin 24-34 của L1, 50-56 của L2, 89-97 của L3, 31-35 của H1, 50-61 của H2, và 95-102 của H3. (cách đánh số theo tài liệu của Kabat và các đồng tác giả trên đây).

Thuật ngữ “khung” hoặc “FR” để chỉ các gốc của miền biến đổi chứ không phải các gốc của vùng siêu biến (HVR). Vùng FR của miền biến đổi thường gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Theo đó, các trình tự của vùng HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau đây trong V_H (hoặc V_L): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ “kháng thể tự nhiên” để chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên. Ví dụ, các phân tử IgG tự nhiên là các glycoprotein dị tetrame có trọng lượng khoảng 150.000 Dalton, gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau được liên kết disulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận

cùng C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (V_H), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi của chuỗi nặng, sau đó là ba miền ổn định (CH1, CH2, và CH3). Tương tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (V_L), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ, sau đó là miền nhẹ ổn định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được gán cho một trong hai loại, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền ổn định của nó.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” để chỉ kháng thể thu được từ quần thể về cơ bản là đồng nhất của các kháng thể, nghĩa là các kháng thể riêng biệt chứa quần thể giống nhau và/hoặc gắn kết với cùng epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có (ví dụ, các kháng thể biến thể chứa sự đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng, và thường là có mặt với lượng rất nhỏ). Trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, thường bao gồm các kháng thể khác nhau kháng lại các yếu tố xác định khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng kháng lại một yếu tố xác định đối với kháng nguyên. Do đó, thuật ngữ “đơn dòng” thể hiện đặc tính của kháng thể khi thu được từ quần thể gần như đồng nhất của các kháng thể và không được hiểu là cần tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng các động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần locus của globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “kháng thể thể khảm” để chỉ kháng thể trong đó một phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ nguồn hoặc loài khác.

Thuật ngữ “kháng thể được làm cho giống với của người” để chỉ kháng thể thể khảm chứa các trình tự axit amin từ vùng HVR không phải của người và các trình tự axit amin từ vùng FR của người. Theo một số phương án nhất định,

kháng thể được làm cho giống với của người sẽ chứa gần như tất cả trong số ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng HVR tương ứng với các vùng của kháng thể không phải của người và tất cả hoặc gần như tất cả các vùng FR tương ứng với các vùng của kháng thể của người. Kháng thể được làm cho giống với của người có thể tùy ý chứa ít nhất một phần vùng ổn định của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể của người. Thuật ngữ “dạng được làm cho giống với của người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, để chỉ kháng thể được làm cho giống với của người.

Thuật ngữ “kháng thể của người” để chỉ kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể được sản sinh bởi người hoặc tế bào của người hoặc có nguồn gốc từ nguồn không phải người để sử dụng kho kháng thể của người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể của người khác. Định nghĩa này của kháng thể của người loại trừ cụ thể kháng thể được làm cho giống với của người chứa các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người.

Thuật ngữ “khung liên ứng của người” là khung thể hiện các gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong quá trình chọn lọc các trình tự khung V_L hoặc V_H của globulin miễn dịch của người. Nói chung, sự chọn lọc các trình tự V_L hoặc V_H của globulin miễn dịch của người là từ nhóm phụ của các trình tự miền biến đổi. Nói chung, nhóm phụ của các trình tự là nhóm phụ trong tài liệu: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91- 3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một số phương án đối với V_L , nhóm phụ là nhóm phụ kappa I như trong tài liệu của Kabat và các đồng tác giả trên đây. Theo một số phương án đối với V_H , nhóm phụ là nhóm phụ III như trong tài liệu của Kabat và các đồng tác giả trên đây.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khung của người nhận” là khung chứa trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (V_H) có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người. Khung của người nhận “có nguồn gốc từ” khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể chứa cùng trình tự axit amin của nó, hoặc nó có thể chứa sự thay đổi về trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lần thay đổi axit amin

là nhỏ hơn hoặc bằng 10, nhỏ hơn hoặc bằng 9, nhỏ hơn hoặc bằng 8, nhỏ hơn hoặc bằng 7, nhỏ hơn hoặc bằng 6, nhỏ hơn hoặc bằng 5, nhỏ hơn hoặc bằng 4, nhỏ hơn hoặc bằng 3, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2. Theo một số phương án, khung của người nhận V_L là giống về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch của người V_L hoặc trình tự khung liên ứng của người.

Thuật ngữ “vùng Fc” để chỉ phức hợp dime chứa các trình tự polypeptit ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch, trong đó có thể thu được trình tự polypeptit ở đầu tận cùng C bằng cách phân giải kháng thể nguyên vẹn bằng papain. Vùng Fc có thể chứa các trình tự Fc nguyên thể hoặc biến thể. Mặc dù ranh giới của trình tự Fc của chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể thay đổi, trình tự Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định là đoạn kéo dài từ gốc axit amin ở khoảng vị trí Cys226, hoặc từ khoảng vị trí Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của trình tự Fc. Tuy nhiên, lysin ở đầu tận cùng C (Lys447) của trình tự Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trình tự Fc của globulin miễn dịch thường chứa hai miền ổn định, miền CH2 và miền CH3, và tùy ý chứa miền CH4.

Thuật ngữ “thụ thể Fc” hoặc “FcR” để chỉ thụ thể gắn kết với vùng Fc của kháng thể. Theo một số phương án, FcR là thụ thể FcR tự nhiên của người. Theo một số phương án, FcR là thụ thể gắn kết kháng thể IgG (thụ thể gamma) và bao gồm các thụ thể của phân nhóm Fc γ RI, Fc γ RII, và Fc γ RIII, bao gồm cả các biến thể dạng alen và theo cách khác, các dạng ghép nối của các thụ thể này. Các thụ thể Fc γ RII bao gồm Fc γ RIIA (“thụ thể hoạt hóa”) và Fc γ RIIB (“thụ thể ức chế”), có các trình tự axit tương tự khác nhau chủ yếu ở các miền chất tế bào của chúng. Thụ thể hoạt hóa Fc γ RIIA chứa motif hoạt hóa trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM) trong miền chất tế bào của nó. Thụ thể ức chế Fc γ RIIB chứa motif ức chế trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM) trong miền chất tế bào của nó, (ví dụ, xem tài liệu: Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, FcR cũng bao gồm thụ thể sơ sinh, FcRn, thụ thể này chịu trách nhiệm vận chuyển các IgG của mẹ đến thai nhi (Guyer et al, J. Immunol. 1 17:587 (1976) và Kim et al, J. Immunol. 24:249 (1994)) và điều hòa tính nội cân bằng của

globulin miễn dịch. Các thụ thể FcR được xem xét, ví dụ, trong các tài liệu: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); và de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này “kháng thể đa hóa trị” là kháng thể chứa ba vị trí gắn kết kháng nguyên trở lên. Tốt hơn là kháng thể đa hóa trị được thiết kế để có ba vị trí gắn kết kháng nguyên trở lên và thường không là kháng thể IgM hoặc IgA có trình tự nguyên thể.

Thuật ngữ “kháng thể đa đặc hiệu” là kháng thể có ít nhất hai vị trí gắn kết khác nhau, mỗi vị trí có tính đặc hiệu gắn kết khác nhau. Kháng thể đa đặc hiệu có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh kháng thể, và mỗi vị trí gắn kết khác nhau có thể gắn kết với kháng nguyên khác nhau hoặc các vị trí gắn kết khác nhau này có thể gắn kết với hai epitop khác nhau của cùng kháng nguyên.

Thuật ngữ “mảnh Fv” để chỉ mảnh kháng thể chứa vị trí gắn kết và nhận biết kháng nguyên hoàn chỉnh. Vùng này gồm dime của một miền biến đổi chuỗi nặng và một miền biến đổi chuỗi nhẹ với sự kết hợp chặt chẽ, để có thể có tính chất cộng hóa trị, ví dụ, trong scFv. Trong cấu hình này, có ba vùng HVR của mỗi miền biến đổi tương tác để xác định vị trí gắn kết kháng nguyên trên bề mặt của dime V_H - V_L . Nói chung, sáu vùng HVR hoặc tập hợp con của chúng tạo ra tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên với kháng thể. Tuy nhiên, ngay cả một miền biến đổi (hoặc một nửa Fv chỉ chứa ba vùng HVR đặc hiệu với kháng nguyên) cũng có khả năng nhận biết và gắn kết kháng nguyên, mặc dù thường là với ái lực thấp hơn so với vị trí gắn kết hoàn toàn.

Thuật ngữ “mảnh Fab” để chỉ mảnh kháng thể chứa miền biến đổi và miền ổn định của chuỗi nhẹ và miền biến đổi và miền ổn định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. “Các mảnh $F(ab')_2$ ” chứa cặp mảnh Fab thường được liên kết cộng hóa trị ở gần đầu tận cùng carboxy của chúng bằng các gốc xystein ở bản lề giữa chúng. Các sự ghép đôi hóa học khác của mảnh kháng thể là cũng đã biết trong lĩnh vực này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này “nhánh gắn kết kháng nguyên” để chỉ thành phần của kháng thể có khả năng gắn kết đặc hiệu phân tử đích quan

tâm. Thông thường, nhánh gắn kết kháng nguyên là phức hợp của các trình tự polypeptit của globulin miễn dịch, ví dụ, các trình tự của vùng HVR và/hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch.

Thuật ngữ “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” để chỉ các mảnh kháng thể chứa miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Nói chung, polypeptit Fv còn chứa nhóm liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L cho phép scFv tạo thành cấu trúc gắn kết kháng nguyên mong muốn.

Thuật ngữ “kháng thể hai mảnh” để chỉ các mảnh kháng thể nhỏ có hai vị trí gắn kết kháng nguyên, các mảnh này chứa miền biến đổi của chuỗi nặng (V_H) được liên kết với miền biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) trong cùng chuỗi polypeptit (V_H và V_L). Bằng cách sử dụng nhóm liên kết quá ngắn để cho phép bắt cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền này bị bắt buộc ghép cặp với các miền bổ trợ của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể mạch thẳng” để chỉ các kháng thể được mô tả trong tài liệu: Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995). Tóm lại, các kháng thể này chứa cặp đoạn Fd ghép đôi ($VH-CH1-VH-CH1$), cùng với các polypeptit của chuỗi nhẹ bổ trợ, tạo thành cặp vùng gắn kết kháng nguyên. Kháng thể mạch thẳng có thể có tính đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn.

Thuật ngữ “kháng thể trần” để chỉ kháng thể không được liên hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ.

Thuật ngữ “ái lực” để chỉ độ bền của tổng mức độ tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên. “Ái lực gắn kết” để chỉ ái lực gắn kết nội tại phản ánh sự tương tác theo tỷ lệ 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X với đối tác Y của nó thường được thể hiện bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D). Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp phổ biến đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm cả các phương pháp được mô tả ở đây. Các phương án làm ví dụ và minh họa cụ thể để xác định ái lực gắn kết được mô tả trong phần sau.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” hoặc “sự gắn kết đặc hiệu” để chỉ sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên với ái lực không lớn hơn khoảng 1×10^{-7}

M. Theo một số phương án, kháng thể có thể có ái lực phụ đối với kháng nguyên khác với kháng nguyên mà nó gắn kết đặc hiệu với, trong đó “ái lực phụ” sẽ thường để chỉ sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên phụ có giá trị ái lực lớn hơn khoảng 10nM như được mô tả trong phần khác trong bản mô tả này. Tuy nhiên, khi kháng thể có thể có ái lực phụ đối với kháng nguyên phụ, kháng thể này sẽ vẫn gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên chính.

Thuật ngữ kháng thể “trưởng thành ái lực” để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều vùng HVR, so với kháng thể gốc không có các thay đổi này, như các thay đổi dẫn đến sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Thuật ngữ “vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng” của kháng thể là vị trí có khả năng gắn kết kháng nguyên đích. Ái lực gắn kết kháng nguyên của vị trí gắn kết kháng nguyên không nhất thiết phải mạnh bằng kháng thể gốc mà vị trí gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ đó, nhưng khả năng gắn kết kháng nguyên phải xác định được bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp khác nhau đã biết để đánh giá sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể được phân lập” để chỉ kháng thể được tách ra khỏi thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% khi được xác định bằng, ví dụ, phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, phương pháp hội tụ đẳng điện (isoelectric focusing: IEF), phương pháp điện di mao quản) hoặc phương pháp sắc ký (ví dụ, phương pháp HPLC trao đổi ion hoặc pha ngược). Để tham khảo các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gần như tương tự” hoặc “gần như giống với” để chỉ tính tương tự ở mức đủ cao giữa hai giá trị bằng số (ví dụ, một giá trị liên quan đến kháng thể thử nghiệm và giá trị còn lại liên quan đến kháng thể tham chiếu), sao cho một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xem xét sự khác biệt giữa hai giá trị là ít có ý nghĩa hoặc không có ý nghĩa về mặt sinh học và/hoặc có ý nghĩa thống kê trong ngữ cảnh đặc tính sinh học được xác định bằng các giá trị nêu trên (ví dụ, các giá trị K_D).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khác biệt đáng kể” để chỉ sự khác biệt ở mức đủ cao giữa hai giá trị bằng số (thường là một giá trị liên quan đến phân tử và giá trị còn lại liên quan đến phân tử tham chiếu) sao cho một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ xem xét sự khác biệt giữa hai giá trị là có ý nghĩa thống kê trong ngữ cảnh đặc tính sinh học được xác định bằng các giá trị nêu trên (ví dụ, các giá trị K_D).

Thuật ngữ “chức năng hiệu ứng” để chỉ các hoạt tính sinh học được cho là do vùng F_c của kháng thể, vùng này thay đổi theo isotyp của kháng thể. Ví dụ về các chức năng hiệu ứng của kháng thể bao gồm: sự gắn kết Clq và tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity: CDC); sự gắn kết của thụ thể F_c ; tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC); sự thực bào; sự điều hòa giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và sự hoạt hóa tế bào B.

Thuật ngữ “thể liên hợp miễn dịch” để chỉ kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất gây độc tế bào.

Các thuật ngữ “sự điều trị”, “điều trị” hoặc “việc điều trị” để chỉ sự can thiệp lâm sàng với nỗ lực làm thay đổi tiến trình tự nhiên của rối loạn ở đối tượng cần được điều trị và có thể được thực hiện để phòng bệnh hoặc trong quá trình diễn biến của bệnh lý trong lâm sàng. Các kết quả điều trị mong muốn có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc phòng ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của rối loạn, làm giảm các triệu chứng, làm giảm hậu quả bệnh lý theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của rối loạn, phòng ngừa sự di căn, làm giảm tốc độ tiến triển, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm bệnh hoặc sự tiên lượng được cải thiện. Ví dụ, việc điều trị có thể bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của dạng bào chế được phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 để làm chậm sự phát triển hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh trong đó CD200R1 có thể đóng vai trò trong sinh bệnh học và/hoặc sự tiến triển.

Thuật ngữ “dạng bào chế dược phẩm” để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép

hoạt tính sinh học của (các) thành phần hoạt tính có hiệu quả, và không chứa các thành phần bổ sung có độc tính cho đối tượng được cho sử dụng dạng bào chế này. Dạng bào chế được phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất có hoạt tính. Ví dụ, dạng bào chế được phẩm có thể bao gồm kháng thể kháng CD200R1 làm chất có hoạt tính duy nhất của dạng bào chế này hoặc có thể bao gồm kháng thể kháng CD200R1 và một hoặc nhiều chất có hoạt tính bổ sung, ví dụ như chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất có hoạt tính duy nhất” có nghĩa là chất được đề cập là chất duy nhất có mặt trong dạng bào chế, hoặc được sử dụng trong liệu pháp để tạo ra, hoặc được cho là sẽ tạo ra, hiệu quả được lý liên quan để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng bệnh này, phù hợp với sự mô tả về “việc điều trị” như được đưa ra ở đây. Dạng bào chế được phẩm chứa chất có hoạt tính duy nhất không loại trừ sự có mặt của một hoặc nhiều chất không có hoạt tính, ví dụ như chất mang được dụng, trong dạng bào chế này. Thuật ngữ “chất không có hoạt tính” là chất được cho là sẽ không tạo ra, hoặc theo cách khác, góp phần đáng kể vào hiệu quả được lý liên quan được dự định để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng bệnh này.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” để chỉ thành phần trong dạng bào chế được phẩm, khác với thành phần có hoạt tính, thành phần này không có độc tính với đối tượng được cho sử dụng. Chất mang được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất ổn định hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” để lượng thành phần hoặc chất có hoạt tính (ví dụ, dạng bào chế được phẩm) để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng ngừa mong muốn, ví dụ, để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng. Trong trường hợp bệnh hoặc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra, lượng có hiệu quả điều trị của chất điều trị là lượng làm giảm, phòng ngừa, ức chế và/hoặc làm giảm đến mức độ nhất định một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh. Đối với liệu pháp điều trị bệnh ung thư, hiệu quả *in vivo* có thể được xác định, ví dụ, bằng cách đánh giá sự phát triển của khối u nguyên phát, sự xuất hiện và/hoặc sự phát triển của (các) khối u thứ phát, sự xuất hiện và/hoặc số lượng khối u di căn, khoảng thời gian, mức độ nặng, và/hoặc sự tái phát của các

triệu chứng, tỷ lệ đáp ứng (response rate: RR), khoảng thời gian đáp ứng, và/hoặc chất lượng cuộc sống.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đồng thời” để chỉ việc sử dụng hai hoặc nhiều chất điều trị, trong đó ít nhất một phần của việc sử dụng là trùng lặp về thời gian. Theo đó, việc sử dụng đồng thời bao gồm chế độ dùng liều khi sử dụng một hoặc nhiều chất liên tục sau khi ngừng sử dụng một hoặc nhiều chất khác.

Thuật ngữ “cá nhân” hoặc “đối tượng” để chỉ động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật nuôi (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), các động vật linh trưởng (ví dụ, động vật linh trưởng là người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột thường).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. CD200R1

CD200R1 của người (“hu-CD200R1”) là glycoprotein xuyên màng được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào, đặc biệt là các tế bào tủy và tế bào T. Trình tự Uniprot của hu-CD200R1 là Q8TD46-1 mã hóa thể đồng dạng 325 axit amin được gọi là thể đồng dạng 1. Trình tự Uniprot của hu-CD200R1 là Q8TD46-4 mã hóa thể đồng dạng 348 axit amin được đề cập dưới dạng thể đồng dạng 1. Tuy nhiên, quan sát được thể đồng dạng hu-CD200R1 chủ yếu ở quần thể của người, là biến thể của trình tự 348 axit amin của thể đồng dạng 4 của trình tự UniProt Q8TD46-4 với sự thay thế E335Q. Biến thể của thể đồng dạng 4 này (Q8TD46-4 + E335Q) thể hiện một trong hai haplotyp chính chiếm > 99% của tất cả các đối tượng được quan sát trong dự án 1000 hệ gen (<https://www.internationalgenome.org/>). Quan sát được haplotyp này (được gọi ở đây là “Alt”) thường xuyên nhất ở các đối tượng có tổ tiên ở châu Âu với tần suất 0,54. Quan sát được haplotyp chính khác (được gọi ở đây là “Ref”) ở các đối tượng có tổ tiên ở châu Âu với tần suất 0,46 và tương ứng với trình tự tham chiếu hệ gen của người. Haplotyp Alt có miền ngoại bào (ECD, các axit amin từ 1 đến 266) của trình tự Q8TD46-4, và miền nội bào (ICD, các axit amin từ 291 đến 348) của trình tự Q8TD46-4 có sự thay thế E335Q. Haplotyp Ref có

miền ngoại bào (ECD, các axit amin từ 1 đến 266) của trình tự Q8TD46-4 có ba sự thay thế, R112K, P144T và Q200H, và miền nội bào (ICD, các axit amin từ 291 đến 348) của trình tự Q8TD46-4.

Đoạn gồm 240 axit amin của trình tự ECD của haplotyp Alt và Ref của hu-CD200R1-iso4 (các vị trí từ 27 đến 266) được nêu ở đây là SEQ ID NO: 1 và 2, tương ứng trong Bảng 2 dưới đây. Đoạn gồm 215 axit amin của các trình tự ECD của haplotyp Alt và Ref của hu-CD200R1-iso1 (các vị trí từ 29 đến 243) được nêu ở đây là SEQ ID NO: 3 và 4 tương ứng trong Bảng 2 dưới đây.

Các đoạn được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp của cyno-CD200R1 và rhesus CD200R1, tương tự với thể đồng dạng 4 của hu-CD200R1 được nêu ở đây là SEQ ID NO: 5 và 6 tương ứng trong Bảng 2 dưới đây.

Phối tử đích của thụ thể hu-CD200R1, protein hu-CD200 có thể được tìm thấy ở trình tự Uniprot P41217 và được nêu ở đây là SEQ ID NO: 7. Các protein CD200 của cyno-CD200R1 tương ứng cũng được đưa ra ở đây là SEQ ID NO: 8. Tất cả các polypeptit CD200 là thể dung hợp ở đầu tận cùng C với Fc IgG của người không có hiệu ứng dưới dạng SEQ ID NO: 9.

Bảng 2 dưới đây cung cấp phần mô tả tóm tắt về trình tự của các polypeptit CD200R1 và CD200 khác nhau theo sáng chế, và số nhận dạng trình tự của chúng. Các trình tự này cũng được bao gồm trong Danh mục trình tự kèm theo.

Bảng 2: CD200R1, CD200, và các trình tự liên quan

Tên	Trình tự	SEQ ID NO:
ECD của hu-CD200R1-iso4-Alt	AAQPNNSLMLQTSKENHALASSSLCMDEKQITQNYSKVLA EVNTSWPVKMATNAVLCCPPIALRNLI IITWEI IILRGQPS CTKAYRKETNETKETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRPVA ITHDGYRCIMVTPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTLFQNRNR TAVCKAVAGKPAAQISWIPEGDCATKQEYWSNGT VTVKST CHWEVHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKL	1
ECD của hu-CD200R1-iso4-Ref	AAQPNNSLMLQTSKENHALASSSLCMDEKQITQNYSKVLA EVNTSWPVKMATNAVLCCPPIALRNLI IITWEI IILRGQPS CTKAYKKETNETKETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRTV ITHDGYRCIMVTPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTLFQNRNR TAVCKAVAGKPAAHISWIPEGDCATKQEYWSNGT VTVKST CHWEVHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKL	2

ECD của hu-CD200R1-iso1-Alt	MDEKQITQNYSKVLAEVNTSWPVKMATNAVLCCPPIALRN LIIITWEIILRGQPSCTKAYRKETNETKETNCTDERITWV SRPDQNSDLQIRPVAITHDGYRCIMVTPDGNFHRGYHLQ VLVTPEVTFLQNRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPEGDCAT KQEYWSNGTVTVKSTCHWEVHNVSTVTCHVSHLTGNKSLY IELLPVPGAKKSAKL	3
ECD của hu-CD200R1-iso1-Ref	MDEKQITQNYSKVLAEVNTSWPVKMATNAVLCCPPIALRN LIIITWEIILRGQPSCTKAYKKETNETKETNCTDERITWV SRPDQNSDLQIRTVVAITHDGYRCIMVTPDGNFHRGYHLQ VLVTPEVTFLQNRNRTAVCKAVAGKPAAHISWIPEGDCAT KQEYWSNGTVTVKSTCHWEVHNVSTVTCHVSHLTGNKSLY IELLPVPGAKKSAKL	4
ECD cyno-CD200R1 (UniProt G7NZT0; các vị trí 27-267)	AAQSNNSLMLQTSKENHTLASNSLCMDEKQITQNHASKVLA EVNISWPVQMARNAVLCCPPIEFRLNIVITWEIILRGQPS CTKTYRKDTNETKETNCTDERITWVSTPDQNSDLQIHPVA ITHDGYRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTFLFESRNR TAVCKAVAGKPAAQISWIPAGDCAPTEQEYWGNGTVTVKS TCHWEGHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKL	5
ECD rhesus-CD200R1 (UniProt F7EF72; các vị trí 27-267)	AAQSNNSLMLQTSKENHTLASNSLCMDEKQITQNHASKVLA EVNISWPVQMARNAVLCCPPIEFRLNIVITWEIILRGQPS CTKSYRKETNETKETNCTDERITWVSTPDQNSDLQIYPVA ITHDGYRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTFLFESRNR TAVCKAVAGKPAAQISWIPAGDCAPTEQEYWGNGTVTVKS TCHWEGHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKL	6
hu-CD200 (Uniprot: P41217)	MERLVIRMPFSLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDER EQLYTPASLKLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTTFSE NHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDGECYM CLFNTFGFGKISGTACLTIVYVQPIVSLHYKFSEDLNITC SATARPAPMVFWKVPRSGIENSTVTLSPNGTTSVTSILH IKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTVNKG	7
cyno-CD200 (Uniprot: A0A2K5TQS2)	MERLVIRMPFCHLSTYSLVWGMMAAVVLCAAQVQVVTQDER EQLYTPASLRCSLQNAQEVLIWQKKKAVSPENMVTTFSE NHGVVIQPAYKDKINITQLGLQNTTITFWNITLEDGECYM CLFNTFGSGKISGTACLTIVYVQPIVSLHYKYSEDHLNITC SATARPAPMIFWKVPRSGFENSTVTQSHPNGTTSVTSILH VKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQTFDKG	8
Fc IgG của người N297G	GGSGSGTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	9

II. Kháng thể kháng CD200R1

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất cấu trúc của các kháng thể

kháng CD200R1 về mặt trình tự axit amin và trình tự nucleotit mã hóa của các đặc điểm của globulin miễn dịch khác nhau đã được biết rõ (ví dụ, các vùng HVR, FR, các miền V_H , V_L , và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ). Bảng 3 dưới đây cung cấp phần mô tả tóm tắt về các trình tự của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế, và các số nhận dạng trình tự của chúng. Các trình tự này được bao gồm trong Danh mục trình tự kèm theo.

Bảng 3: Các trình tự của kháng thể kháng CD200R1

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO:
10F6 (mAb1) - VL	DIVLTQSPPSLA VSLGQRATMSCRASESV D YSGN SFMHWFQQKAGQPPKLLIYRASNL E SGIPARFSG SGSRTDFTLTINPLEADDVATYYCHQSNEDPPTF GGGTKLEMK	10
10F6 - HVR-L1 h10F6 – HVR-L1 h10F6.V2 – HVR-L1 h10F6.V3 – HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	RASESV D YSGNSFMH	11
10F6 - HVR-L2 h10F6 – HVR-L2 h10F6.V2 – HVR-L2 h10F6.V3 – HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	RASNLES	12
10F6 - HVR-L3 h10F6 – HVR-L3 h10F6.V2 – HVR-L3 h10F6.V3 – HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	HQSNEDPPT	13
10F6 – VH	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTNYAV SWVRQPPGKGLEWLGVMWAGGGTNYN S VFKSRLT ISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARERPLT GVMDYWGQGTSVTVSS	14
10F6 - HVR-H1 h10F6 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	TNYAVS	15
10F6 - HVR-H2 h10F6 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	VMWAGGGTNYN S	16
10F6 - HVR-H3 h10F6 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	ARERPLTGVM DY	17
9B8 - VL	QIVLTQSPALTSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYW	18

	FQQKPRSSPKPWIYLT <u>SKLAS</u> GVPARFSGSGSGT SYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QQWSSYPLT</u> FGAGTK LELK	
9B8 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	SASSSVSYMY	19
9B8 - HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	LTSK <u>LAS</u>	20
9B8 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	QQWSSYPLT	21
9B8 – VH	EVQLQQSGTVLVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYM HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANDNTKYAPKFQDRA TITADTSSNTAYLQLSSLTSED <u>TAVYYCT</u> TRVEGR TGTYFDYWGQGTTLTVSS	22
9B8 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	KDDYMH	23
9B8 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	RIDPANDNTKYAP	24
9B8 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	TRVEGRTGTYFDY	25
5D1 – VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLA WYQEKPGKTNKFLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAMYYC <u>QQYNEYPWT</u> FGGGT KLEIK	26
5D1 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	RASKSISKYLA	27
5D1 - HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	SGSTLQ <u>S</u>	28
5D1 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	QQYNEYPWT	29
5D1 – VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYM HWVKQRPEQGLEWIGRIDPENGNTKYGPKFQDKA TITADTSSNTAYLQFSSLTSED <u>TAVYYCT</u> RRVWYALDYWGQGTSVTVSS	30
5D1 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	KDDYMH	31
5D1 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	RIDPENGNTKYGP	32
5D1 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	TRQLGLRRVWYALDY	33
10A2 – VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSV TDFTLTISSLEPEDFAMYYC <u>QQYNEYPWT</u> FGGGT KLEIK	34

10A2 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	RASKSISKYLA	35
10A2 - HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	SGSTLQS	36
10A2 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	QQYNEYPWT	37
10A2 – VH	EVQLQQSGAEFVRPGASVKLSCTTSGFYIKDDYI HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYAPKFQDKA TITADTSSNTAYLQLSRLTSED TAVYYCARQLGL RRTWYSLDYWGQGTSVTVSS	38
10A2 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	KDDYIH	39
10A2 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	RIDPANGNTKYAP	40
10A2 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	ARQLGLRRTWYSLDY	41
1F3 – VL	DVQMIQSPSSLSASLGDKVTMTCQASHTINLNWF QQKPGKAPKLLIYGTSNLEDGVP PRFSGSGYGT FTLTISSELEDEDMATYFCLQHTYLPWT FGGGTKL EIK	42
1F3 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	QASHTINLN	43
1F3 - HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	GTSNLED	44
1F3 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	LQHTYLPWT	45
1F3 – VH	EVQLQQSGAEFVRPGASVRLSCTTSGFYIKDDYI HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYAPKFQDKA TITADTSSNTAYLQLNSLTSED TAVYYCTRQLGL RRTWYAMDYWGQGTSVTVSS	46
1F3 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	KDDYIH	47
1F3 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	RIDPANGNTKYAP	48
1F3 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	TRQLGLRRTWYAMDY	49
11E4 - VL	DVQMIQSPSSLSASLGDKVTMTCQASHTINLNWF QQKPGKAPKLLIYGTSNLEDGVP PRFSGSGYGT FTLTISSELEDEDMATYFCLQHTYLPWT FGGGTKL EIK	50
11E4 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	QASHTINLN	51
11E4 - HVR-L2	GTSNLED	52

(các vị trí 50-56 của VL)		
11E4 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	LQHTYLPWT	53
11E4 – VH	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCEASGYTFTSYWM HWVKQSPGQGLEWVGAIYPGNSDTNYNQKFKGKA KLTAVTSASTAYMELSSLTNEDSAVYYCTTAVGS YWGQGT ¹ LVTVSA	54
11E4 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	TSYWMH	55
11E4- HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	AIYPGNSDTNYNQ	56
11E4 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	TTAVGSY	57
22.1 - VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGY SYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPVRFSG SGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHNRELLT ² FG AGTKLELK	58
22.1 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)	RASKSVSTSGYSYM	59
22.1 - HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	LASNLES	60
22.1 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	QHNRELLT	61
22.1 – VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVM FWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDTKYNEKFKGKA TLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARE ³ DYY GSRFVYW ⁴ GQGT ⁵ LVTVSS	62
22.1 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	TSYVMF	63
22.1 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	YINPYNDDTKYNE	64
22.1 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	AREDDYYGSRFVYW	65
h10F6 - VL h10F6.V2 – VL h10F6.V3 – VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDYSGN SFMHWFQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPDRFSG SGSRTDFTLT ⁶ ISSLQAEDVAVYYCHQSNEDPPTF GGG ⁷ TKVEIK	66
h10F6 – VH	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYAV SWVRQPPGKGLEWLGVMWAGGGTNYNSVFKSRLT ISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERPLT GVMDYWGQGT ⁸ LVTVSS	67
h10F6 – LC h10F6.V2 – LC h10F6.V3 – LC	MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVLTQSPDSLAVSL GERATINCRASESVDYSGNSFMHWFQQKPGQPPK LLIYRASNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLT ⁹ ISSLQ	68

	AEDVAVYYCHQSNEDPPTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
h10F6 – HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGFSLTNYAVSWVRQPPGKGLEWLG VMWAGGGTNYNVSVFKSRLTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCARERPLTGVMQDYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	69
h10F6-C-Lys – HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGFSLTNYAVSWVRQPPGKGLEWLG VMWAGGGTNYNVSVFKSRLTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCARERPLTGVMQDYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	70
h10F6.V1 – LC h10F6.V4 – LC	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVLTQSPDSLAVSL GERATINCRASESDYSGNSFMHWFQQKPGQPPK LLIYRASNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLTISLQ AEDVAVYYCHQSNWDPPPTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	71
h10F6.V1-C-Lys – HC h10F6.V3-C-Lys – HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGFSLTNYRVSWVRQPPGKGLEWLG VMYAGGGTNYNVSVFKSRLTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCARERPLTGVMQDNWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI	72

	SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
h10F6.V2-C-Lys – HC h10F6.V4-C-Lys – HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGFSLTNYWVSWVRQPPGKGLEWLG TMWAGGGTNYNSVFKSRLTISKDNSKNQVSLKLS SVTAADTAVYYCARERPLTGPMQYWGQGTLLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	73
h22.1-FL-LC	MGWSCIILFLVATATGVHSDIQLTQSPSSLSASV GDRVITITCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGKPPK LLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQHNRELLTFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	74
h22.1-FL-HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTSYVMFWVRQAPGQRLEWIG YINPYNDDTKYNEKFKGRATLTSKASASTAYMEL SSLRSEDVAVYYCAREYYGSRFVYWGQGTLLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	75
h10F6.V1 - VL h10F6.V4 - VL	DIVLTQSPDLSAVSLGERATINCRASESDYSGN SFMHWFQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPDRFSG SGSRTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCHQSNWDPPTF GGGTKEIK	76
h10F6.V1 - HVR-L1	RASESDYSGNSFMH	77

h10F6 - HVR-L1 h10F6.V4 - HVR-L1 (các vị trí 24-34 của VL)		
h10F6.V1 - HVR-L2 h10F6 - HVR-L2 h10F6.V4 - HVR-L2 (các vị trí 50-56 của VL)	RASNLES	78
h10F6.V1 - HVR-L3 h10F6.V4 - HVR-L3 (các vị trí 89-97 của VL)	HQSNWDPPT	79
h10F6.V1 - VH h10F6.V3 - VH	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYRV SWVRQPPGKGLEWLGVMYAGGGTNYNSVFKSRLT ISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERPLT GVMDNKGQGTLLTVSS	80
h10F6.V1 - HVR-H1 h10F6.V3 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	TNYRVS	81
h10F6.V1 - HVR-H2 h10F6.V3 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	VMYAGGGTNYNS	82
h10F6.V1 - HVR-H3 h10F6.V3 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VL)	ARERPLTGVMDN	83
h10F6.V2 - VH h10F6.V4 - VH	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYWV SWVRQPPGKGLEWLGTMWAGGGTNYNSVFKSRLT ISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARERPLT GPMDYWGQGTLLTVSS	84
h10F6.V2 - HVR-H1 h10F6.V4 - HVR-H1 (các vị trí 30-35 của VH)	TNYWVS	85
h10F6.V2 - HVR-H2 h10F6.V4 - HVR-H2 (các vị trí 50-61 của VH)	TMWAGGGTNYNS	86
h10F6.V2 - HVR-H3 h10F6.V4 - HVR-H3 (các vị trí 93-102 của VH)	ARERPLTGPM DY	87
h10F6.V1 - HC h10F6.V3 - HC	MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGGLVKP SETLSLTCTVSGFSLTNYRVSWVRQPPGKGLEW LGVMYAGGGTNYNSVFKSRLTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCARERPLTGVMDNKGQGTLL TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD	88

	KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	
h10F6.V2 – HC h10F6.V4 - HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGFSLTNYWVSWVRQPPGKGLEW LGTMWAGGGTNYNSVFKSRLTISKDNSKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCARERPLTGPM DYWGQGT L VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	89

1. Ái lực gắn kết, sự phong bế, và ức chế sự truyền tín hiệu trong tế bào của kháng thể kháng CD200R1

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 được đề xuất ở đây có hằng số phân ly cân bằng (K_D) để gắn kết với CD200R1 < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM, $< 0,1$ nM, $< 0,01$ nM, hoặc $< 0,001$ nM (ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-8} M, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Theo một số phương án, ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit haplotyp/thể đồng dạng hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, và/hoặc 4. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 có khả năng gắn kết với ái lực của hằng số phân ly cân bằng (K_D) để gắn kết với CD200R1 < 100 nM, < 10 nM, < 1 nM, $< 0,1$ nM, $< 0,01$ nM, hoặc $< 0,001$ nM (ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-8} M, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M) với cả bốn polypeptit haplotyp/thể đồng dạng hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, và 4. Theo ít nhất một phương án, kháng thể kháng CD200R1 có khả năng gắn kết với ái lực tương đương (ví dụ, khoảng

20%) hoặc tương đương trong khoảng nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-8} M với các polypeptit hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1 và 2.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể kháng CD200R1 được đặc trưng bởi sự gắn kết với hu-CD200R1-iso4 và hu-CD200R1-iso1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M. Theo một số phương án, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4 của trình tự SEQ ID NO: 1 và/hoặc 2, và với polypeptit hu-CD200R1-iso1 của trình tự SEQ ID NO: 3 và/hoặc 4.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể kháng CD200R1 được đặc trưng bởi sự gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt và hu-CD200R1-iso4-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M. Theo một số phương án, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1, và polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2.

Dự định rằng các kháng thể kháng CD200R1 khác nhau được tạo ra như được bộc lộ ở đây bao gồm các kháng thể có khả năng gắn kết với ái lực cao với cyno-CD200R1, và/hoặc với cả hu-CD200R1 và cyno-CD200R1. Cụ thể hơn, theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế gắn kết với cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M. Theo một số phương án, ái lực gắn kết được xác định theo hằng số phân ly cân bằng (K_D) để gắn kết với polypeptit hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế gắn kết với cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M. Theo một số phương án, ái lực gắn kết được xác định theo hằng số phân ly cân bằng (K_D) để gắn kết với polypeptit cyno-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế gắn kết với cả hu-CD200R1 và cy-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn

hoặc bằng 1×10^{-10} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M. Theo một số phương án, ái lực gắn kết được xác định theo hằng số phân ly cân bằng (K_D) để gắn kết với polypeptit hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1, 2, 3, hoặc 4, và polypeptit cyno-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5.

Nói chung, ái lực gắn kết của phối tử với thụ thể của nó có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều loại thử nghiệm khác nhau và được biểu hiện theo nhiều loại giá trị định lượng. Các thử nghiệm gắn kết CD200R1 đặc hiệu hữu ích trong việc xác định ái lực của các kháng thể được bộc lộ trong các ví dụ ở đây. Ngoài ra, các thử nghiệm gắn kết kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ như thử nghiệm thấm tách Western, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch “kiểu kẹp giữa”, thử nghiệm trên cơ sở cộng hưởng plasmon bề mặt (như thử nghiệm BIAcore như được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO2005/012359), thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch phát huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch protein A, thử nghiệm đếm tế bào theo dòng và thử nghiệm phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting: FACS), và thử nghiệm tương tự.

Do đó, theo một số phương án, ái lực gắn kết được thể hiện theo giá trị K_D và phản ánh ái lực gắn kết nội tại (ví dụ, với các tác động ái lực được giảm đến mức tối thiểu). Kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có ái lực gắn kết mạnh đối với miền ngoại bào của bốn tổ hợp haplotyp/thể đồng dạng CD200R1 riêng biệt chủ yếu ở người: hu-CD200R1-iso4-Alt (SEQ ID NO: 1); hu-CD200R1-iso4-Ref (SEQ ID NO: 2); hu-CD200R1-iso1-Alt (SEQ ID NO: 3); và hu-CD200R1-iso1-Ref (SEQ ID NO: 4). Các miền ngoại bào của bốn thể đồng dạng này của bốn polypeptit hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1-4, có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 10nM đến 1pM. Do đó, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể cạnh tranh với các kháng thể có ái lực thấp hơn với cùng epitop hoặc epitop chồng nhau của CD200R1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 được đề xuất trong bản mô tả này làm giảm, ức chế, và/hoặc phong bế hoàn toàn sự gắn kết của

CD200 với CD200R1, và nhờ đó phong bế sự điều hòa miễn dịch và/hoặc sự truyền tín hiệu miễn dịch do CD200R1 làm trung gian gây ra, bao gồm cả sự hoạt hóa các tế bào T. Khả năng của các kháng thể trong việc ức chế các con đường điều hòa miễn dịch và/hoặc truyền tín hiệu miễn dịch này trung gian bởi các tế bào biểu hiện CD200R1 gắn kết với các tế bào biểu hiện CD200 có thể được thử nghiệm *in vitro* bằng cách sử dụng các thử nghiệm trên cơ sở tế bào đã biết bao gồm cả các thử nghiệm trên cơ sở tế bào khác nhau được mô tả trong các ví dụ của sáng chế. Do đó, theo một số phương án, các kháng thể CD200R1 của sáng chế được đặc trưng bởi một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính chức năng sau đây dựa trên khả năng làm giảm, ức chế, và/hoặc phong bế hoàn toàn các con đường truyền tín hiệu trong tế bào do CD200R1 gắn kết với CD200 làm trung gian gây ra.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 của sáng chế phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1-iso4-Alt (SEQ ID NO: 1), hu-CD200R1-iso4-Ref (SEQ ID NO: 2), hu-CD200R1-iso1-Alt (SEQ ID NO: 3), và hu-CD200R1-iso1-Ref (SEQ ID NO: 4) được xác định bằng thử nghiệm ELISA với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 7nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 2nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1nM.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 của sáng chế phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1 được biểu hiện trên tế bào với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,5nM; tùy ý, trong đó tế bào này là tế bào U937 biểu hiện ổn định hu-CD200R1.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 của sáng chế phong bế CD200 gắn kết với CD200R1 được biểu hiện trên tế bào T của người với nồng độ IC_{50} của kháng thể nhỏ hơn hoặc bằng 10nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,1nM; tùy ý, trong đó tế bào là tế bào T CD8+ hoặc tế bào T CD4+.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 của sáng chế gắn kết với các tế bào T của người với giá trị EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,5nM; tùy ý, trong đó các tế bào T của người là tế bào T CD4+ hoặc tế bào T CD8+.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 của sáng chế làm gia tăng sự sản sinh IFN γ từ các tế bào khối u của người ít nhất là 1,2 lần, 1,5 lần, 2 lần, hoặc cao hơn, với nồng độ kháng thể nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, nhỏ hơn hoặc bằng 50nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 10nM; tùy ý, trong đó loại tế bào khối u được chọn từ kết-trực tràng, màng trong tử cung, phổi, u melanin, buồng trứng, tụy, hoặc tuyến tiền liệt.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 làm gia tăng sự sản sinh IFN γ và/hoặc IL-2 từ các tế bào T của người được phủ CD200-Fc so với đối chứng IgG ít nhất là 1,2 lần, 1,5 lần, 2 lần, hoặc cao hơn.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 làm gia tăng sự hoạt hóa của các tế bào T CD4 $^{+}$ và/hoặc các tế bào T CD8 $^{+}$ ít nhất là 1,5 lần, ít nhất là 2 lần, ít nhất là 2,5 lần, ít nhất là 3 lần hoặc cao hơn.

Theo ít nhất một phương án, kháng thể CD200R1 phong bế sự phiên mã NF κ B được tạo bởi sự gắn kết giữa các dòng tế bào biểu hiện CD200 và CD200R1; tùy ý, trong đó dòng tế bào là tế bào thông báo K562 biểu hiện CD200R1 và tế bào 293T biểu hiện CD200.

Theo ít nhất một phương án, các kháng thể CD200R1 của sáng chế có khả năng phong bế sự truyền tín hiệu trong tế bào qua trung gian CD200R1 và không có tác dụng làm chất chủ vận của hoạt tính CD200R1, hoặc theo cách khác, bất ngờ có tác dụng chủ vận đối với sự truyền tín hiệu CD200R1. Một phương pháp thử nghiệm về sự tạo ra hoạt tính chủ vận của CD200R1 là tạo ra hoạt tính pDok2 trong các tế bào được xử lý bằng CD200. Do đó, theo ít nhất một phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế phong bế sự cảm ứng hoạt tính của pDok2 trong các dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to U937 được xử lý bằng CD200-Fc hòa tan.

2. Mảnh kháng thể

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể hữu ích với các yếu tố xác định sự gắn kết theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab') $_2$, Fv, scFv, kháng thể đơn hóa trị, kháng thể miền đơn, kháng thể một nhánh hoặc kháng thể nhánh đơn, và các mảnh khác được mô tả ở đây và đã biết trong lĩnh vực này. Do đó, theo một số phương án của kháng thể

kháng CD200R1 theo sáng chế, kháng thể là mảnh kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, kháng thể miền đơn (VHH), kháng thể nhánh đơn, và scFv.

Để tham khảo về các mảnh kháng thể khác nhau, xem tài liệu: ví dụ, Hudson et al. Nat. Med. 9: 129-134 (2003). Để tham khảo về các scFv, xem tài liệu: ví dụ, Pluckthun, in The Đặc tính được lý of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); xem thêm Công bố đơn quốc tế số WO93/16185; và các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.571.894 và 5.587.458. Để biết thêm sự mô tả của các mảnh Fab và $F(ab')_2$ chứa các gốc epitop gắn kết thụ thể thu được và có thời gian bán hủy *in vivo* tăng lên, xem tài liệu: Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.869.046. Các dạng kháng thể đơn hóa trị khác được mô tả trong, ví dụ, các Công bố đơn quốc tế số WO2007/048037, WO2008/145137, WO2008/145138, và WO2007/059782. Các kháng thể nhánh đơn, đơn hóa trị được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn quốc tế số WO2005/063816. Các kháng thể hai mảnh là mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên, các kháng thể này có thể là kháng thể hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép (ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP0404097; Công bố đơn quốc tế số WO93/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)).

Theo một số phương án, các mảnh kháng thể là kháng thể miền đơn chứa tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.248.516).

Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp phân giải protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như phương pháp tạo ra bằng các tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ, *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả trong bản mô tả này.

3. Kháng thể thể khảm và kháng thể được làm cho giống với của người

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể là kháng thể thể khảm. (Ví dụ, xem kháng thể thể khảm như được mô tả trong

Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.816.567; và tài liệu: Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ, 81: 6851-6855 (1984)). Theo một phương án, kháng thể thể khảm chứa các vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi có nguồn gốc từ chuột thường, chuột nhắt, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng ổn định của người. Theo một số phương án, kháng thể thể khảm là kháng thể “được chuyển nhóm: kháng thể trong đó nhóm hoặc phân nhóm được thay đổi từ nhóm hoặc phân nhóm của kháng thể gốc. Dự định rằng kháng thể thể khảm có thể bao gồm các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế là kháng thể được làm cho giống với của người. Thông thường, kháng thể không phải của người được làm cho giống với của người để làm giảm tính sinh miễn dịch cho người, trong khi vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể gốc không phải kháng thể của người. Nói chung, kháng thể được làm cho giống với của người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các vùng HVR, CDR, (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người, và các vùng FR (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ các trình tự kháng thể của người. Kháng thể được làm cho giống với của người cũng sẽ tùy ý chứa ít nhất một phần vùng ổn định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm cho giống với của người được thể bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà các gốc của vùng CDR có nguồn gốc từ đó) để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được làm cho giống với của người và phương pháp tạo ra chúng được tham khảo, ví dụ, trong tài liệu: Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008), và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu: Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. Mỹ 86: 10029-10033 (1989); các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, và 7.087.409; Kashmiri et al, Methods 36:25-34 (2005) (mô tả sự ghép SDR (a-HVR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (mô tả “sự tái tạo bề mặt”); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (mô tả “sự xáo trộn vùng FR”); và Osbourn et al., Methods 36:61 -68 (2005) và

Klimka et al., Br. J. Cancer, 83 :252-260 (2000) (mô tả phương pháp "chọn lọc có hướng dẫn" đối với sự xáo trộn vùng FR).

Các vùng khung của người có thể được sử dụng để làm cho giống với của người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các vùng khung được chọn bằng cách sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (ví dụ, xem tài liệu: Sims et al. J. Immunol. 151 :2296 (1993)); các vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của kháng thể của người của nhóm phụ cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (ví dụ, xem tài liệu: Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ, 89:4285 (1992); và Presta et al. J. Immunol, 151 :2623 (1993)); các vùng khung trưởng thành của người (được đột biến về mặt soma) hoặc các vùng khung dòng mầm của người (ví dụ, xem tài liệu: Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619- 1633 (2008)); và các vùng khung thu được từ việc sàng lọc các thư viện FR (ví dụ, xem tài liệu: Baca et al., J. Biol. Chem. 272: 10678-10684 (1997) và Rosok et al., J. Biol. Chem. 271 :2261 1 -22618 (1996)).

4. Kháng thể của người

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể là kháng thể của người. Các kháng thể của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Nói chung, các kháng thể của người được mô tả trong tài liệu: van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) và Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008). Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách cho động vật chuyển gen sử dụng chất sinh miễn dịch đã được cải biến để sản sinh ra kháng thể nguyên vẹn của người hoặc các kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi của người đáp ứng với thử thách kháng nguyên. Các động vật này thường chứa tất cả hoặc một phần của các locus globulin miễn dịch của người, để thay thế các locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt ở bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc được đính gắn ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật. Ở chuột chuyển gen này, các locus globulin miễn dịch nội sinh thường được làm bất hoạt. Để tham khảo về các phương pháp thu được kháng thể của người từ động vật chuyển gen, xem tài liệu: Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117- 1125 (2005). Ngoài ra, xem thêm, ví dụ, công nghệ XENOMOUSE™ trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.075.181 và 6.150.584; công nghệ HUMAB® trong

Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.770.429; công nghệ K-M MOUSE® trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.041.870; và công nghệ VELOCIMOUSE® trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2007/0061900). Các vùng biến đổi của người từ kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi các động vật này có thể được cải biến thêm, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng ổn định của người khác.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp trên cơ sở tế bào lai. Các dòng tế bào u tủy ở người và các dòng tế bào u tủy khác loài ở chuột-người để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. Ví dụ, xem tài liệu: Kozbor J. Immunol, 133 : 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 -63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991). Các kháng thể của người được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong tài liệu: Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ, 103 :3557- 3562 (2006). Các phương pháp bổ sung bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.189.826 (mô tả phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng IgM của người từ các dòng tế bào của tế bào lai). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong tài liệu: Vollmers and Brandlein, Histology and Mô bệnh học, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Đặc tính dược lý, 27(3): 185-91 (2005).

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng Fv được chọn từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn có nguồn gốc từ người. Sau đó, các trình tự miền biến đổi này có thể được kết hợp với miền ổn định của người mong muốn. Các kỹ thuật để chọn lọc kháng thể của người từ thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Các kháng thể có nguồn gốc từ thư viện

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp của kháng thể với một hoặc nhiều hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện này để tìm các kháng thể có đặc tính gắn kết mong muốn. Việc

sử dụng sự biểu hiện thể thực khuẩn để tạo ra các biến thể được trưởng thành về ái lực của phiên bản được làm cho giống với của người của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế được mô tả trong các ví dụ được bộc lộ ở đây. Các phương pháp khác để sản xuất các kháng thể có nguồn gốc từ thư viện này có thể được tìm thấy trong tài liệu, ví dụ, Hoogenboom *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ* 101(34): 12467-12472 (2004); và Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

6. Các kháng thể đa đặc hiệu

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đơn dòng có ít nhất hai vị trí gắn kết khác nhau, mỗi vị trí có tính đặc hiệu gắn kết đối kháng nguyên khác nhau, ít nhất một trong số các vị trí này gắn kết đặc hiệu CD200R1.

Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu đối với CD200R1 và tính đặc hiệu đối với kháng nguyên khác làm trung gian cho sự điều hòa miễn dịch, truyền tín hiệu miễn dịch, và/hoặc được biểu hiện trên tế bào ung thư hoặc khối u. Theo một số phương án của kháng thể đặc hiệu kép, tính đặc hiệu khác đối với kháng nguyên là phân tử kiểm soát miễn dịch được chọn từ PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, CRTAM, CTLA-4, BTLA, CD244, CD160, LIGHT, GITR, 4-1BB, OX40, CD27, TMIGD2, ICOS, CD40, CD47, SIRPa, NKG2D, NKG2A, TNFRSF25, CD33, CEA, Epcam, GPC3, CD73, CD83, CD39, TRAIL, CD226, và VISTA. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD200R1, kháng nguyên khác mà kháng thể có tính đặc hiệu với được chọn từ PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, và CRTAM.

Theo một số phương án, ít nhất một trong số các vị trí gắn kết đặc hiệu

với chất gây độc tế bào. Theo các phương án làm ví dụ, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép và có thể được sử dụng để khu trú chất gây độc tế bào vào các tế bào biểu hiện CD200R1.

Các kỹ thuật để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp đồng biểu hiện tái tổ hợp của hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (ví dụ, xem tài liệu: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), Công bố đơn quốc tế số WO 93/08829, và Traunecker *et al.*, *EMBOJ.* 10: 3655 (1991)). Kỹ thuật thiết kế “chỗ phình vào chỗ lõm” cũng có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép hữu ích với kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế. Kỹ thuật thiết kế chỗ phình vào chỗ lõm là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.731.168.

Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách thiết kế hiệu ứng “điều khiển tĩnh điện” có lợi cho sự tạo ra các phân tử kháng thể heterodime-Fc chứ không phải homodime (Công bố đơn quốc tế số WO 2009/089004A1); hai hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh được tạo liên kết ngang (ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 4.676.980, và Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); bằng cách sử dụng khóa kéo leuxin để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu: Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992)); bằng cách sử dụng công nghệ “kháng thể dime” để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu: Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ*, 90:6444-6448 (1993)); bằng cách sử dụng các dime Fv chuỗi đơn (scFv) (ví dụ, xem tài liệu: Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)); hoặc các kháng thể ba đặc hiệu (ví dụ, xem tài liệu: Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991)).

7. Biến thể của kháng thể

Theo một số phương án, các biến thể của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế cũng được bao gồm. Ví dụ, các kháng thể có ái lực gắn kết được cải thiện và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, loại bỏ, và/hoặc chèn vào và/hoặc thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng

thể. Sự kết hợp bất kỳ của việc loại bỏ, chèn vào, và thay thế có thể được thực hiện để thu được cấu trúc cuối, với điều kiện là cấu trúc cuối này có đặc tính mong muốn của sự gắn kết kháng nguyên CD200R1.

A. Các biến thể thay thế, chèn vào, và loại bỏ

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể kháng CD200R1 có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin, ngoài các dạng được mô tả ở đây. Các vị trí dễ gây đột biến có thể bao gồm các vùng HVR và FR. Sự thay thế axit amin “bảo toàn” điển hình và/hoặc sự thay thế dựa trên nhóm mạch bên hoặc các đặc tính phổ biến là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng trong các phương án của sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm các biến thể dựa trên sự thay thế axit amin không bảo toàn trong đó thành viên của một nhóm mạch bên của axit amin được trao đổi cho axit amin từ nhóm khác.

Các mạch bên của axit amin thường được phân nhóm theo các nhóm hoặc đặc tính chung sau đây: (1) nhóm kỵ nước: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Norleuxin; (2) nhóm ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) nhóm có tính axit: Asp, Glu; (4) nhóm có tính bazơ: His, Lys, Arg; (5) nhóm ảnh hưởng đến sự định hướng của mạch: Gly, Pro; và (6) nhóm thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực này đối với sự thay thế axit amin vào kháng thể và sàng lọc sau đó về chức năng mong muốn, ví dụ, sự gắn kết kháng nguyên được duy trì/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm đi, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Các biến thể của sự thay thế axit amin có thể bao gồm sự thay thế một hoặc nhiều gốc của vùng siêu biến của kháng thể gốc (ví dụ, kháng thể được làm cho giống với của người hoặc kháng thể của người). Nói chung, (các) biến thể tạo thành được chọn lọc để nghiên cứu thêm sẽ có các cải biến về một số đặc tính sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng lên, tính sinh miễn dịch giảm đi) so với kháng thể gốc và/hoặc sẽ gần như duy trì được một số đặc tính sinh học nhất định của kháng thể gốc. Biến thể thay thế làm ví dụ là kháng thể trưởng thành về ái lực, kháng thể này có thể được tạo ra theo cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật trưởng thành ái lực dựa trên sự biểu hiện của thể thực khuẩn như các kỹ thuật được mô tả trong các ví dụ ở đây. Tóm lại, một

hoặc nhiều gốc của vùng HVR được đột biến và các kháng thể biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc về hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc vùng của kháng thể có thể được hướng đích để gây đột biến là “sự gây đột biến quét alanin” (ví dụ, xem tài liệu: Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085). Trong phương pháp này, gốc hoặc nhóm của các gốc đích (ví dụ, các gốc mang điện tích như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được xác định và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện tích âm (ví dụ, Ala hoặc polyalanin) để xác định xem sự tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các thay thế khác có thể được đưa vào ở các vị trí của axit amin chứng minh tính nhạy về mặt chức năng với sự thay thế ban đầu. Theo cách khác hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để xác định các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên có thể được xác định. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được hướng đích hoặc loại bỏ làm ứng viên để thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có các đặc tính mong muốn hay không.

Sự chèn đoạn của trình tự axit amin bao gồm sự dung hợp ở đầu tận cùng amino và/hoặc carboxyl trong khoảng chiều dài từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như chèn vào trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về sự chèn vào đầu tận cùng bao gồm kháng thể có gốc methionyl ở đầu tận cùng N. Các biến thể chèn đoạn khác của phân tử kháng thể bao gồm sự dung hợp với đầu tận cùng N- hoặc C- của kháng thể với enzym hoặc polypeptit để làm gia tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể.

Có thể tạo ra sự thay thế trong các vùng HVR để cải thiện ái lực của kháng thể. Sự thay đổi này có thể được tạo ra trong “các điểm nóng” nghĩa là các gốc được mã hóa bằng codon được đột biến với tần suất cao trong quá trình đột biến soma (ví dụ, xem tài liệu: Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)) với biến thể tạo thành V_H hoặc V_L được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Theo một số phương án, sự trưởng thành ái lực có thể được tiến hành bằng cách xây dựng và chọn lọc lại từ thư viện thứ cấp (ví dụ, xem tài liệu:

Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). Phương pháp khác để đưa tính đa dạng liên quan đến các phương pháp định hướng vùng HVR, trong đó một số gốc của vùng HVR (ví dụ, 4-6 gốc ở một thời điểm) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc của vùng HVR liên quan đến sự gắn kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến quét alanin hoặc mô hình hóa. Cụ thể, HVR-H3 và HVR-L3 thường được hướng đích.

Theo một số phương án, sự thay thế, chèn đoạn hoặc loại bỏ có thể xuất hiện trong một hoặc nhiều vùng HVR miễn là các thay đổi này không làm giảm đáng kể khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ, sự thay đổi bảo toàn (ví dụ, sự thay thế bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả này) không làm giảm đáng kể ái lực gắn kết có thể được tạo ra trong các vùng HVR. Các thay đổi này có thể nằm ngoài “các điểm nóng” của vùng HVR. Theo một số phương án của các trình tự biến thể V_H và V_L đã đề xuất trên đây, mỗi vùng HVR không được thay đổi hoặc có không quá một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin.

B. Các biến thể glycosyl hóa

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế được thay đổi để làm tăng hoặc giảm mức độ kháng thể được glycosyl hóa. Việc bổ sung hoặc loại bỏ các vị trí glycosyl hóa cho kháng thể có thể được tiến hành bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa có thể được tạo ra hoặc loại bỏ.

Theo các phương án trong đó kháng thể chứa vùng Fc, hydrat cacbon gắn với vùng Fc có thể được thay đổi. Thông thường, các kháng thể tự nhiên được sản sinh bởi tế bào của động vật có vú chứa oligosacarit có hai nhánh được gắn bởi liên kết N với asparagin ở khoảng vị trí 297 (“N297”) của miền CH2 của vùng Fc (ví dụ, xem tài liệu: Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)). Oligosacarit này có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, như mannoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn với GlcNAc trong “gốc” của cấu trúc oligosacarit có hai nhánh. Theo một số phương án, sự cải biến oligosacarit của vùng Fc của kháng thể có thể tạo ra biến thể với một số đặc tính được cải thiện nhất định.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể là biến thể của kháng thể gốc, trong đó biến thể này chứa cấu trúc hydrat cacbon không có fucoza gắn vào (theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp) vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1% đến khoảng 80%, từ khoảng 1% đến khoảng 65%, từ khoảng 5% đến khoảng 65%, hoặc từ khoảng 20% đến khoảng 40%. Lượng fucoza này có thể được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình trong mạch đường ở vị trí N297, so với tổng lượng của tất cả các cấu trúc glyco gắn vào Asn 297 (ví dụ, cấu trúc phức hợp, thể lai và manosa ở mức cao) khi được xác định bằng phương pháp phổ khối MALDI-TOF (ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO 2008/077546). N297 để chỉ gốc asparagin nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (theo cách đánh số Eu của các gốc vùng Fc); tuy nhiên, N297 cũng có thể nằm ở vị trí khoảng ± 3 axit amin ở phía trước hoặc phía sau vị trí 297, nghĩa là giữa các vị trí 294 và 300, do sự thay đổi trình tự rất nhỏ trong kháng thể.

Theo một số phương án, các biến thể fucosyl hóa có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ, xem các Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108, hoặc US 2004/0093621. Ví dụ về các kháng thể “đã khử fucosyl hóa” hoặc “thiếu fucoza” và các phương pháp liên quan để tạo ra chúng được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, các Công bố đơn sáng chế Mỹ số US2003/0157108; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; các Công bố đơn quốc tế số WO2000/61739; WO2001/29246; WO2003/085119; WO2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004).

Các dòng tế bào hữu ích để tạo ra kháng thể đã khử fucosyl hóa bao gồm các tế bào CHO Led 3 bị thiếu hụt protein trong quá trình fucosyl hóa (ví dụ, xem tài liệu: Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Công bố đơn sáng chế Mỹ số US2003/0157108, và Công bố đơn quốc tế số WO2004/056312), và các dòng tế bào bị bất hoạt gen, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, FUT8, các dòng tế bào CHO bị bất hoạt gen (ví dụ, xem tài liệu: Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al.,

Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); và Công bố đơn quốc tế số WO2003/085107).

C. Biến thể vùng Fc

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều sự cải biến axit amin trong vùng Fc (nghĩa là biến thể vùng Fc). Biến thể vùng Fc này có thể chứa trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người) chứa sự thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí của gốc axit amin. Nhiều loại biến thể vùng Fc đã biết trong lĩnh vực này là hữu ích với kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế được mô tả dưới đây.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 có thể là biến thể vùng Fc có chức năng hiệu ứng được thay đổi. Theo một số phương án, kháng thể có chức năng hiệu ứng được thay đổi có thể có một số (nhưng không phải tất cả) các chức năng hiệu ứng, chức năng hiệu ứng giảm đi, hoặc không có chức năng nào trong số các chức năng hiệu ứng (ví dụ, không có hiệu ứng) của kháng thể gốc. Các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng có thể là biến thể mong muốn hơn về một số ứng dụng nhất định khi chức năng hiệu ứng (như ADCC) là không cần thiết hoặc có hại, và/hoặc thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là quan trọng.

Các kháng thể biến thể vùng Fc có chức năng hiệu ứng giảm, hoặc các kháng thể không có hiệu ứng, có thể bao gồm sự thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí của vùng Fc sau đây: 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.737.056). Các biến thể vùng Fc này có thể bao gồm sự thay thế axit amin ở hai hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí 265, 269, 270, 297 và 327. Các biến thể vùng Fc này cũng có thể bao gồm sự thay thế ở cả hai gốc 265 và 297 thành alanin (ví dụ, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.332.581). Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế là các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng. Theo một số phương án, các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng Fc của kháng thể kháng CD200R1 chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ N297G (ví dụ, xem tài liệu: Shields, R. et al., "High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and Design

of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR*”, *Journal of Biological Chemistry*, 276(9): 6591-6604 (2001)); N297A (ví dụ, xem tài liệu: Friend, P.J. et al., “Phase I Study of an Engineered Aglycosylated Humanized CD3 Antibody in Renal Transplant Rejection”, *Transplantation*, 68(11): 1632-7 (1999)); P331S/K322A (ví dụ, xem tài liệu: Tawara, T. et al., “Complement Activation Plays a Key Role in Antibody-Induced Infusion Toxicity in Monkeys and Rats”, *J Immunol*, 180(4): 2294-8 (2008)); S228P/L235E (ví dụ, xem tài liệu: Newman, R. et al., “Modification of the Fc Region of a Primatized IgG Antibody to Human CD4 Retains Its Ability to Modulate CD4 Receptors but Does Not Deplete CD4(+) T Cells in Chimpanzees”, *Clin Immunol*, 98(2): 164-74 (2001); hoặc L234A/L235A/P329G (còn được gọi là “LALAPG”) (ví dụ, xem tài liệu: Schlothauer, T. et al., “Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions”, *Protein Eng. Des. Sel.*, 29(10): 457– 466 (2016); Lo, M. et al., “Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice”, *Journal of Biological Chemistry*, 292(9): 3900-3908 (2017). Theo các phương án khác, các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng Fc của kháng thể kháng CD200R1 chứa sự thay thế axit amin L234A/L235A (“LALA”) (Woodle, E. Steve et al., *Transplantation*, 68(5): 608-616 (1999)).

Do đó, theo một số phương án, các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng Fc của kháng thể kháng CD200R1 chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin được chọn từ N297A hoặc N297G. Theo một số phương án, các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng Fc của kháng thể kháng CD200R1 chứa cặp sự thay thế axit amin P331S/K322A. Theo các phương án khác, các biến thể vùng Fc không có hiệu ứng Fc của kháng thể kháng CD200R1 chứa sự thay thế axit amin L234A/L235A (LALA) hoặc L234A/L235A/P329G (LALAPG). Theo một số phương án, trong đó kháng thể kháng CD200R1 thuộc loại isotyp IgG2 hoặc IgG4, kháng thể kháng CD200R1 này chứa sự thay thế axit amin S228P và/hoặc L235E.

Các biến thể vùng Fc có sự gắn kết với FcR được cải thiện hoặc giảm bớt được bộc lộ trong, ví dụ, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.737.056; Công bố đơn quốc tế số WO 2004/056312; và Shields et al., *J. Biol. Chem.*

9(2): 6591- 6604 (2001). Các biến thể vùng Fc có ADCC được cải thiện có thể chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin, ví dụ, ở các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc này (dựa trên cách đánh số của EU). Các biến thể vùng Fc có sự gắn kết với Clq và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (Complement Dependent Cytotoxicity: CDC) được thay đổi (nghĩa là được cải thiện hoặc giảm bớt) như được mô tả, ví dụ, trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.194.551, Công bố đơn quốc tế số WO99/51642, và Idusogie *et al.*, J. Immunol. 164: 4178- 4184 (2000). Các biến thể vùng Fc có thời gian bán hủy được tăng lên và sự gắn kết với thụ thể Fc ở trẻ sơ sinh (neonatal Fc receptor: FcRn) được cải thiện được bộc lộ, ví dụ, trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Các biến thể vùng Fc này chứa sự thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, và 434. Các biến thể vùng Fc khác có thời gian bán hủy được tăng lên bao gồm tập hợp các đột biến YTE ở các vị trí 252, 254, và 256 (nghĩa là M252Y/S254T/T256E) được mô tả, ví dụ, trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7658921B2 (Dall'Acqua *et al.*). Ví dụ khác về các biến thể vùng Fc có thể được tìm thấy, ví dụ, trong các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.648.260 và 5.624.821; và Công bố đơn quốc tế số WO94/29351.

Nói chung, các thử nghiệm về tính gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được tiến hành để xác nhận sự giảm/cạn kiệt hoạt tính CDC và/hoặc ADCC trong biến thể vùng Fc. Ví dụ, các thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được tiến hành để đảm bảo rằng kháng thể không có sự gắn kết FcγR (do đó có thể không có hoạt tính ADCC) nhưng vẫn duy trì khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào sơ cấp chỉ để làm trung gian cho ADCC, các tế bào NK biểu hiện FcγRII, trong khi các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII, và FcγRIII. Ví dụ không làm giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.500.362 (ví dụ, xem tài liệu: Hellstrom, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. Mỹ 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. Mỹ 82: 1499-1502 (1985); 5.821.337 (xem tài liệu: Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)). Theo cách khác, các phương pháp thử nghiệm

không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (ví dụ, xem thử nghiệm về tính gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTI™ để đếm tế bào theo dòng (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm về tính gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox96® (Promega, Madison, WI). Tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) và tế bào giết tự nhiên (Natural Killer: NK). Theo cách khác hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. Mỹ 95:652-656 (1998). Các thử nghiệm gắn kết Clq cũng có thể được tiến hành để khẳng định rằng kháng thể không có khả năng gắn kết Clq và do đó không có hoạt tính CDC. Ví dụ, xem thử nghiệm ELISA gắn kết Clq và C3c trong các Công bố đơn quốc tế số WO2006/029879 và WO2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (ví dụ, xem tài liệu: Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101: 1045-1052 (2003); và Cragg, M.S. và M.J. Glennie, SW 103:2738-2743 (2004)). Việc xác định sự gắn kết FcRn và sự thanh thải/thời gian bán hủy *in vivo* có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Petkova, et al., Intl. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)).

D. Biến thể kháng thể được thiết kế với xystein

Theo một số phương án, dự định rằng kháng thể kháng CD200R1 được mô tả ở đây có thể được thể ở các vị trí đặc hiệu không phải trong vùng HVR bằng gốc xystein để tạo ra các nhóm thiol có khả năng phản ứng. Các kháng thể “thioMAb” được thiết kế như vậy có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể, ví dụ, với các gốc dược chất hoặc các gốc dược chất-nhóm liên kết và nhờ đó tạo ra các thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả trong phần khác trong bản mô tả này. Các kháng thể được thiết kế với xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 7.521.541. Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc bất kỳ của các gốc kháng thể sau đây có thể được thể bằng xystein: V205 (theo cách đánh số Kaba) của chuỗi nhẹ; A118 (theo cách đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (theo cách đánh số EU) của

vùng Fc chuỗi nặng.

E. Dẫn xuất kháng thể

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được cải biến thêm (nghĩa là được dẫn xuất hóa) với các gốc không phải protein. Các gốc không phải protein thích hợp để dẫn xuất hóa của kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme tan trong nước như: polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol và propylen glycol, carboxy-metylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1, 3, 6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, homo-polyme poly-axit amin hoặc các copolyme ngẫu nhiên, và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, homo-polyme propylen glycol, copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, các hợp chất polyol polyoxy-etyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, sự cải biến của kháng thể có thể được tiến hành bằng cách sử dụng metoxy-polyetylen glycol propionaldehyt. Các polyme có thể là polyme có trọng lượng phân tử bất kỳ, và có thể có nhánh hoặc không có nhánh. Số lượng polyme được gắn với kháng thể có thể thay đổi, và nếu có nhiều hơn một polyme được gắn vào, chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nói chung, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để dẫn xuất hóa có thể được xác định dựa trên các yếu tố cân nhắc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đặc tính hoặc chức năng cụ thể của kháng thể, ví dụ, liệu dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong liệu pháp trong các điều kiện xác định hay không.

8. Thể liên hợp miễn dịch

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế cũng có thể là thể liên hợp miễn dịch, trong đó thể liên hợp miễn dịch này chứa kháng thể kháng CD200R1 được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào. Các chất gây độc tế bào thích hợp được bao gồm trong sáng chế bao gồm các chất hóa trị liệu, dược chất, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, các độc tố protein, các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc các đồng vị có hoạt tính phóng xạ.

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch là thể liên hợp kháng

thể-dược chất (antibody-drug conjugate: ADC) trong đó kháng thể kháng CD200R1, như được mô tả trong bản mô tả này, được liên hợp với một hoặc nhiều dược chất.

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch của sáng chế chứa kháng thể kháng CD200R1 như được mô tả trong bản mô tả này được liên hợp với dược chất hoặc chất điều trị để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh qua trung gian CD200R1.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 như được mô tả trong bản mô tả này có thể được liên hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độc tố bạch hầu chuỗi A, các mảnh không có hoạt tính gắn kết của độc tố bạch hầu, ngoại độc tố chuỗi A (từ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*), rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, modecxin chuỗi A, alpha-sarcin, các protein *Aleurites fordii*, các protein dianthin, các protein *Phytolacca americana*, chất ức chế *Momordica charantia*, curcin, crotin, chất ức chế *Saponaire officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và các độc tố tricothecene.

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch của sáng chế chứa kháng thể kháng CD200R1 như được mô tả trong bản mô tả này được liên hợp với đồng vị có hoạt tính phóng xạ (nghĩa là thể liên hợp phóng xạ). Có nhiều loại đồng vị có hoạt tính phóng xạ có sẵn để tạo ra các thể liên hợp phóng xạ này. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb , và các đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu. Theo một số phương án, đồng vị có hoạt tính phóng xạ có thể là hoặc bao gồm ^{18}F , FDG. Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch có thể bao gồm đồng vị phóng xạ để phát hiện đồ thị nhấp nháy, hoặc nhãn đánh dấu spin để phát hiện NMR hoặc MRI. Các đồng vị phóng xạ hoặc nhãn đánh dấu spin thích hợp có thể bao gồm, ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{17}O , các đồng dạng khác nhau của Gd, Mn, và Fe.

Các thể liên hợp miễn dịch của kháng thể kháng CD200R1 và chất gây độc tế bào, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều loại chất phản ứng có hai chức đã được biết rõ và các chất hóa học thích hợp để liên hợp với protein. Các chất phản ứng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: N-succinimidyl-

3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất có hai chức của imidoeste (ví dụ, dimetyl adipimidat HQ), các este có hoạt tính (ví dụ, disuccinimidyl suberat), các hợp chất aldehyt (ví dụ, glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (ví dụ, bis-(p-azidobenzoyl)-hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazoni (ví dụ, bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các hợp chất diisoxyanat (ví dụ, toluen-2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo có hoạt tính bis (ví dụ, 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen).

Các chất phản ứng để điều chế thể liên hợp miễn dịch của sáng chế cũng có thể bao gồm chất phản ứng "được tạo liên kết ngang" có bán trên thị trường như: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo- EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) (ví dụ, xem tài liệu: Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Mỹ).

9. Các kháng thể tổng hợp

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể là kháng thể tổng hợp chứa tập hợp các vùng CDR hoặc HVR từ globulin miễn dịch kháng CD200R1 (ví dụ, HVR-L1, v.v.) được ghép lên khung hoặc vùng khung khác với khung hoặc vùng khung của globulin miễn dịch, như khung protein thay thế, hoặc khung polyme nhân tạo.

Các khung protein làm ví dụ được dự định để điều chế các kháng thể tổng hợp của sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: fibronectin, neocarzinostatin CBM4-2, lipocalin, thụ thể tế bào T, protein-miễn A (protein Z), Im9, các protein TPR, các miền ngón tay kẽm, pVIII, polypeptit từ tuyến tụy gia cầm, GCN4, miền tương đồng 3 của miền WW Src, các miền PDZ, TEM-1 beta-lactamaza, thioredoxin, staphylococcal nucleaza, các miền ngón tay PHD, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotin, LACI-D1, LDTI, MTI-II, các độc tố từ bộ cặp, peptit defensin-A từ côn trùng, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, xytocrom b-562, các miền thụ thể Ldl, gama-crystallin, ubiquitin, transferrin, và/hoặc các miền tương tự lectin kiểu C.

Các khung polyme (không phải protein) nhân tạo làm ví dụ hữu ích cho

các kháng thể tổng hợp được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Fiedler et al., (2014) “Non-Antibody Scaffolds as Alternative Therapeutic Agents” trong Handbook of Therapeutic Antibodies (eds S. Dübel and J. M. Reichert), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; Gebauer et al., Curr. Opin. Chem. Biol, 13:245-255 (2009); Binz et al, Nat. Biotech., 23(10): 1257-1268 (2005).

IV. Chế phẩm và phương pháp tái tổ hợp

Kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được tạo ra bằng các nguyên liệu và phương pháp tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực sản xuất kháng thể. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng CD200R1. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin chứa vùng V_L và/hoặc trình tự axit amin chứa vùng V_H của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vector (ví dụ, các vector biểu hiện) chứa các trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD200R1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng CD200R1. Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp với vector chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa vùng V_L của kháng thể và trình tự axit amin chứa vùng V_H của kháng thể. Theo phương án khác, tế bào chủ được biến nạp với vector thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa vùng V_L của kháng thể và vector thứ hai chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa vùng V_H của kháng thể.

Theo một số phương án của phương pháp tái tổ hợp, tế bào chủ được sử dụng là tế bào có nhân điển hình, như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary: CHO), hoặc tế bào lymphô (ví dụ, Y0, NS0, Sp20). Theo ít nhất một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể kháng CD200R1, trong đó phương pháp bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, như đã đề xuất trên đây, trong các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện của kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Tóm lại, phương pháp sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng CD200R1

được tiến hành bằng cách phân lập axit nucleic mã hóa kháng thể (ví dụ, như được mô tả trong bản mô tả này) và chèn axit nucleic này vào một hoặc nhiều vector để tách dòng và/hoặc biểu hiện thêm trong tế bào chủ. Các axit nucleic này được phân lập dễ dàng và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường đã được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể mong muốn). Các tế bào chủ thích hợp và phương pháp nuôi cấy để tách dòng hoặc biểu hiện các vector mã hóa kháng thể là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các tế bào tế bào không nhân hoặc tế bào có nhân điển hình. Thông thường, sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ bột nhão tế bào trong phân đoạn hòa tan và được tinh chế thêm. Ngoài vi sinh vật có nhân nguyên thủy, vi sinh vật có nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho các vector mã hóa kháng thể, bao gồm cả các chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã “được làm cho giống với của người” dẫn đến sự tạo ra kháng thể có kiểu glycosyl hóa ở người một phần hoặc hoàn toàn (ví dụ, xem tài liệu: Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004), và Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)).

Các tế bào chủ thích hợp cho sự biểu hiện của kháng thể kháng CD200R1 được glycosyl hóa của sáng chế cũng có thể có nguồn gốc từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về các tế bào của động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được xác định có thể được sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Các giống nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ (ví dụ, xem các Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, và 7.125.978).

Ví dụ về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích để sản xuất kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm cả các tế bào DHFR-CHO (ví dụ, xem tài liệu: Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ 77:4216 (1980)); các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0; dòng tế bào thận khỉ CV1 được biến nạp bằng

SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (các tế bào 293 hoặc 293 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); các tế bào thận chuột đồng sơ sinh (baby hamster kidney: BHK); các tế bào Sertoli của chuột (các tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); các tế bào thận của khỉ (CV1); các tế bào thận của khỉ xanh châu Phi (VERO-76); các tế bào caxinom cổ tử cung ở người (HELA); các tế bào thận chó (MDCK; các tế bào gan của chuột trâu (BRL 3A); các tế bào phổi của người (W138); các tế bào gan của người (Hep G2); tế bào khối u tuyến vú của chuột (MMT 060562); các tế bào TR1 (ví dụ, xem tài liệu: Mather et al., Annals N Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) và Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.235.498); các tế bào thu được từ Hội đồng nghiên cứu y khoa 5 (Medical Research Council 5: MRC 5) (ví dụ như các tế bào có sẵn từ ATCC và còn được gọi là CCL-171); và các tế bào Foreskin 4 (FS-4) (ví dụ, xem tài liệu: Vilcek et al. Ann. N. Y. Acad. Sci. 284:703-710 (1977), Gardner & Vilcek. J. Gen. Virol. 44:161-168 (1979), và Pang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ 77:5341-5345 (1980)). Để tham khảo chung về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích thích hợp cho việc sản xuất kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

V. Dược phẩm và dạng bào chế của kháng thể kháng CD200R1

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm và dạng bào chế dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dạng bào chế dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 như được mô tả trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD200R1 là chất có hoạt tính duy nhất của dược phẩm. Các dạng bào chế dược phẩm này có thể được bào chế bằng cách trộn lẫn kháng thể kháng CD200R1, có độ tinh khiết mong muốn, với một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Thông thường, các dạng bào chế dược phẩm này có thể được bào chế dưới dạng dung dịch nước (ví dụ, xem tài liệu: Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.171.586, và Công bố đơn quốc tế số WO2006/044908) hoặc dưới dạng bào chế đông khô nhanh (ví dụ, xem tài liệu: Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6.267.958).

Các chất mang dược dụng thường không có độc tính cho người nhận với

liều lượng và nồng độ được sử dụng. Có rất nhiều chất mang được dụng như vậy là đã được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, xem tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). Các chất mang được dụng làm ví dụ hữu ích trong dạng bào chế của sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimethylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzylic; các hợp chất alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m- cresol); các polypeptit có trọng lượng phân tử thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manosa, hoặc dextrin; các chất chelat hóa như EDTA; các đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối tạo muối như natri; các phức chất kim loại (ví dụ, các phức chất Zn- protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG).

Các chất mang được dụng hữu ích trong các dạng bào chế của sáng chế cũng có thể bao gồm các chất phân tán được chất trong mô kẽ, như các glycoprotein hyaluronidaza có hoạt tính trung hòa hòa tan (sHASEGP) (ví dụ, xem các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968), như các glycoprotein hyaluronidaza PH-20 hòa tan của người (ví dụ, rHuPH20 hoặc HYLENEX[®], Baxter International, Inc.).

Cũng dự định rằng các dạng bào chế được bộc lộ ở đây có thể chứa các thành phần có hoạt tính, ngoài kháng thể kháng CD200R1, nếu cần, đối với chỉ định cụ thể cần được điều trị ở đối tượng được cho sử dụng dạng bào chế. Tốt hơn là thành phần có hoạt tính bổ sung bất kỳ có hoạt tính hỗ trợ cho hoạt tính của kháng thể kháng CD200R1 và các hoạt tính này không tác động có hại với nhau.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 và chất có hoạt tính bổ sung như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế điểm

kiểm soát. Các chất ức chế điểm kiểm soát hữu ích trong các phương án này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể thứ hai có tính đặc hiệu đối với kháng nguyên là phân tử kiểm soát miễn dịch. Theo một số phương án, kháng thể thứ hai có tính đặc hiệu đối với phân tử kiểm soát miễn dịch được chọn từ PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, CRTAM, CTLA-4, BTLA, CD244, CD160, LIGHT, GITR, 4-1BB, OX40, CD27, TMIGD2, ICOS, CD40, CD47, SIRPa, NKG2D, NKG2A, TNFRSF25, CD33, CEA, Epcam, GPC3, CD200, CD200R1, CD73, CD83, CD39, TRAIL, CD226, và VISTA.

Theo ít nhất một phương án, dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 và chất có hoạt tính bổ sung, trong đó chất có hoạt tính bổ sung là kháng thể có tính đặc hiệu đối với phân tử kiểm soát miễn dịch được chọn từ PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, và CRTAM.

Theo ít nhất một phương án, dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 và chất có hoạt tính bổ sung, trong đó chất có hoạt tính bổ sung là kháng thể có tính đặc hiệu đối với phân tử kiểm soát miễn dịch PD1. Các kháng thể làm ví dụ có tính đặc hiệu đối với PD1 là hữu ích trong các phương án của dược phẩm được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dostarlimab, pembrolizumab, nivolumab, và pidilizumab.

Các thành phần hoạt tính có thể được gắn trong vi nang được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa bề mặt phân cách, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc các vi nang gelatin và các vi nang poly-(methylmetacrylat) tương ứng, trong các hệ giải phóng dược chất dạng keo (ví dụ, các liposom, hạt vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và viên nang nano) hoặc trong thể nhũ tương vĩ mô. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Theo một số phương án, dạng bào chế có thể là chế phẩm giải phóng duy trì của kháng thể và/hoặc các thành phần hoạt tính khác. Ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm chất nền bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, các chất nền này ở dạng vật phẩm đã định hình, ví dụ, màng hoặc vi nang.

Thông thường, các dạng bào chế của sáng chế được sử dụng cho đối tượng ở dạng vô khuẩn. Các dạng bào chế vô khuẩn có thể được bào chế để

dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn.

IV. Ứng dụng và phương pháp điều trị

Dự định rằng chế phẩm hoặc dạng bào chế bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc dạng bào chế chứa kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được sử dụng cho ứng dụng hoặc phương pháp bất kỳ, như trong các phương pháp điều trị sử dụng khả năng gắn kết đặc hiệu với CD200R1 của chúng và nhờ đó ức chế, làm giảm, và/hoặc phong bế hoàn toàn chức năng của CD200R1 dưới dạng thụ thể bề mặt tế bào liên quan đến sự điều hòa miễn dịch hoặc truyền tín hiệu, cụ thể là chức năng của CD200R1 trong việc điều hòa âm tính (hoặc ức chế) sự hoạt hóa tế bào T hoặc tế bào NK.

Glycoprotein CD200 của bề mặt tế bào là đích gắn kết tự nhiên của CD200R1. Tuy nhiên, CD200 được biểu hiện rộng rãi hơn trên nhiều loại tế bào khác nhau của người bao gồm tế bào thần kinh, tế bào biểu mô, tế bào nội mô, nguyên bào sợi, và tế bào dạng lymphô, và sự gắn kết của CD200R1 với phối tử CD200 của nó đã được phát hiện là truyền tín hiệu của hoạt tính ức chế miễn dịch. Do đó, dự định rằng kháng thể kháng CD200R1 có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị liên quan đến việc ức chế, làm giảm, và/hoặc phong bế hoàn toàn sự gắn kết đặc hiệu của CD200R1 với CD200.

Có nhiều loại bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh có khả năng được điều trị bằng cách ức chế, làm giảm, và/hoặc phong bế hoàn toàn hoạt tính điều hòa miễn dịch và/hoặc truyền tín hiệu miễn dịch của CD200R1, cụ thể là tác dụng ức chế miễn dịch của CD200R1 đối với sự hoạt hóa tế bào lymphô. Các loại bệnh, rối loạn, và tình trạng bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh ung thư.

Ví dụ, các chất phong bế tác dụng ức chế miễn dịch của một số protein (ví dụ, PD1) hiện đang được phát triển để điều trị nhiều loại bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, các bệnh sacôm, bệnh ung thư có sự mất ổn định vi vệ tinh ở mức cao (MSI-H) (bao gồm cả bệnh ung thư MSI thể rắn), Khối u có gánh nặng đột biến của khối u (TMB) ở mức cao, bệnh ung thư do thiếu sự sửa chữa bắt cặp sai (mismatch repair

deficient: dMMR), bệnh ung thư não, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư cổ tử cung, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh caxinom tuyến EGJ, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư túi mật, bệnh ung thư vùng dạ dày (ví dụ, bệnh caxinoit đường dạ dày-ruột (bệnh caxinoit GI)), bệnh ung thư vùng đầu và cổ, bệnh ung thư tim, bệnh caxinom tế bào gan, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư gan, u melanin, u trung biểu mô (ví dụ, u trung biểu mô màng phổi), bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư buồng trứng biểu mô, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư thể rắn ở trẻ em, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư lách, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư tuyến giáp thể tủy hoặc bệnh ung thư tuyến giáp thể nang), các bệnh ung thư máu (ví dụ, u lymphô tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), các bệnh bạch cầu, u lymphô, u tủy), caxinom tế bào thận, caxinom thận tế bào sáng, các khối u thần kinh nội tiết (ví dụ, u tế bào ưa crom và u cận hạch ác tính), và bệnh ung thư tử cung. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ), bệnh ung thư da (ví dụ, u melanin), bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư buồng trứng, u trung biểu mô, và bệnh ung thư bàng quang. Do đó, dự định rằng chế phẩm hoặc dạng bào chế bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc dạng bào chế chứa kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế có thể được sử dụng cho phương pháp hoặc ứng dụng để điều trị bệnh ung thư bất kỳ trong số các bệnh ung thư đã liệt kê trên đây. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ), bệnh ung thư da (ví dụ, u melanin), bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư màng trong tử cung, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư kết-trực tràng, bệnh ung thư buồng trứng, u trung biểu mô và bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế hoặc cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của được phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế và chất mang được dụng.

Khi được bộc lộ ở đây, bao gồm cả trong các ví dụ dưới đây, kháng thể

kháng CD200R1 của sáng chế có khả năng làm giảm, ức chế, và/hoặc phong bế sự gắn kết của CD200R1 với CD200, và nhờ đó làm thay đổi các con đường truyền tín hiệu. Do đó, theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh qua trung gian CD200R1 ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế hoặc cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế và chất mang dược dụng. Tương tự, theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh do sự gắn kết với CD200 được biểu hiện trên tế bào làm trung gian gây ra ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế hoặc cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm có thể chứa kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 1 mg/kg hoặc kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 10 mg/kg. Lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm có thể chứa kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 2 mg/kg hoặc kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 20 mg/kg. Lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm có thể chứa kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 0,3mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 1,0mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 3,0mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 10mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 30mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 100mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 300mg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 900mg, hoặc kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 1400mg. Lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm có thể chứa kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 10 mg/kg, kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 20 mg/kg, hoặc kháng thể kháng CD200R1 với lượng ít nhất khoảng 100 mg/kg. Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm có thể chứa lượng kháng thể kháng CD200R1 nằm trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ đã

nêu ở trên.

Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm có thể tạo ra hiệu quả ngoài đích không đáng kể. Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể kháng CD200R1 với liều không quá 10 mg/kg có thể có hiệu quả ngoài đích không đáng kể. Theo ví dụ khác, trong một số trường hợp, kháng thể kháng CD200R1 với liều không quá 20 mg/kg hoặc với liều không quá 100 mg/kg có thể có hiệu quả ngoài đích không đáng kể. Theo một số phương án, hiệu quả ngoài đích có thể bao gồm sự gắn kết không đặc hiệu (ví dụ, khi được xác định bằng thử nghiệm ELISA BV) hoặc khả năng phản ứng chéo trong mô của người. Trong một số dược phẩm, kháng thể kháng CD200R1 với lượng có hiệu quả điều trị khác được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng của hai lượng có hiệu quả điều trị bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này có thể có hiệu quả ngoài đích không đáng kể.

Việc sử dụng kháng thể kháng CD200R1, chế phẩm, hoặc dạng bào chế dược phẩm theo phương pháp điều trị tạo ra hiệu quả điều trị do kháng thể để bảo vệ đối tượng không bị bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra và/hoặc điều trị sự tiến triển của bệnh này ở đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp điều trị có thể còn bao gồm bước sử dụng một hoặc nhiều chất điều trị hoặc phương pháp điều trị bổ sung đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra. Các phương pháp này bao gồm bước sử dụng một hoặc nhiều chất bổ sung có thể bao gồm việc sử dụng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất điều trị được đưa vào cùng dạng bào chế hoặc dạng bào chế riêng biệt), và việc sử dụng riêng rẽ, trong trường hợp này, việc sử dụng chế phẩm hoặc dạng bào chế của kháng thể có thể xảy ra trước khi, đồng thời, và/hoặc sau khi sử dụng chất điều trị bổ sung.

Theo một số phương án của phương pháp điều trị theo sáng chế, kháng thể kháng CD200R1 hoặc dạng bào chế dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 được sử dụng cho đối tượng theo chế độ sử dụng bất kỳ để cung cấp chất này qua đường toàn thân, hoặc đến mô đích mong muốn. Việc sử dụng qua đường toàn thân thường để chỉ chế độ sử dụng bất kỳ của kháng thể vào đối tượng ở một vị trí không phải là sử dụng trực tiếp vào vị trí, mô hoặc cơ quan

đích mong muốn sao cho kháng thể hoặc dạng bào chế của nó đi vào hệ tuần hoàn của đối tượng và, do đó được chuyển hóa hoặc đi qua các quá trình tương tự khác.

Do đó, các chế độ sử dụng hữu ích trong phương pháp điều trị của sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm, tiêm truyền, nhỏ giọt và hít. Việc sử dụng bằng cách tiêm có thể bao gồm tiêm hoặc tiêm truyền qua đường trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, trong vỏ, trong não thất, trong bao, trong ổ mắt, trong tim, trong chân bì, trong màng bụng, trong khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới vỏ, dưới màng nhện, trong cột sống, trong não tủy, và trong xương ức.

Theo một số phương án, dạng bào chế được phẩm của kháng thể kháng CD200R1 được bào chế sao cho kháng thể này được bảo vệ không bị bất hoạt trong ruột. Do đó, phương pháp điều trị có thể bao gồm bước sử dụng dạng bào chế qua đường miệng.

Theo một số phương án, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng các chế phẩm hoặc dạng bào chế chứa kháng thể kháng CD200R1. Ngoài ra, theo một số phương án, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng chế phẩm hoặc dạng bào chế chứa kháng thể kháng CD200R1 trong việc sản xuất hoặc bào chế thuốc, cụ thể là thuốc để điều trị, phòng ngừa hoặc ức chế bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra. Theo phương án khác, thuốc này để sử dụng trong phương pháp điều trị, phòng ngừa hoặc ức chế bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra sử dụng lượng hữu hiệu của thuốc này. Theo một số phương án nhất định, thuốc này còn chứa lượng hữu hiệu của ít nhất một chất điều trị, tác nhân điều trị bổ sung. Các chất điều trị hoặc tác nhân điều trị bổ sung làm ví dụ có thể được sử dụng trong các thuốc này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể có tính đặc hiệu đối với phân tử kiểm soát miễn dịch như PD1, TIGIT, LAG3, PVRIG, KIR, TIM-3, CRTAM, CTLA-4, BTLA, CD244, CD160, LIGHT, GITR, 4-1BB, OX40, CD27, TMIGD2, ICOS, CD40, CD47, SIRPa, NKG2D, NKG2A, TNFRSF25, CD33, CEA, Epcam, GPC3, CD73, CD83, CD39, TRAIL, CD226, và VISTA. Theo ít nhất một phương án, chất điều trị hoặc tác nhân điều trị bổ sung có mặt trong thuốc của sáng chế là kháng thể có tính đặc hiệu đối với phân

tử kiểm soát miễn dịch PD1 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể được chọn từ dostarlimab, pembrolizumab, nivolumab, và pidilizumab.

Theo phương án khác, thuốc dùng để điều trị, ức chế hoặc phòng ngừa bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của thuốc để điều trị, ức chế hoặc phòng ngừa bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra.

Để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra, liều lượng thích hợp của kháng thể kháng CD200R1 có mặt trong các chế phẩm và dạng bào chế của sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào bệnh hoặc tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị, mức độ nặng và diễn biến của bệnh, kháng thể này được sử dụng cho mục đích phòng ngừa hay điều trị bệnh, liệu pháp trước đó được sử dụng cho bệnh nhân, tiền sử trong lâm sàng của bệnh nhân và sự đáp ứng với kháng thể, và quyết định của bác sĩ điều trị. Kháng thể kháng CD200R1 được đưa vào các chế phẩm và dạng bào chế được mô tả ở đây, có thể được sử dụng theo cách thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm, hoặc trong loạt phương pháp điều trị. Các liệu trình dùng liều khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng một hoặc nhiều lần trong các thời điểm khác nhau, sử dụng liều lớn, và truyền xung được dự định ở đây.

Tùy thuộc vào loại và mức độ nặng của bệnh, lượng kháng thể kháng CD200R1 nằm trong khoảng từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 20 mg/kg trong dạng bào chế của sáng chế là liều lượng thử nghiệm ban đầu để sử dụng cho đối tượng là người, bất kể bằng cách, ví dụ, sử dụng một hoặc nhiều lần riêng biệt, hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục. Nói chung, liều lượng được sử dụng của kháng thể có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg . Theo một số phương án, một hoặc nhiều liều bằng khoảng 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg , 10 mg/kg , 20 mg/kg , hoặc nằm trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho đối tượng là người. Theo một số phương án, liều được sử dụng cho đối tượng là người có thể lớn hơn khoảng 20 mg/kg .

Theo một số phương án, lượng có hiệu quả điều trị có thể được sử dụng cho đối tượng, như đối tượng là người. Lượng có hiệu quả điều trị có thể bằng

ít nhất khoảng 1 mg/kg, ít nhất khoảng 10 mg/kg, ít nhất là khoảng liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 1 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Lượng có hiệu quả điều trị có thể bằng ít nhất khoảng 2 mg/kg, ít nhất khoảng 20 mg/kg, hoặc ít nhất là khoảng liều dùng nằm trong khoảng từ khoảng 2 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg. Lượng có hiệu quả điều trị có thể bằng ít nhất khoảng 0,3mg, ít nhất khoảng 1,0mg, ít nhất khoảng 3,0mg, ít nhất khoảng 10mg, ít nhất khoảng 30mg, ít nhất khoảng 100mg, ít nhất khoảng 300mg, ít nhất khoảng 900mg, ít nhất khoảng 1400 mg/kg, hoặc ít nhất là khoảng liều dùng nằm trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên. Lượng có hiệu quả điều trị có thể bằng ít nhất khoảng 10 mg/kg, ít nhất khoảng 20 mg/kg, ít nhất khoảng 100 mg/kg, hoặc ít nhất là khoảng liều dùng nằm trong khoảng giữa hai giá trị bất kỳ nêu trên.

Việc sử dụng liều lượng có thể được duy trì trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh của đối tượng, ví dụ, việc sử dụng có thể tiếp tục cho đến khi bệnh do CD200R1 làm trung gian gây ra được điều trị đủ, khi được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, có thể sử dụng liều tải ban đầu ở mức cao, sau đó sử dụng một hoặc nhiều liều thấp hơn (ví dụ, một hoặc nhiều liều duy trì). Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác có thể hữu ích. Sự tiến triển của hiệu quả điều trị trong khi sử dụng liều dùng có thể được theo dõi bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Do đó, theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, việc sử dụng kháng thể kháng CD200R1 bao gồm việc sử dụng liều lượng hàng ngày nằm trong khoảng từ khoảng 1 mg/kg đến khoảng 100 mg/kg. Theo một số phương án, liều lượng của kháng thể kháng CD200R1 chứa liều lượng hàng ngày bằng ít nhất khoảng 1 mg/kg, ít nhất khoảng 5 mg/kg, ít nhất khoảng 10 mg/kg, ít nhất khoảng 20 mg/kg, hoặc ít nhất khoảng 30 mg/kg.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các dấu hiệu và phương án khác nhau của sáng chế sẽ được minh họa trong các ví dụ làm đại diện sau đây, các ví dụ này được đưa ra nhằm mục đích minh họa, và không làm giới hạn sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu rằng các ví dụ cụ thể chỉ để minh họa cho sáng chế như được mô tả đầy đủ hơn trong phần yêu cầu bảo hộ sau đó. Mọi phương án

và dấu hiệu được mô tả trong đơn sáng chế này cần được hiểu là có thể thay thế cho nhau và có thể kết hợp với mọi phương án có trong đó.

Ví dụ 1: Tạo ra các polypeptit CD200R1

Ví dụ này minh họa việc tạo ra các cấu trúc polypeptit CD200R1 khác nhau được sử dụng làm kháng nguyên để tạo ra và sàng lọc kháng thể kháng CD200R1 của sáng chế.

A. Tạo ra CD200R1

Các miền ngoại bào của bốn thể đồng dạng hu-CD200R1 là hu-CD200R1-iso4-Alt (SEQ ID NO: 1), hu-CD200R1-iso4-Ref (SEQ ID NO: 2), hu-CD200R1-iso1-Alt (SEQ ID NO: 3), hu-CD200R1-iso1-Ref (SEQ ID NO: 4), và các phân đoạn của miền ngoại bào tương tự của khỉ cynomolgus CD200R1 (SEQ ID NO: 5), và khỉ rhesus CD200R1 (SEQ ID NO: 6), được tách dòng vào các vectơ biểu hiện của động vật có vú với gen khởi đầu CMV để biểu hiện. Các cấu trúc chứa đuôi tinh chế ở đầu tận cùng C, GGGSGGLNDIFEAKIEWHEGSGGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 90) và tín hiệu tiết chuỗi nặng IgG1 của chuột ở đầu tận cùng N, MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 91). Các polypeptit CD200R1 tái tổ hợp được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ thống Expi293 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) với hướng dẫn tiêu chuẩn. Môi trường dịch nổi bề mặt được làm trong bằng cách ly tâm ở tốc độ 300g và sau đó được lọc bằng bộ lọc cỡ 0,22 micron. CD200R1 tái tổ hợp được tinh chế ra khỏi môi trường đã lọc bằng phương pháp sắc ký ái lực kim loại cố định với cột Histrap FF (GE Healthcare, Chicago, IL, Mỹ) được nối với hệ thống thiết bị tinh chế Akta (GE Healthcare). Dung môi rửa giải của cột Histrap được tinh chế thêm bằng cách sắc ký loại trừ theo kích cỡ trong chất đệm 1x PBS với cột Superdex 200 được nối với hệ thống thiết bị tinh chế Akta (GE Healthcare). Phân đoạn chính của protein đã tinh chế được cô đặc và lọc bằng bộ lọc cỡ 0,22 micron.

B. Tạo ra CD200

Miền ngoại bào của CD200 của người (SEQ ID NO: 7), và CD200 của khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 8) được tách dòng vào các vectơ biểu hiện của động vật có vú với gen khởi đầu CMV để biểu hiện. Các cấu trúc chứa tín hiệu

tiết chuỗi nặng IgG1 của chuột ở đầu tận cùng N (SEQ ID NO: 91) và vùng có thể kết tinh phân đoạn (Fc) IgG của người ở đầu tận cùng C có sự đột biến N297G (SEQ ID NO: 9). Các polypeptit CD200-Fc được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ thống Expi293 (ThermoFisher) với hướng dẫn tiêu chuẩn. Môi trường dịch nổi bề mặt được làm trong bằng cách ly tâm ở tốc độ 300g và sau đó được lọc bằng bộ lọc cỡ 0,22 micron. CD200-Fc tái tổ hợp được tinh chế ra khỏi môi trường đã lọc bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột MabSelect SuRe (GE Healthcare) được nối với hệ thống thiết bị tinh chế Akta (GE Healthcare). CD200-Fc đã tinh chế được rửa giải ra khỏi cột MabSelect SuRe bằng natri xitrat 100mM, độ pH = 3,0 và được làm trung hòa tức thì bởi Tris 100mM, độ pH = 8,8. Dung môi rửa giải MabSelect SuRe được tinh chế thêm bằng cách sắc ký loại trừ theo kích cỡ trong chất đệm 1x PBS với cột Superdex 200 được nối với hệ thống thiết bị tinh chế Akta (GE Healthcare). Phân đoạn chính của protein đã tinh chế được cô đặc và lọc bằng bộ lọc cỡ 0,22 micron.

Ví dụ 2: Tạo ra kháng thể kháng CD200R1 bằng cách sử dụng phương pháp tế bào lai, sàng lọc và xác định tính chất

Ví dụ này minh họa các phương pháp sử dụng công nghệ tế bào lai của chuột để tạo ra kháng thể kháng CD200R1, và các phương pháp sàng lọc và chọn lọc kháng thể để xác định tính chất thêm.

A. Chiến dịch gây miễn dịch

Việc gây miễn dịch cho chuột BalbC (đối với 22.1) hoặc chuột Swiss Webster (đối với 10F6) được tiến hành với các miên ngoại bào tái tổ hợp của polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt (SEQ ID NO: 1) và polypeptit haplotyp hu-CD200R1-iso4-Ref (SEQ ID NO: 2), được sản xuất tại chỗ. Hệ chất phụ trợ Sigma (Millipore Sigma St. Louis, MO) được sử dụng cho tất cả các lần gây miễn dịch. Chuẩn độ được xác định bằng thử nghiệm ELISA như được mô tả dưới đây. Các con chuột được lựa chọn dựa trên chuẩn độ của chúng được tạo ra trước khi gây miễn dịch tăng cường bằng thể dung hợp lần cuối mà không có chất phụ trợ. Một ngày sau đó, lách được thu hoạch và xử lý theo quy trình tiêu chuẩn. Các tế bào lách được dung hợp với các tế bào u tủy P3X63Ag8.653 (Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ CRL 1580) bằng cách sử dụng PEG và theo

các quy trình tiêu chuẩn và được đàn mỏng trong các đĩa có 96 lỗ với mật độ khoảng 50.000 tế bào u tủy/lỗ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn để làm tăng đến mức tối đa tính vô tính của các khuẩn lạc tạo thành. Các tế bào lai gốc được chọn lọc bằng cách sử dụng môi trường chọn lọc được bổ sung AH (Azaserin + Hypoxanthin).

B. Sàng lọc dịch nổi bề mặt chứa tế bào lai bằng thử nghiệm ELISA

Sau khi nuôi cấy 12-14 ngày, dịch nổi bề mặt được thu thập và sàng lọc sơ cấp bằng thử nghiệm ELISA với đĩa có 96 lỗ được phủ CD200R1 của người. Các đĩa đáy phẳng MAXISORP® có 96 lỗ (ThermoScientific, catalog số 439454) được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C với lượng 50µl protein/lỗ ở nồng độ 1µg/ml trong chất đệm phủ (chất đệm cacbonat 0,05M, độ pH = 9,6 hoặc nước muối đệm phosphat, PBS). Sau khi loại bỏ dung dịch phủ, sự gắn kết không đặc hiệu được phong bế bằng cách bổ sung 200µl dung dịch thử nghiệm/phong bế chứa albumin huyết thanh bò (BSA) 1% trong nước muối đệm phosphat (PBS) có độ pH = 7,4 (chất pha loãng cho thử nghiệm ELISA) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ.

C. Giải trình tự tế bào lai

Tập hợp tế bào lai sản sinh ra kháng thể đơn dòng kháng CD200R1 được cho phát triển đến mật độ $1-3 \times 10^5$ trong môi trường tế bào lai tiêu chuẩn (DMEM/F12, FBS 10%, Glutamax 1%, pen 1%/strep) trong thời gian 7-10 ngày trong bình T75 với khả năng sống >80%. 1-3 triệu tế bào từ môi trường nuôi cấy được tạo viên vón trong ống falcon dung tích 15ml ở tốc độ 300g trong 5 phút. Các tế bào đã tạo viên được rửa bằng cách tái tạo hỗn dịch các tế bào trong 5ml PBS được làm lạnh bằng đá lạnh. PBS được loại bỏ và các tế bào được tái tạo hỗn dịch trong 1ml chất phản ứng TRIZOL (Life technologies). Dịch tan được cho đi qua bơm tiêm loại 1ml với kim tiêm cỡ 20G1 (BD 305175) 20 lần để đảm bảo sự làm tan các tế bào. Hỗn dịch tế bào/TRIZOL được làm đông lạnh tức thì trên đá khô và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi xử lý.

ARN tổng số được phân lập từ dịch tan bằng cách sử dụng kit Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) và 5µg ARN tổng số được sử dụng để tạo ra cADN của tế bào lai có sẵn 5'-RACE bằng cách sử dụng kit SMARTer

RACE 5' (Takara). Để khuếch đại các mảnh gen đặc hiệu chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ cADN, các đoạn mồi sau đây được sử dụng kết hợp với đoạn mồi thường dùng được cung cấp trong kit trong phản ứng PCR 5'-RACE:

(a) các đoạn mồi của vùng biến đổi đặc hiệu của họ vùng VH ở chuột
TCTTGTCCACCTTGGTGCTGCTGGCCGG (SEQ ID NO: 92),
TTTGTCCACCGTGGTGCTGCTGGCTGGT (SEQ ID NO: 93);

(b) đoạn mồi của vùng biến đổi đặc hiệu của họ vùng Vkappa ở chuột:
GATCAGTCCAACCTGTTTCAGGACGCC (SEQ ID NO: 94); hoặc

(c) các đoạn mồi của vùng biến đổi đặc hiệu của họ vùng Vlambda ở chuột: ACACTCAGCACGGGACAACTCTTCTCCACAGT (SEQ ID NO: 95), ACACTCTGCAGGAGACAGACTCTTTTCCACAGT (SEQ ID NO: 96), ACACTCAGCACGGGACAACTCTTCTCCACATG (SEQ ID NO: 97).

Các sản phẩm PCR được tinh chế và tách dòng vào pRACE bằng cách sử dụng kit tách dòng In-Fusion (Takara) và cả hai sợi đều được giải trình tự bằng cách sử dụng thiết bị giải trình tự Sanger với đoạn mồi xuôi M13 và đoạn mồi ngược M13. Các trình tự của miền VL, miền VH, và vùng siêu biến (HVR) của bảy tế bào lai kháng CD200R1 (10F6, 9B8, 5D1, 10A2, 1F3, 11E4, 22.1) được tóm tắt trong Bảng 2. Sự đóng thẳng hàng các trình tự của 10F6, 9B8, 5D1, 10A2, 1F3, 11E4, 22.1 và kháng thể có bán trên thị trường, OX108, được cung cấp cho các miền VL trên **Fig.1A** và các miền VH trên **Fig.1B**.

D. Làm cho kháng thể 10F6 và 22.1 giống với kháng thể của người

Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể 10F6 của chuột được đóng thẳng hàng so với trình tự kháng thể dòng mầm của người, và chuỗi nhẹ kappa dòng mầm của người (ID gen: IGKJ4.02) và chuỗi nặng dòng mầm của người (ID gen: IGHJ4.03) được xác định là vùng khung của người gần giống nhất (sự đóng thẳng hàng được thể hiện trên **Fig.2**). Các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của 10F6 của chuột được ghép vào các vùng khung của người được xác định là gần giống nhất tương ứng để tạo ra dòng kháng thể được làm cho giống với của người. Trong quá trình này, các vị trí 24-34 trong vùng CDR-L1, 50-56 trong vùng CDR-L2 và 89-97 trong vùng CDR-L3 của VL 10F6 của chuột được ghép vào thể nhận vùng khung chuỗi nhẹ kappa của người, và các vị trí

31-35 trong vùng CDR-H1, 50-61 trong vùng CDR-H2, và 93-102 trong vùng CDR-H3 của VH của 10F6 của chuỗi được ghép vào thể nhận vùng khung chuỗi nặng của người. Các trình tự của miền VH, miền VL, và vùng HVR tạo thành của phiên bản kháng thể 10F6 được làm cho giống với của người, “h10F6” được tóm tắt trong Bảng 3. Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của h10F6 cũng được thể hiện trên Bảng 3. Kháng thể 22.1 được làm cho giống với của người theo cách tương tự để tạo ra kháng thể h22.1. Các trình tự liên quan của kháng thể h22.1 cũng được tóm tắt trong Bảng 3.

E. Mức độ biểu hiện và độ tinh khiết của kháng thể h10F6 và h22.1

Các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể 10F6 được làm cho giống với của người (h10F6) và kháng thể 22.1 được làm cho giống với của người được tổng hợp và tách dòng vào plasmit pRK. Sự biểu hiện của kháng thể 10F6 IgG và 22.1 IgG được làm cho giống với của người tái tổ hợp được thực hiện bằng cách sử dụng hệ biểu hiện Expi293F (Life Technologies) theo hướng dẫn được cung cấp. Tỷ lệ của các plasmit đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được duy trì ở mức 1: 1 đối với phản ứng chuyển nhiễm và các tế bào đã chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 6 ngày trước khi thu hoạch. Phân tử IgG tái tổ hợp được tinh chế bằng các quy trình sau. Môi trường dịch nổi bề mặt được làm trong bằng cách ly tâm ở tốc độ 300g trong 10 phút để loại bỏ các tế bào và bằng cách lọc bằng bộ lọc cỡ 0,22 micron. Môi trường dịch nổi bề mặt đã được làm trong được trộn với nhựa POROS MabCapture A (Thermo Scientific) được làm cân bằng bằng chất đệm và được ủ kèm theo quay nhẹ trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ, hỗn dịch đặc được tải vào cột và nhựa được rửa bằng 20 lần thể tích cột của chất đệm PBS chứa NaCl 0,5M, sau đó rửa giải bằng 3 lần thể tích cột của axit axetic 0,1M, NaCl 0,15M. Dung dịch rửa giải được trung hòa nhanh đến độ pH = 5,2 bằng MOPS 1M, độ pH = 7,0 và chất đệm được trao đổi thành chất đệm PBS với cột PD-10(GE Healthcare).

Ví dụ 3: Ái lực gắn kết, vẽ bản đồ epitop, và khả năng phong bế của kháng thể kháng CD200R1

Ví dụ này minh họa các nghiên cứu về đặc tính gắn kết và epitop của

kháng thể kháng CD200R1 điều chế được trong các Ví dụ 1 và 2.

A. Các phép đo ái lực gắn kết của CD200R1

Để xác định ái lực gắn kết của kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người, h10F6, với các thể đồng dạng của người CD200R1 khác nhau (Iso1 và Iso4, haplotyp thay thế hoặc tham chiếu) và với CD200R1 của khỉ cyno, các phép đo SPR được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị BIACORE™ 8K. Tóm lại, hệ pha loãng theo tỷ lệ 1:4 của chất phản ứng Biotin CAPture (GE) vào chất đệm HBS-EP (HEPES 0,01M có độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) được phủ cho chip với tốc độ dòng 2 μ l/phút. Đối với các phép đo động học, CD200R1 của người được biotinyl hóa 3nM. Tiếp theo, các hệ pha loãng theo bậc 3 lần của kháng thể, h10F6 trong chất đệm HBS-P (HEPES 0,01M có độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) được bơm từ nồng độ thấp (0,27nM) đến nồng độ cao (200nM) (tốc độ dòng: 30 μ l/phút) ở nhiệt độ 37°C. Biểu đồ cảm biến được ghi lại và tham chiếu và trừ đi chất đệm trước khi đánh giá bằng phần mềm đánh giá BIACORE® 8K (phiên bản 1.1.1.7442). Tỷ lệ kết hợp (k_{on}) và tỷ lệ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir theo tỷ lệ một-một đơn giản. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính toán theo tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Ái lực gắn kết của h10F6 với cyno-CD200R1 được xác định với cùng quy trình, bằng cách sử dụng cyno-CD200R1 được biotinyl hóa 6nM. Dữ liệu về ái lực gắn kết của h10F6 với các thể đồng dạng hu-CD200R1 khác nhau được tóm tắt dưới đây trong **Bảng 4**.

Bảng 4: Ái lực gắn kết của h10F6 và OX108 với bốn thể đồng dạng hu-CD200R1 khác nhau

	hu-CD200R1-iso4-Ref			hu-CD200R1-iso1-Ref		
dòng	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
h22.1	5.98E+05	1.15E-03	1.92E-09	3.02E+06	1.51E-03	5.01E-10
h11E4	1.90E+05	1.21E-04	6.39E-10	2.03E+05	1.13E-04	5.58E-10
h10A2	9.34E+05	1.41E-01	1.50E-07	1.13E+05	2.52E-02	2.24E-07
h10F6	7.17E+05	6.05E-05	8.43E-11	1.37E+06	7.47E-05	5.47E-11

h1F3	7.27E+05	1.96E-01	2.69E-07	2.02E+05	3.97E-02	1.97E-07
h5D1	6.69E+05	1.80E-01	2.70E-07	3.36E+05	2.35E-02	7.02E-08
h9B8	8.83E+02	6.09E-03	6.89E-06	3.56E+04	1.06E-02	2.97E-07
OX10 8	2.40E+05	3.89E-03	1.62E-08	3.43E+06	7.65E-03	2.23E-09
	hu-CD200R1-iso4-Alt			hu-CD200R1-iso1-Alt		
h22.1	6.04E+05	1.16E-03	1.92E-09	3.11E+06	1.66E-03	5.35E-10
h11E4	1.73E+05	1.55E-04	8.94E-10	1.93E+05	1.71E-04	8.85E-10
h10A2	6.79E+05	5.16E-03	7.61E-09	3.71E+05	4.33E-03	1.17E-08
h10F6	7.57E+05	6.91E-05	9.13E-11	1.40E+06	9.79E-05	7.00E-11
h1F3	2.19E+05	9.59E-04	4.37E-09	1.65E+05	8.78E-04	5.32E-09
h5D1	6.02E+05	4.69E-03	7.80E-09	3.33E+05	4.02E-03	1.21E-08
h9B8	8.65E+05	1.21E-02	1.40E-08	3.72E+05	9.48E-03	2.55E-08
OX108	2.57E+05	3.86E-03	3.86E-03	3.86E+06	8.24E-03	2.13E-09

Kết quả: Như được thể hiện trong Bảng 4, h10F6 có ái lực gắn kết với hu-CD200R1 cao hơn từ 100 lần đến 1000 lần so với kháng thể có bán trên thị trường, OX108. Ái lực này phụ thuộc vào thể đồng dạng và haplotyp của hu-CD200R1 cụ thể được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết. Do thể đồng dạng 4 (iso4) của CD200R1 dài là dạng chiếm ưu thế (thể đồng dạng 4 được dự đoán là có tỷ lệ 86% và thể đồng dạng 1 được dự đoán là có tỷ lệ 14% trong số những người khỏe mạnh từ phân tích dự đoán được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp dự đoán có dẫn hướng bộ gen và định lượng các sự kiện ghép nối từ dữ liệu seq-ARN từ các mẫu của người khỏe mạnh và mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân mắc ALS, T1D, bệnh nhiễm khuẩn và bệnh xơ cứng rải rác trước và sau khi điều trị bằng interferon-beta (ví dụ, xem tài liệu: Linsley P.S., et al., PLoS One, 9(10): e109760 (2014)), với tần suất haplotyp tham chiếu và thay thế được phân chia chủ yếu theo quần thể (Ref 46% và Alt 54%), chất điều trị kháng CD200R1 cần phải gắn kết với ái lực cao với cả haplotyp tham chiếu và thay thế của thể đồng dạng 4 chiếm ưu thế để điều chỉnh tính không đồng nhất của bệnh nhân và cho phép điều trị trên quần thể rộng nhất. h10F6 gắn kết thể

đồng dạng 4 thay thế (alt) và thể đồng dạng 4 tham chiếu (ref) với ái lực lớn hơn 1000 lần so với OX108. Trái lại, OX108 gắn kết với thể đồng dạng 1 ít phổ biến hơn với ái lực lớn hơn 10 lần so với ái lực gắn kết của nó đối với thể đồng dạng 4 chiếm ưu thế, điều này làm cho nó ít thích hợp hơn làm chất điều trị. Ái lực của h10F6 với cyno-CD200R1 là >1000 nM.

B. Mức độ phong bế hu-CD200R1 được xác định bằng thử nghiệm ELISA

h10F6, và 6 kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người khác (h22.1, h9B8, h5D1, h10A2, h1F3, và h11E4) được thử nghiệm để phong bế hu-CD200R1 bằng thử nghiệm ELISA như sau. Các đĩa đáy phẳng có 96 lỗ MAXISORP® (Thermofisher, Cat# 439454) được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bằng CD200-Fc của người 1 $\mu\text{g/ml}$ trong PBS. Sau khi loại bỏ dung dịch phủ, sự gắn kết không đặc hiệu được phong bế bằng PBS chứa 1% albumin huyết thanh bò (BSA) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Sau đó, các đĩa được rửa năm lần trong PBS với TWEEN®-20 0,05% (chất đệm rửa). Trong suốt khoảng thời gian phong bế, CD200R1 của người được biotinyl hóa 0,1nM hoặc 0,4 nM với lượng 60 $\mu\text{l/lỗ}$ cùng với hệ pha loãng theo bậc của các kháng thể với lượng 60ul/lỗ (bắt đầu ở mức 0,3uM, pha loãng theo tỷ lệ 1:4) trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng PBS chứa BSA 0,5% và Tween 20 0,05% (chất đệm dùng cho thử nghiệm ELISA) trong đĩa NUNC F (Thermofisher, Cat# 269620). Sau đó chuyển dung dịch hỗn hợp kháng nguyên-kháng thể với lượng 100 $\mu\text{l/lỗ}$ vào các lỗ đã phủ huCD200-Fc ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Tiếp đó, các đĩa được rửa bằng chất đệm rửa và bổ sung Streptavidin poly-HRP với lượng 50 $\mu\text{l/lỗ}$ (Thermofisher, Cat#21140) được pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 trong chất đệm dùng cho phản ứng ELISA ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Các đĩa được rửa bằng chất đệm rửa và làm hiện màu trong 15 phút bằng cách cho thêm cơ chất peroxidaza dùng cho vi lỗ tetrametylbenzidin (TMB) (VWR, Cat# 95059-156) với lượng 50 $\mu\text{l/lỗ}$. Sự làm hiện màu bằng enzym được làm ngừng bằng dung dịch làm ngừng TMB với lượng 50 $\mu\text{l/lỗ}$ (VWR, Cat# 95059-200). Các đĩa được phân tích bằng đầu đọc đĩa SpectraMax i3X (Molecular Devices) ở bước sóng 450nm.

Kết quả: Các đồ thị thể hiện dữ liệu phong bế theo thử nghiệm ELISA của h10F6, h22.1, h9B8, h5D1, h10A2, h1F3, h11E4, đối với các thể đồng dạng

khác nhau của hu-CD200R1 được thể hiện trên Fig.3. Như được thể hiện bằng đồ thị, kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người, h10F6 là chất phong bế sự tương tác hu-CD200:hu-CD200R1 tốt hơn so với các kháng thể kháng CD200R1 khác được thử nghiệm.

Nồng độ IC₅₀ phong bế là nồng độ của h10F6 ức chế 50% sự gắn kết của hu-CD200R1 được biotinyl hóa với hu-CD200-Fc được phủ. Như được thể hiện bằng giá trị IC₅₀ được tóm tắt trong Bảng 5, h10F6 phong bế sự tương tác hu-CD200:hu-CD200R1 với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 1,7nM đến 6,6nM, tùy thuộc vào thể đồng dạng và haplotyp của hu-CD200R1 cụ thể được sử dụng trong thử nghiệm phong bế.

Bảng 5: Giá trị IC₅₀ phong bế CD200 của h10F6 với hu-CD200R1.

Kháng thể	IC ₅₀ phong bế hu-CD200:hu-CD200R1 (nM)			
	hu-CD200R1-Iso4-Ref	hu-CD200R1-Iso1-Ref	hu-CD200R1-Iso4-Alt	hu-CD200R1-Iso1-Alt
h10F6	1,77	5,26	2,24	6,62
h22.1	5,32	5,86	4,59	7,45
h9B8	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế	27,91	21,1
h5D1	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế	23,66	25,5
h10A2	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế	56,51	55,0
h1F3	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế	14,79	21,4
h11E4	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế	Không có chất phong bế

C. Phân tích sự phân nhóm epitop

Các thử nghiệm phân nhóm epitop được tiến hành trên sáu kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người là h10F6, h9B8, h5D1, h10A2, h1F3, h11E4, và h22.1, được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 2. Các phép đo sự phân nhóm epitop được thực hiện với hệ thống OctetRed96

bằng cách bắt giữ CD200R1 của người được biotiny hóa trên thiết bị cảm biến SAV Octet (ForteBio), gắn kết kháng thể 1, và sau đó phát hiện kháng thể 2. Nếu kháng thể 2 có khả năng gắn kết với CD200R1 đã gắn kết với kháng thể 1 thì hai kháng thể này được phân định thành các nhóm khác nhau. Nếu kháng thể 2 không có khả năng gắn kết với CD200R1 đã gắn kết với kháng thể 1 thì hai kháng thể này được phân định vào cùng nhóm epitop.

Kết quả: Kết quả của thử nghiệm phân nhóm epitop được tóm tắt trong **Bảng 6**. Sáu kháng thể kháng CD200R1 được đánh giá bằng cách xác định theo sự phân nhóm epitop để nhận biết 3 epitop riêng biệt trên CD200R1. h10F6 và h22.1 được xác định là gắn kết với các epitop phong bế CD200 chồng lên nhau trên CD200R1. Các kháng thể h9B8, h10A2, h5D1 và h1F3 dùng chung nhóm epitop, trong khi h11E4 gắn kết với epitop khác biệt trên CD200R.

Bảng 6: Kết quả phân nhóm epitop của kháng thể kháng CD200R1.

Kháng thể	h9B8	h5D1	h10F6	h10A2	h11E4	h1F3	h22.1
h9B8	-	-	+	-	+	-	+
h5D1	-	-	+	-	+	-	+
h10F6	+	+	-	+	+	+	-
h10A2	-	-	+	-	+	-	+
h11E4	+	+	+	+	-	+	+
h1F3	-	-	+	-	+	-	+
h22.1	+	+	-	+	+	+	-

D. Thử nghiệm trên cơ sở tế bào về sự phong bế hu-CD200R1 bởi kháng thể

Hoạt tính phong bế của kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người được thử nghiệm trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào như sau. Các tế bào U937 biểu hiện ổn định hu-CD200R1 (UNQ# Q8TD46) được ủ với TruStain FcX của người (Biolegend, catalog #422302) trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C trước khi cho thêm kháng thể kháng CD200R1 trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa, và sau đó được ủ với huCD200-Fc-Flag 55nM trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa, và sau đó sự gắn kết huCD200-Fc-Flag được phát hiện bằng cách ủ với dòng L5 kháng Flag-PE (Biolegend

Catalog# 637310) trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sự gắn kết tế bào được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng bằng thiết bị CytoFLEX (Beckman Coulter). Các đường cong gắn kết được tính toán dựa trên cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI).

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.4**, kháng thể BinA, h10F6 có mức độ phong bế hu-CD200R1 (nghĩa là giá trị nồng độ IC₅₀ thấp hơn) mạnh hơn 10 lần và 6 lần so với hai kháng thể BinA khác là OX108, và h22.1. Bốn kháng thể BinB được làm cho giống với của người là h9B8, h5D1, h10A2, và h1F3 có mức độ hoạt tính phong bế CD200R1 yếu hơn so với h10F6, trong khi một mình kháng thể dòng h11E4 Bin C được làm cho giống với của người không phong bế sự gắn kết CD200Fc.

E. Sự gắn kết của h10F6 và h22.1 với các tế bào T của khỉ cynomolgus và người

Khả năng gắn kết với các kháng nguyên nội sinh của kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người được xác định bằng cách sử dụng các tế bào T pan của người được phân lập từ người cho khỏe mạnh (StemCell Technologies, catalog #70500.2) và các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của khỉ cynomolgus (WorldWide Primates). Đối với người, các tế bào T được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T Pan (Miltenyi Biotec Catalog# 130-095-535). Các tế bào được ủ với TruStain FcX của người (Biolegend, catalog#422302) trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, sau đó ủ với kháng thể kháng CD200R1 được đánh dấu bằng biotin (h10F6 hoặc h22.1) hoặc đối chứng isotyp trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa và sự gắn kết của kháng thể kháng CD200R1 được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin-PE (BD Biosciences). Các loại tế bào miễn dịch của người được đánh dấu bằng dòng OKT4 kháng CD4 và dòng RPA-T8 kháng CD8 (Biolegend). Các tế bào miễn dịch của khỉ Cyno được đánh dấu bằng dòng 10D12 kháng CD3, dòng M-T466 kháng CD4, và dòng BW135/80 kháng CD8 (Miltenyi Biotec). Sự gắn kết tế bào được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng bằng thiết bị CytoFLEX (Beckman Coulter). Các đường cong gắn kết được tính toán dựa trên cường độ phát huỳnh quang trung bình hình học.

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.5A**, h10F6 có ái lực với các tế bào

T của người cao hơn h22.1 và OX108; tuy nhiên, như được thể hiện trên **Fig.5B**, cả h10F6 và OX108 đều không có khả năng phản ứng chéo với các tế bào T của khỉ cynomolgus.

Ví dụ 4: Thử nghiệm chức năng *in vitro* và *in vivo* của kháng thể kháng CD200R1

Ví dụ này minh họa các thử nghiệm trên cơ sở tế bào *in vitro* và các nghiên cứu *in vivo* được sử dụng để xác định tính chất của hoạt tính chức năng của kháng thể kháng CD200R1 theo sáng chế.

A. Sự hoạt hóa miễn dịch các tế bào PBMC từ các bệnh nhân có khối u bằng kháng thể kháng CD200R1

Hoạt tính chức năng của kháng thể kháng CD200R1 được thử nghiệm trên các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) sơ cấp. Các tế bào PBMC từ chín bệnh nhân có khối u được mua từ công ty Discovery Life Sciences (Los Osos, California). $2-4 \times 10^4$ tế bào được cấy vào mỗi lỗ trong bộ ba mẫu trong đĩa có 384 lỗ với kháng thể kháng CD200R1 được chọn 100nM. Sau đó, các tế bào được kích thích bằng độc tố Staphylococcal enterotoxin B (SEB) 0,1 ng/ml (Toxin Technology Catalog# BT202) và được nuôi cấy trong ba ngày ở nhiệt độ 37°C. Nồng độ IFN γ của dịch nổi bề mặt được xác định bằng thử nghiệm ELISA bằng cách sử dụng kit có bán trên thị trường từ công ty ThermoScientific. Giá trị trung bình của ba mẫu sinh học được chuẩn hóa với đối chứng isotyp và kiểm định T nhiều lần được thực hiện để xác định sự khác biệt có ý nghĩa.

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.6**, các kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người, h10F6 và h22.1, làm gia tăng sự sản sinh IFN γ trong các mẫu có nguồn gốc từ bệnh nhân mắc các loại bệnh ung thư khác nhau. Cụ thể, **Fig.6** thể hiện sự thay đổi gấp số lần của sự sản sinh IFN γ , được chuẩn hóa với đối chứng isotyp, ở các mẫu được xử lý bằng h10F6 hoặc h22.1 nồng độ 100nM. 6 trong số 9 tế bào của bệnh nhân có khối u có sự sản sinh IFN γ gia tăng có ý nghĩa thống kê khi được xử lý bằng h10F6. 4 trong số 9 bệnh nhân có hiệu quả điều trị đáng kể khi được điều trị bằng h22.1.

B: Thử nghiệm tế bào T pan sơ cấp của người

Hoạt tính chức năng của kháng thể kháng CD200R1 trong việc khôi phục sự tiết ra IFN γ được xác định với sự có mặt của CD200-Fc đã gắn kết với đĩa. Các tế bào T pan sơ cấp của người được phân lập từ người cho tế bào PBMC khỏe mạnh (Stem Cell, catalog #70500,2) được kích thích thường xuyên bằng PHA 2 μ g/ml (Sigma, catalog #11082132001) và IL-2 của người 4 ng/ml (Roche, catalog #24951700) trong 7 ngày trong môi trường hoàn chỉnh. Sau đó, tế bào được thu hoạch và gắn môi với 40 ng/ml IL-4 của người (Peprotech, catalog #200-04) trong 24 giờ. Trước khi đàn mỏng các tế bào, các đĩa được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C với dòng OKT3 kháng CD3 1 μ g/ml (Biolegend, catalog#317326) và CD200Fc của người 15 μ g/ml hoặc đối chứng isotyp được pha loãng trong PBS (Corning, cat#21-040-CM). Các tế bào được thu hoạch, rửa và đàn mỏng với kháng thể kháng CD200R1 trong 24 giờ. Dịch nổi bề mặt tế bào được thu hoạch và sự tiết ra xytokin, IFN γ của người (Invitrogen, Catalog # 88-7025-88) và IL-2 của người (Invitrogen, coated 88-7316-88), được xác định bằng thử nghiệm ELISA.

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.7A** và **Fig.7B**, việc điều trị bằng IgG h10F6 có sự khôi phục chức năng tiết ra IL-2 ở hai người cho khỏe mạnh khác nhau (người cho 203 và người cho 538), trong khi chỉ quan sát được sự khôi phục bằng cách điều trị bằng h22.1 ở một người cho. Như được thể hiện trên **Fig.7C** và **Fig.7D**, việc điều trị bằng h10F6 cũng có hiệu quả tốt hơn về mức độ đáp ứng phụ thuộc liều so với đối chứng isotyp về sự tiết ra IL-2 (**Fig.7C**) và có hiệu quả tốt hơn so với kháng thể có bán trên thị trường, OX108 về sự tiết ra IFN γ (**Fig.7D**).

D. Thử nghiệm về phản ứng của tế bào lymphô hỗn hợp sơ cấp của người

Hoạt tính chức năng của kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người được xác định bằng cách sử dụng các tế bào T-pan và các tế bào đuôi gai đã phân cực trong thử nghiệm về phản ứng của tế bào lymphô hỗn hợp khác alen cùng loài. Các tế bào PBMC được chuẩn bị từ người cho khỏe mạnh Leukopaks từ công ty Stemcell Technologies, Cat#70500.1 bằng cách ly tâm và làm tan tế bào hồng cầu bằng cách sử dụng chất đệm làm tan ACK (Gibco, Cat# A10492-01). Các bạch cầu đơn nhân to được phân lập từ các tế bào PBMC bằng cách sử dụng kit phân lập bạch cầu đơn nhân pan (Miltenyi, Cat#130-096-

537). Các tế bào T-pan được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào T-pan của Miltenyi (Miltenyi, Cat# 130-096-535). Sau đó, các bạch cầu đơn nhân to được đàn mỏng với lượng 1 triệu tế bào/ml trong môi trường hoàn chỉnh với GM-CSF 20 ng/ml (Fisher Scientific, catalog #215GM010) và IL-4 (Fisher Scientific, catalog #204IL010) trong 7 ngày. Tiếp đó, các tế bào đuôi gai được phân cực thêm thành tế bào DC sinh miễn dịch bằng cách sử dụng LPS 100 ng/ml (Sigma, catalog #L-4391) và TNF α 50 ng/ml (Fisher Scientific, catalog #210TA020CF) hoặc các tế bào DC được dung nạp bằng cách sử dụng IL-10 20 ng/ml (Fisher Scientific, catalog #217IL010) và IFN α -2b 20 ng/ml (Fisher Scientific, catalog #111051) trong 3 ngày. Sau khi phân cực, các tế bào T-pan và DC trưởng thành được trộn lẫn với nhau theo tỷ lệ tế bào T-pan:tế bào DC là 1:20 cùng với kháng thể kháng CD200R1 10 μ g/ml hoặc đối chứng isotyp trong môi trường hoàn chỉnh. Dịch nổi bề mặt MLR và các tế bào được thu hoạch vào các ngày 4, 5, và 6 để đánh giá sự hoạt hóa tế bào T. Sự tiết ra xytokin được xác định bằng cách sử dụng kit IFN γ Human Luminex Procartaplex (ThermoFisher, catalog #EPX01A-10228-901). Để đánh giá sự hoạt hóa tế bào T, các tế bào được ủ với TruStain FcX của người (Biolegend, catalog#422302) trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C, sau đó nhuộm màu ngoại bào bằng dòng UCHT1 kháng CD3, dòng OKT4 kháng CD4, dòng RPA-T8 kháng CD8, dòng BU63 kháng CD86, dòng BU15 kháng CD11c. Ngoài ra, các dấu ấn hoạt hóa được bổ sung để xác định mức độ hoạt hóa tế bào T là dòng FN50 kháng CD69, dòng BC96 kháng CD25, và dòng L243 kháng HLA-DR. Các tế bào được nhuộm trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C và được rửa để chuẩn bị cho quá trình nhuộm nội bào. Bộ chất đệm nhuộm Foxp3/yếu tố phiên mã (Thermofisher Scientific, catalog #00-5523-00) được sử dụng để cố định và thấm qua tế bào để nhuộm trong tế bào bằng dòng B56 kháng Ki67 trong 45 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi nhuộm trong tế bào, các tế bào được rửa lại và tái tạo hỗn dịch trong PBS + 2% FBS. Mức độ biểu hiện được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng bằng thiết bị CytoFLEX (Beckman Coulter).

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.8A**, **Fig.8B**, và **Fig.8C**, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD200R được làm cho giống với của người, h10F6 làm gia tăng sự hoạt hóa trong các tế bào T CD8 (**Fig.8A**), sự tăng sinh trong các tế

bào T CD4 (**Fig.8B**), và sự tiết ra IFN γ (**Fig.8C**) lớn hơn so với h22.1 IgG và lớn hơn đáng kể so với đối chứng isotyp.

E. Thử nghiệm cảm ứng bằng Phospho-Dok2 của kháng thể kháng CD200R1

Khi gắn với CD200, sự truyền tín hiệu ức chế CD200R1 được khơi mào thông qua sự huy động Dok2 kinaza đến motif nhận biết sự gắn kết phosphotyrosin của CD200R1 (ví dụ, xem tài liệu: Mahrshahi 2009, and Mahrshahi 2010). Hoạt tính chủ vận của kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người, h10F6 và h22.1, được đánh giá bằng cách gây cảm ứng bằng phospho-Dok2 ở cả dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to U937 (ATCC #CRL-1593.2) và dòng tế bào hu-CD200R1 biểu hiện ổn định U937. Khi huyết thanh không được cung cấp trong 18 giờ, các tế bào gốc hoặc tế bào biểu hiện quá mức CD200R1 được xử lý bằng nồng độ khác nhau của kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người hòa tan hoặc đối chứng isotyp hoặc CD200-Fc trong 60 phút. Các tế bào được làm tan trong chất ức chế 1xSDS + proteaza và phosphataza. Các dịch tan được tách trên thiết bị NuPAGE 4-12% Bis-Tris MES SDS (BioRad) trong điều kiện không khử. Phương pháp thâm tách Western được thực hiện bằng cách sử dụng Y351 kháng pDok2 (Cell Signaling Technology Catalog#3911S) và kháng Dok2 (Santa Cruz Biotechnology Catalog#sc-17830).

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.9**, so với dòng tế bào kiểu dại (WT) U937, pDok2 được tạo ra khi được điều trị bằng CD200-Fc hòa tan với nồng độ cao nhất là 200nM, OX108 với nồng độ 33nM, và h22.1 với nồng độ thấp tới mức 5,6nM. Trái lại, việc điều trị bằng h10F6 không tạo ra pDok2 so với WT, điều này gợi ý rằng h10F6 không có đặc tính chủ vận CD200R1. Khả năng của h10F6 trong việc phong bế sự gắn kết CD200R1 của CD200 trong khi bất ngờ có hoạt tính chủ vận đối với sự truyền tín hiệu CD200R1 (khi được xác định theo sự biểu hiện của pDok2), làm gia tăng đáng kể khả năng điều trị của h10F6 so với h22.1 và OX108, cả hai thành phần này đều bất ngờ có hoạt tính chủ vận CD200R1.

F. Hoạt tính đối kháng đối với dòng tế bào thông báo NFkB-Luc được thử nghiệm bằng K562-CD200R1

CD200 đã được thông báo trước đây là gây ra sự phiên mã NFkB khi

đồng nuôi cấy CD200 với các dòng tế bào biểu hiện CD200R1 (ví dụ, xem tài liệu: Wang, et al., Nat. Med., 25: 656-666 (2019)). Dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to K562 (ATCC CCL-243) được thiết kế có sự biểu hiện ổn định của CD200R1 và chất thông báo NFkB luxiferaza để xác định hoạt tính đối kháng của các kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người, h10F6 và h22.1. Cả định dạng Fab hóa trị một và hóa trị hai của các dòng kháng CD200R1, h22.1 và h10F6, được bổ sung với nồng độ khác nhau vào môi trường đồng nuôi cấy của các tế bào thông báo K562 và 293T biểu hiện ổn định CD200 (UNQ# P41217) trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các giống nuôi cấy được bổ sung TNF α 20 ng/ml (RnD Systems Catalog # 210-TA).

Kết quả: Như được thể hiện trên **Fig.10A** và **Fig.10B**, sự phiên mã NFkB được cảm ứng bởi các tế bào biểu hiện CD200⁺ được so sánh với các tế bào biểu hiện CD200⁻. Sau khi cho thêm các kháng thể phong bế vào môi trường đồng nuôi cấy, sự khác biệt về chức năng đối kháng giữa 10F6 và h22.1 trở nên rõ ràng. Cả h10F6 hóa trị hai (**Fig.10A**) và hóa trị một (**Fig.10B**) đều có thể phong bế sự phiên mã NFkB được thúc đẩy bởi CD200 đến mức ban đầu. Tuy nhiên, việc đồng nuôi cấy CD200⁺ với IgG h22.1 chỉ phong bế một phần sự cảm ứng NFkB, và Fab h22.1 hóa trị một không có hiệu quả.

Ví dụ 5: Sự trưởng thành ái lực của kháng thể h10F6 kháng CD200R1 được làm cho giống với của người

Ví dụ này minh họa các kỹ thuật sàng lọc và xây dựng thư viện thể thực khuẩn được sử dụng cho sự trưởng thành ái lực của các kháng thể h10F6 kháng CD200R1 được làm cho giống với của người để sự gắn kết với cả hu-CD200R1 và cyno-CD200R1 được cải thiện.

A. Sàng lọc và xây dựng thư viện NNK dùng cho sự trưởng thành ái lực của h10F6

Để xác định các trình tự biến thể đã trưởng thành ái lực của dòng h10F6 của kháng thể kháng CD200R1, các thư viện thể thực khuẩn được xây dựng theo định dạng Fab-amber đối với sự biểu hiện thể thực khuẩn của Fab hóa trị một có các gốc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn ngẫu nhiên bằng cách sử dụng codon thoái hóa NNK mã hóa tất cả 20 axit amin bằng 32 codon (Brenner

et al., 1992). Các thư viện được thiết kế để cho phép một đột biến *NNK* trong mỗi vùng của ba vùng HVR của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Sau đó, các oligonucleotit gây đột biến đã tổng hợp được sử dụng để xây dựng các thư viện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến Kunkel (Kunkel et al., 1987). ADN của thư viện tạo thành được gây xung điện vào các tế bào *E. coli* XL1, tạo ra khoảng từ $6,5 \times 10^8$ đến $4,3 \times 10^9$ thể biến nạp.

Các thư viện thể thực khuẩn được ủ trong chất đệm PBS SUPERBLOCK™ (Pierce) và TWEEN® 20 0,05% trong 30 phút và sau đó được phủ lên đĩa đã phủ hu-CD200R1 (các haplotyp iso4, Alt và Ref) và cyno-CD200R1 để sàng lọc vòng thứ nhất. Trong từ hai đến ba vòng tiếp theo, các thư viện thể thực khuẩn được ủ với nồng độ giảm của kháng nguyên hu-CD200R1 hoặc cyno-CD200R1 được biotinyl hóa. Thể thực khuẩn đã rửa giải được gây nhiễm bằng pha log XL-1 và được đàn mỏng trên đĩa LB carbenicillin ở nhiệt độ 37°C qua đêm để sàng lọc thêm ái lực.

Để tách chiết các trình tự ra khỏi các thư viện trưởng thành ái lực bằng cách sử dụng NGS, ADN sợi kép của phagemit được phân lập từ các tế bào *E. coli* XL-1 mang thư viện thể thực khuẩn ban đầu (các thư viện chưa phân loại) và từ các vòng thứ nhất và thứ hai của sự lựa chọn dung dịch (các thư viện đã phân loại). ADN đã tinh chế được sử dụng làm khuôn để tạo ra amplicon của các vùng VH và VL bằng cách sử dụng quy trình tạo ra thư viện Illumina 16s. Các bộ điều chỉnh giải trình tự và mã vạch chỉ số kép được thêm vào bằng cách sử dụng kit Illumina Nextera XT Index. Trong khi chuẩn bị giải trình tự trên thiết bị Illumina MiSeq, các amplicon có gắn bộ điều chỉnh được xử lý theo quy trình tải mẫu và làm biến tính thư viện Illumina tiêu chuẩn bằng cách sử dụng kit MiSeq Reagent v3 (600 chu trình). Sự giải trình tự ở đầu được ghép cặp được thực hiện trên toàn bộ chiều dài của amplicon có kích thước đoạn chèn từ 200 bp đến 300 bp.

Dữ liệu về sự giải trình tự ở đầu được ghép cặp được tập hợp lần đầu tiên bằng cách sử dụng thiết bị lắp ráp PANDAsq ở đầu được ghép cặp (Masella et al., 2012) để thu được amplicon hoàn chỉnh. Sau đó, sự kiểm soát chất lượng (quality control: QC) được thực hiện trên các amplicon đã được xác định, trong đó mỗi amplicon được kiểm tra về sự không chèn đoạn hoặc làm khuyết đoạn

của trình tự và không có codon kết thúc, mỗi trình tự CDR chỉ được phép mang tối đa một đột biến NNK và không mang sự đột biến không phải đột biến NNK. Các ma trận trọng số theo vị trí được tạo ra bằng cách tính tần suất của tất cả các đột biến của mọi vị trí ngẫu nhiên. Tỷ lệ làm giàu cho mỗi đột biến được tính toán bằng cách chia tần suất của sự đột biến cho trước ở vị trí cho trước trong mẫu đã phân loại cho tần suất của chính đột biến này trong mẫu không được phân loại, như đã được mô tả trước đây (Koenig et al., 2015).

Kết quả: Các đột biến vùng HVR được làm giàu hỗ trợ sự gắn kết gia tăng của biến thể h10F6 tạo thành với cả hu-CD200R1 và cyno-CD200R1 được tóm tắt trong Bảng 7.

Bảng 7: sự đột biến trong miền VH và VL của h10F6 hỗ trợ sự gia tăng ái lực gắn kết của hu-CD200R1 và cyno-CD200R1

Vị trí vùng VH	Các axit amin được ưu tiên	Vị trí vùng VL	Các axit amin được ưu tiên
Miền VH		Miền VL	
T30	E,D,K,S,A,H,N,R,V,Y	G30C	N,D
N31	D,E,K,G	N30D	E,A,S,D,V,Q,T,K
Y32	N,T,S	S31	-
A33	G,S,P,A,N,T,R,W	F32	M,H,Y,S,N
V34	I,V,M,L,T,E	R50	N,G,Q,D
S35	A,G,T,S,N,C	A51	G
V50	T,S,E,A,N,D	S52	N,K,D,E,H,T,Q
M51	A,S,V,T,E,I	N53	E
W52	H,N,S,R,Y	L54	R,K
A53	S,T,V,A,G	E55	A
G54	N,E,S,D,K	H89	G,A,M,S
G55	-	Q90	-
G56	E,D,K,N	S91	-
T57	A,V,S	N92	A,M,F,Y

N58	S,D,A,M	E93	G,W
Y59	I,V,E,T	D94	-
N60	D	P95	-
S61	E,D,K,N,G,T	P96	-
A93	V,T,I		
R94	A		
E95	T,S,N,Q,A,M		
R96	I,V,K,M,L		
P97	G,N,S,M,V,A		
L98	G,M,A,K,R,N		
T99	S,E,N,G		
G100	-		
V100A	E,A,T,I,P		
M100B	L		
D101	E		
Y102	V,I,K,E,N		

Ví dụ 6: Xác định tính chất của các biến thể đã tinh chế được cải thiện ái lực của h10F6

Ví dụ này minh họa ái lực gắn kết của hu-CD200R1 và cyno-CD200R1 và sự phong bế bởi các biến thể h10F6 đã chọn, h10F6.V1, h10F6.V2, h10F6.V3, và h10F6.V4, được tạo ra theo sự trưởng thành ái lực như được mô tả trong Ví dụ 6.

A. Sự gắn kết Biacore

Các biến thể h10F6 được tổng hợp để tách dòng vào cấu trúc biểu hiện của động vật có vú để tạo ra các protein IgG1. Các trình tự LC và HC của các protein IgG1 biến thể được tóm tắt trong Bảng 3. h10F6.V1 có LC nêu trong SEQ ID NO: 71 và HC nêu trong SEQ ID NO: 88. h10F6.V2 có LC nêu trong SEQ ID NO: 68 (giống như h10F6 và h10F6.V3) và HC nêu trong SEQ ID NO: 89 (giống như h10F6.V4. h10F6.V3 có LC nêu trong SEQ ID NO: 68 (giống

như h10F6 và h10F6.V2), và HC nêu trong SEQ ID NO: 88 (giống như h10F6.V1). h10F6.V4 có LC nêu trong SEQ ID NO: 71 (giống như h10F6.V1) và HC nêu trong SEQ ID NO: 89 (giống như h10F6.V2).

Các plasmit mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được biểu hiện và tinh chế như được mô tả trong Ví dụ 2. Để xác định động học gắn kết của các biến thể được cải thiện ái lực bằng h10F6 đã chọn gắn kết với hu-CD200R1-iso4 (haplotyp Alt và Ref) và cyno-CD200R1, phép đo SPR bằng thiết bị BIACORE™ 8K được thực hiện như trong Ví dụ 3.A. Tóm lại, các biến thể h10F6 được pha loãng ở nồng độ 0,5 µg/ml trong chất đệm HBS-P (HEPES 0,01M có độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) và được phủ vào chip protein A với tốc độ dòng 30 µl/phút trong 60 giây trong dòng tế bào 2 (FC2). Sau đó, các hệ pha loãng theo bậc 3 lần của CD200R1 của người hoặc khỉ cyno trong chất đệm HBS-P (HEPES 0,01M có độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%) từ 300nM được bơm (tốc độ dòng: 30 µl/phút) ở nhiệt độ 37°C vào cả tế bào dòng 1 (FC1) và tế bào dòng 2 (FC2). Biểu đồ cảm biến được ghi lại và tham chiếu và trừ đi chất đệm trước khi đánh giá bằng phần mềm đánh giá BIACORE® 8K (phiên bản 1.1.1.7442). Tỷ lệ kết hợp (k_{on}) và tỷ lệ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir theo tỷ lệ một-một đơn giản. Hằng số phân ly cân bằng (KD) được tính toán theo tỷ lệ của k_{off}/k_{on} , được tóm tắt trong Bảng 8.

Bảng 8: Ái lực gắn kết của các biến thể h10F6 với hu-CD200R1 của người và cyno-CD200R1

Các biến thể	hu-CD200R1-iso4-Alt			hu-CD200R1-iso4-Ref			cyno-CD200R1		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
h10F6.V1	1.44E+06	1.17E-03	8.14E-10	1.35E+06	9.64E-04	7.16E-10	4.36E+05	4.57E-03	1.05E-08
h10F6.V2	6.35E+05	4.25E-03	6.68E-09	6.07E+05	3.67E-03	6.04E-09	2.16E+05	3.51E-03	1.63E-08
h10F6.V3	2.04E+06	1.91E-03	9.35E-10	1.88E+06	1.53E-03	8.17E-10	3.22E+05	1.95E-02	6.07E-08
h10F6.V4	3.88E+05	3.87E-03	9.99E-09	3.77E+05	3.36E-03	8.93E-09	1.93E+05	1.13E-03	5.87E-09

Kết quả: Như được thể hiện bằng giá trị ái lực gắn kết được tóm tắt trong Bảng 8, bốn biến thể, h10F6.V1, h10F6.V2, h10F6.V3, và h10F6.V4, được xác định là có khả năng phản ứng chéo khi gắn kết với hu-CD200R1 và cyno-CD200R1.

B. Thử nghiệm phong bế

Bốn biến thể h10F6, h10F6.V1, h10F6.V2, h10F6.V3, và h10F6.V4, được thử nghiệm về tính năng trong thử nghiệm ELISA phong bế CD200:CD200R1 của người được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 3.B. Giá trị IC_{50} phong bế được xác định là thể hiện nồng độ của biến thể IgG1 kháng CD200R1 có tác dụng ức chế 50% hu-CD200R1 được biotinyl hóa hoặc cyno-CD200R1 được biotinyl hóa gắn kết với hu-CD200-Fc hoặc cyno-CD200-Fc đã phủ.

Kết quả: Như được tóm tắt trong Bảng 9, bốn biến thể h10F6 có hoạt tính phong bế khi phản ứng chéo với h10F6.V1 có mức độ phong bế mạnh nhất của cả hu-CD200R1 và cyno-CD200R1.

Bảng 9: Giá trị IC_{50} phong bế CD200:CD200R1 của các biến thể h10F6.

Các biến thể	IC ₅₀ đối với CD200:CD200R1 (nM)	
	hu-CD200R1-iso4 Ref	cyno-CD200R1
h10F6.V1	0,58	2,44
h10F6.V2	4,79	4,25
h10F6.V3	0,56	11,39
h10F6.V4	10,91	2,15

Ví dụ 7: Nghiên cứu dược động học trên chuột của kháng thể kháng CD200R1

Ví dụ này minh họa nghiên cứu dược động học (pharmacokinetic: PK) *in vivo* ở chuột của các kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người là h10F6 và h22.1.

Vật liệu và phương pháp: các kháng thể kháng CD200R1 được làm cho giống với của người là h10F6 và h22.1 được cho dùng liều qua đường trong tĩnh mạch ở chuột Sprague-Dawley. Liều đơn 10 mg/kg hoặc 1 mg/kg được sử dụng cho 2 con chuột đực và 2 con chuột cái trong mỗi nhóm dùng liều. Mẫu

máu được lấy ở các thời điểm sau khi tiêm 5 phút, 2 giờ, 6 giờ, 24 giờ, 3 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 17 ngày và 21 ngày. Nồng độ kháng thể kháng CD200R1 trong huyết thanh được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp ELISA thông thường để bắt giữ các kháng thể IgG của người bằng kháng thể của cừu kháng IgG1 của người và phát hiện bằng kháng thể của dê được đánh dấu bằng biotin kháng IgG (H+L) của người và streptavidin-HRP. Phương pháp phân tích không chia ngăn được sử dụng để tính toán các thông số PK với khoảng thời gian từ 3 đến 21 ngày.

Như được thể hiện trên **Fig.11**, các thông số dược động học minh họa cho profin cạn kiệt qua trung gian không được hướng đích. Thời gian bán hủy của h10F6 nằm trong khoảng từ 11,4 đến 14,8 ngày ở các nhóm dùng liều 1 mg/kg và 10 mg/kg tương ứng. Thời gian bán hủy của h22.1 là khoảng 12 ngày ở cả hai nhóm dùng liều. Một động vật ở nhóm sử dụng liều 10 mg/kg h22.1 có profin về sự thanh thải nhanh hơn so với 3 con chuột còn lại ở cùng nhóm và được bỏ quả khỏi phân tích này.

Các thông số PK trung bình của h10F6 ở các con chuột được tóm tắt trong **Bảng 10** dưới đây. Sau khi tiêm một liều lớn duy nhất bằng 1 hoặc 10 mg/kg qua đường IV vào chuột Sprague-Dawley, nồng độ h10F6 trong huyết thanh giảm theo kiểu hai pha. Thông số PK của h10F6 tỷ lệ với liều dùng và tương tự ở cả chuột đực và chuột cái. Thời gian bán hủy cuối trung bình của h22.1 ở chuột Sprague-Dawley là 11,4 và 14,8 ngày đối với liều 1 mg/kg và 10 mg/kg, tương ứng.

Bảng 10: Thông số PK của h10F6 sau khi sử dụng một liều qua đường IV ở chuột

Liều dùng của h10F6	Các thông số PK trung bình (N=4; 2M/2F)						
	T _{1/2} (ngày)	CL (ml/kg/ngày)	V _{ss} (ml/kg)	C _{max} (µg/ml)	AUC _{last} (ngày*µg/ml)	AUC _{inf} (ngày*µg/ml)	AUC _{extra} (%)
1 mg/kg	11,4	5,35	82,5	32,0	139,5	188,2	26,0
CV (%)	11,9	9,4	17,7	21,9	11,6	8,6	13,1
10 mg/kg	14,8	6,17	113	258	1068	1705	35,5
CV (%)	48,0	24,1	15,2	9,3	12,1	27,7	26,0

Ví dụ 8: Dược động học liều đơn của h10F6 ở khỉ

[0100] Nghiên cứu PK liều đơn của h10F6 được thực hiện ở khỉ cynomolgus, các loài không gần kết, để xác định tính chất về đặc tính PK và khả năng dung nạp của nó.

Khỉ cynomolgus chưa từng được điều trị ($N = 8$, 4 con đực/4 con cái) được cho sử dụng h10F6 bằng cách tiêm một liều lớn qua đường IV với liều 2 và 20 mg/kg tương ứng, (2 con đực/2 con cái trong mỗi nhóm). Nồng độ h10F6 trong huyết thanh, các thông số hóa học trong lâm sàng, các thông số huyết học, và tình trạng sức khỏe chung và vẻ bề ngoài của khỉ được theo dõi trong 35 ngày sau khi dùng liều. Các mẫu máu để phân tích PK được thu thập trước khi dùng liều và ở thời điểm 15 phút, 2 giờ, 8 giờ, và 1, 2, 4, 7, 10, 14, 21, 28, và 35 ngày sau khi dùng liều. Các mẫu để đánh giá bệnh lý trong lâm sàng được thu thập trước khi dùng liều và vào ngày 1 và ngày 35 sau khi dùng liều. Nồng độ h10F6 trong các mẫu huyết thanh của khỉ được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA đã được phát triển và định lượng để xác định nồng độ của h10F6 với giới hạn định lượng dưới (LLOQ) bằng 0,06 $\mu\text{g/ml}$. Profin PK của nồng độ theo thời gian của h10F6 ở các con khỉ được thể hiện trên **Fig.12**.

Các thông số PK trung bình của h10F6 ở các con khỉ được tóm tắt trong **Bảng 11** dưới đây. Sau khi tiêm liều lớn của h10F6 một lần qua đường IV với liều 2 hoặc 20 mg/kg cho các con khỉ cynomolgus, nồng độ h10F6 trong huyết thanh giảm theo cách hai pha. Thời gian bán hủy cuối trung bình ($T_{1/2}$) của h10F6 là 11,5 và 13,3 ngày đối với các nhóm sử dụng liều 2 mg/kg và 20 mg/kg tương ứng. Thông số PK của h10F6 tỷ lệ với liều lượng và quan sát thấy không có sự khác biệt về giới tính trong khoảng dùng liều nghiên cứu từ 2 đến 20 mg/kg. 2 trong số 8 con khỉ (một con đực và một con cái trong nhóm dùng liều 20 mg/kg) có sự giảm mạnh về nồng độ của h10F6 trong huyết thanh từ ngày 14 đến ngày 21. Phát hiện này được cho là do các kháng thể kháng dược chất (antidrug antibodies: ADA) có thể được tạo ra. Theo đó, các thông số PK bị nghi ngờ là bị ảnh hưởng bởi ADA đã được loại trừ khỏi dữ liệu tóm tắt của h10F6 và đường cong AUC một phần ($\text{AUC}_{0-14\text{D}}$) được đưa vào phép phân tích PK. Việc loại trừ dữ liệu ra khỏi hai động vật có ADA bị nghi ngờ từ dữ

liệu trung bình tóm tắt không làm ảnh hưởng đến kết luận về tỷ lệ liều của h10F6 và sự khác biệt giới tính.

h10F6 có thông số PK tuyến tính ở khỉ, PK tương tự ở cả con đực và con cái, và các giá trị trung bình về sự thanh thải và thể tích phân bố được ước tính ở trạng thái ổn định phù hợp với các giá trị điển hình cho IgG được làm cho giống với của người với PK tuyến tính ở khỉ (Betts, et al., 2018). Như dự đoán đối với các loài không gần kết, profin PK của h10F6 gợi ý rằng cơ chế thanh thải tuyến tính, không bão hòa, cơ chế thanh thải không đặc hiệu là con đường loại bỏ chủ yếu của h10F6 ở các con khỉ. h10F6 được dung nạp tốt đến ngày thứ 35 dựa trên các quan sát lâm sàng và sự đánh giá các thông số huyết học và hóa học trong huyết thanh.

Bảng 11: Các thông số PK của h10F6 sau khi sử dụng một liều qua đường IV cho khỉ

Liều dùng của h10F6	Thông số PK trung bình (N=4 là 2 đực/2 cái; N=2 là 1 đực/1 cái)					
	C _{max} (µg/ml)	AUC _{0-14D} (%)	AUC _{last} (day*µg/ml)	T _{1/2} (ngày)	CL (ml/kg/ngày)	V _{ss} (ml/ngày)
2 mg/kg	69,0	371	582	11,5	3,04	50,8
CV (%)	19,6	9,5	11,1	15,7	15,7	14,0
N	4	4	4	4	4	4
20 mg/kg	588	3100	5470	13,3	13,3	57,7
CV (%)	4,9	13,9	không xác định	không xác định	không xác định	không xác định
N	4	4	2	2	2	2

Ví dụ 9: Dược động học của h10F6 ở người

PK của h10F6 được đánh giá trong các nghiên cứu liều đơn nằm trong khoảng từ 2 đến 20 mg/kg ở khỉ cynomolgus và từ 1 đến 10 mg/kg ở chuột Sprague-Dawley. Sự tiếp xúc với h10F6 là gần như tỷ lệ với liều dùng, và không quan sát thấy sự khác biệt giữa con đực và con cái. Profin PK không cho thấy bằng chứng về sự phân bố qua trung gian đích hoặc hiệu quả của ADA, ngoại trừ 2 con khỉ được cho dùng liều 20 mg/kg có profin PK gợi ý sự tạo ra ADA. Các kết quả này chứng minh rằng phương pháp tương quan sinh trưởng có thể là thích hợp để dự đoán PK của h10F6 của người.

Các thông số PK của người như sự thanh thải và thể tích phân bố được tính toán từ các dữ liệu không phải trong lâm sàng ở khỉ, như được thể hiện trong **Bảng 12** dưới đây. Tóm lại, nồng độ h10F6 trong huyết thanh ở khỉ giảm đi sau khi sử dụng theo cách hai pha. Do đó, dữ liệu về nồng độ theo thời gian từ N = 8 con khỉ được cho sử dụng h10F6 với liều 2 hoặc 20 mg/kg, với dữ liệu nghi ngờ về ADA được loại trừ, đồng thời phù hợp với mô hình hai ngăn. Các thông số PK của khỉ từ mô hình này có tỷ lệ tương quan sinh trưởng để tính các thông số PK của người, dựa trên giả thiết rằng các số hạng về thể tích phân bố (V1 và V2) tỷ lệ với số mũ tương quan sinh trưởng = 1, và số hạng về sự thanh thải (CL và Q) tỷ lệ với số mũ = 0,85 (Deng, et al., 2011). Trọng lượng cơ thể bằng 2,4 kg (trọng lượng cơ thể trung bình của khỉ trong nghiên cứu PK liều đơn, h10F6- VIV-01) và 70 kg được chọn tương ứng đối với trọng lượng của khỉ và người. Các thông số PK của người theo tỷ lệ của người có trọng lượng 70-kg nằm trong khoảng điển hình đối với các kháng thể đơn dòng IgG được làm cho giống với của người.

Do h10F6 đặc hiệu đối với CD200R1 từ người nên không thể đánh giá được sự phân bố được chất qua trung gian đích về mặt tiền lâm sàng. Tuy nhiên, dữ liệu về độc lực (toxicokinetic: TK) từ nghiên cứu nhận biết mối nguy hại GLP h10F6.V1 có thể được đánh giá đối với TMDD, và các phát hiện từ nghiên cứu này có thể được sử dụng để thông báo hoặc có thể điều chỉnh sự dự đoán về PK của h10F6 ở người nếu TMDD được phát hiện là con đường thanh thải chiếm ưu thế của h10F6.V1 ở khỉ. Dựa trên các thông số PK này, thời gian bán hủy thải trừ của h10F6 có thể tính được là 19,4 ngày.

Bảng 12: Các thông số PK được dự đoán của h10F6 ở người

Thông số	(Đơn vị)	Giá trị
CL	(L/ngày)	0,158
	(ml/ngày/kg)	2,254
V1	(L)	2,61
Q	(L/ngày)	0,953
	(ml/ngày/kg)	13,6
V2	(L)	1,83

Các thông số PK theo dự đoán của h10F6 ở người được sử dụng để ước tính giá trị PK của h10F6 ở những người tình nguyện khỏe mạnh và các bệnh nhân để thông báo về việc lựa chọn liều ban đầu và khoảng liều điều trị được dự kiến tương ứng.

PK của h10F6 ở người có thể được giả định là tuyến tính trong khoảng liều dùng. Tuy nhiên, thời gian bán hủy thải trừ có thể được dự đoán là ngắn hơn với liều thấp, khi sự phân bố được chất qua trung gian đích có thể góp phần vào tổng mức độ thanh thải ở người. Do đó, AUC của h10F6 có thể được dự đoán quá mức ở những người tình nguyện khỏe mạnh và các bệnh nhân, đặc biệt là ở các liều thấp. Vì thế, việc giả định sự tuyến tính trên toàn bộ khoảng liều dùng dẫn đến phương pháp thận trọng đối với việc lựa chọn liều, đặc biệt là ở các liều thấp.

Các liều dùng được thể hiện trong **Bảng 13** dưới đây có thể là liều dùng tối đa được đánh giá ở những người tình nguyện khỏe mạnh, với giả thiết là liều dùng ban đầu bằng 0,3mg và sự tăng liều dùng tối đa là một nửa log (~ 3 lần). Các liều dùng này có thể được thông báo bởi nghiên cứu nhận biết mối nguy hại, như nghiên cứu nhận biết mối nguy hại về h10F6.V1, và nghiên cứu khả năng phản ứng chéo trong mô *ex vivo* của h10F6, và có thể được cải biến nếu được bảo đảm dựa trên việc xem xét dữ liệu. Toàn bộ dữ liệu về độ an toàn, PK và PD từ các nhóm nghiên cứu trước đó sẽ được xem xét cẩn thận trong các quyết định tăng liều của SRC.

Bảng 13: Sự tiếp xúc với h10F6 theo dự đoán ở những người tình nguyện khỏe mạnh

Liều dùng (mg)	Các thông số động học theo dự đoán ở những người tình nguyện khỏe mạnh	
	$C_{\max}$ (ug/ml)	AUC _{inf} (ngày * ug/ml)
0,3	0,115	1,94
1,0	0,384	6,77
3,0	1,15	20,3
10	3,84	67,7
30	11,5	203,0
100	38,4	676,6

300	115	2030
900	345	6089

Các thông số PK ở người theo dự đoán cũng được sử dụng để ước tính PK của h10F6 ở các bệnh nhân để thông báo khoảng liều điều trị được dự kiến. Các giả thiết sau đây được sử dụng để ước tính PK của h10F6 ở các bệnh nhân, bao gồm PK tuyến tính, việc dùng liều 3 tuần một lần (Q3W), hoặc hệ số phân bố trong huyết thanh với khối u bằng 10%, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Tần suất liều dùng thực tế được sử dụng ở các bệnh nhân có thể được thông báo theo dữ liệu về độ an toàn, PK và PD từ nghiên cứu đa liều của h10F6.V1 ở các bệnh nhân mắc bệnh ung thư tiến triển. Các bệnh nhân có thể có mức độ biểu hiện của CD200R1 (ví dụ, TIL) cao hơn so với những người tình nguyện khỏe mạnh, và sự có mặt của CD200R1 có thể dẫn đến sự thanh thải nhanh hơn và mức độ tiếp xúc của h10F6 thấp hơn, ví dụ, ở liều thấp khi sự thanh thải qua trung gian đích không bão hòa hoàn toàn. Trong khi CD200R1 là thụ thể bề mặt tỷ trọng thấp, nó có thể được biểu hiện ở mức cao nhất trên các tế bào dòng tủy, ví dụ, các bạch cầu trung tính, có sự chu chuyển nhanh chóng có thể chiếm ưu thế trong việc loại bỏ h10F6 ở các liều thấp. Ví dụ, do sự biểu hiện của CD200R1 trên TIL trong khối u, liều tương đương hoặc cao hơn của h10F6 có thể được sử dụng để đạt được PK tuyến tính ở các bệnh nhân so với liều h10F6 để đạt được PK tuyến tính ở những người tình nguyện khỏe mạnh. Nồng độ của kháng thể trong khối u rắn có thể ở mức trung bình từ 10% đến 30% nồng độ trong huyết thanh. Phương pháp thận trọng ở mức 10% có thể được sử dụng để thông báo liều tối đa được xem xét đối với mỗi nhóm thử nghiệm.

Ví dụ 10: Sự gắn kết của các kháng thể kháng CD200R1 với các tế bào sơ cấp của người

Để khẳng định rằng h10F6 gắn kết với CD200R1 nội sinh được biểu hiện trên các tế bào của người, sự gắn kết của h10F6 với tập hợp con của tế bào miễn dịch ngoại vi được xác định bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng bằng cách sử dụng tế bào PBMC của người từ những người cho khỏe mạnh.

Trong PBMC được phân lập từ 3 người cho, sự gắn kết của h10F6 với

các tập hợp con miễn dịch phù hợp với sự biểu hiện của CD200R1 đã được thông báo trong tài liệu chuyên ngành (Wright, et al., 2003; Rijkers, et al., 2008; Czarnowicki, et al., 2017); các tế bào T CD4⁺ biểu hiện CD200R1 ở mức cao nhất, quan sát được sự biểu hiện ở mức thấp hơn một chút trên các tế bào T CD8⁺. Trong khi đó, quan sát được mức độ biểu hiện của CD200R1 trên các tế bào B là thấp hơn đáng kể; sự phân bố mức độ nhuộm của các tế bào B là hai phương thức, điều này gợi ý rằng tập hợp con (khoảng 16%) của tổng số tế bào B biểu hiện CD200R1. h10F6 có sự gắn kết hạn chế với các bạch cầu đơn nhân to ngoại vi từ 3 người cho khỏe mạnh. Các kết quả này phù hợp với các nghiên cứu bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD200R1 có bán trên thị trường và các bạch cầu đơn nhân to được phân lập từ 3 người cho khỏe mạnh khác (dữ liệu không được thể hiện). Sự gắn kết với kiểu phụ của tế bào T được đánh giá bằng cách thử nghiệm các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 (**Fig.13**); giá trị EC₅₀ để gắn kết với các tập hợp con miễn dịch ngoại vi này là nhất quán giữa 3 người cho được thử nghiệm, nằm trong khoảng từ 0,30 đến 0,40 nM, như được thể hiện trong **Bảng 14** dưới đây.

Bảng 14: Khả năng gắn kết của h10F6 với các tế bào T

ID của người cho	Loại mẫu	Loại tế bào	EC ₅₀ (MFI)
RG1307	PBMC	CD4 ⁺	0,33nM
		CD8 ⁺	0,40nM
RG1212	PBMC	CD4 ⁺	0,35nM
		CD8 ⁺	0,33nM
RG1907	PBMC	CD4 ⁺	0,35nM
		CD8 ⁺	0,30nM

Để tóm tắt lại kiểu hình DC cư trú ở mô, các bạch cầu đơn nhân to từ PBMC của người cho khỏe mạnh được phân lập bằng cách sử dụng kit phân lập bạch cầu đơn nhân to và sau đó được biệt hóa *in vitro* với yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt-đại thực bào (granulocyte-macrophage colony stimulating factor: GMCSF) 20 ng/ml và IL-4 20 ng/ml trong 1 tuần. h10F6 có sự gắn kết

với các tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân to (monocyte-derived dendritic cell: MoDC) trên 3 người cho riêng biệt được đánh giá, và thu được các đường cong đáp ứng liều tương tự (**Fig.14**). Các giá trị nồng độ EC₅₀ gắn kết (từ 0,45 đến 0,60nM) giữa những người cho được tóm tắt trong **Bảng 15** dưới đây.

Bảng 15: Hiệu lực của kháng thể kháng CD200R1 với các tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân to (MoDC)

ID của người cho	Loại mẫu	Loại tế bào	EC ₅₀ (cường độ phát huỳnh quang trung bình, MFI)
RG2052	Các bạch cầu đơn nhân to được biệt hóa	MoDC	0,45nM
RG1802	Các bạch cầu đơn nhân to được biệt hóa	MoDC	0,60nM
RG1549	Các bạch cầu đơn nhân to được biệt hóa	MoDC	0,60nM

Ví dụ 11: Kháng thể kháng CD200-R1 không gắn kết với các tế bào PBMC sơ cấp của chuột, thỏ, chó, khỉ Marmoset, khỉ Rhesus, và khỉ Cynomolgus

Khả năng của h10F6 trong việc gắn kết với các tế bào miễn dịch từ các loài khác cũng được đánh giá. Các loài phổ biến có chung tính tương đồng trình tự $\geq 50\%$ với CD200R1 của người được chọn lọc để đánh giá và bao gồm CD200R1 của chuột (tính tương tự của miền ngoại bào, ECD, 54%), CD200R1 của chó (tính tương tự của ECD là 50%), CD200R1 của thỏ (tính tương tự của ECD là 61%), khỉ Marmoset (tính tương tự của ECD là 82%), khỉ rhesus (tính tương tự của ECD là 91%), và khỉ cynomolgus (tính tương tự của ECD là 89%). Kết quả của phương pháp phân tích đếm tế bào theo dòng của PBMC từ mỗi loài tương ứng đã chứng minh rằng h10F6 không gắn kết với các tế bào miễn dịch sơ cấp của chuột, thỏ, hoặc chó. h10F6 cũng cho thấy không có sự gắn kết với các tế bào của khỉ Rhesus, khỉ Marmoset hoặc khỉ Cynomolgus mặc dù có tính tương đồng trình tự cao, như được thể hiện trên **Fig.15**.

Sự không có khả năng phản ứng chéo với CD200R1 của thỏ, khỉ Marmoset, khỉ Rhesus và khỉ Cynomolgus được khẳng định bằng cách xác định

sự gắn kết của h10F6 với các tế bào CHO được chuyển nhiễm với các trình tự liên ứng của CD200R1 có chiều dài đầy đủ đối với các loài này, với CD200R1 của người được sử dụng làm đối chứng dương (Fig.16). Phù hợp với các kết quả quan sát được với các tế bào sơ cấp, h10F6 chỉ nhận biết CD200R1 của người.

Ví dụ 12: Sự biểu hiện của CD200R1 trên các tế bào miễn dịch ngoại vi và các tế bào miễn dịch thâm nhiễm khối u

Sự biểu hiện của CD200 và CD200R1 được đánh giá trên các tế bào lymphô thâm nhiễm khối u (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL) từ mô khối u đã phân ly được bảo quản lạnh và tế bào PBMC phù hợp từ các bệnh nhân bị ung thư thận tế bào sáng, ung thư vú, u melanin, bệnh caxinom tuyến màng trong tử cung và bệnh ung thư buồng trứng để hiểu sự phân bố của chúng trên các tế bào miễn dịch ở ngoại vi so với vi môi trường khối u (CD200, Fig.5 của sách IND; CD200R1, Fig.6 của sách IND). Trong khi nồng độ CD200 trên các tế bào miễn dịch ngoại vi là tương tự giữa các bệnh nhân ung thư và người cho khỏe mạnh, mức độ biểu hiện của CD200 được điều hòa tăng trong các tế bào miễn dịch thâm nhiễm khối u, bao gồm các tế bào T CD4+, các tế bào T CD8+ trong cả 5 bệnh nhân ung thư được thử nghiệm. Các tế bào tủy CD11b+ thâm nhiễm khối u ở 4 trong số 5 bệnh nhân ung thư cũng cho thấy mức độ biểu hiện của CD200 tăng lên so với các mẫu phù hợp từ vùng ngoại vi (Fig.17). Mức độ biểu hiện của CD200R1 trên các tập hợp con của tế bào PBMC từ bệnh nhân cũng tương đương với mức độ biểu hiện ở đối chứng khỏe mạnh (Fig.18). Tuy nhiên, CD200R1 có mức độ biểu hiện cao hơn trên các tế bào T TIL CD4+ và CD8+ so với các mẫu ngoại vi phù hợp ở 4 trong số 5 bệnh nhân ung thư. Ở tất cả 5 mẫu từ bệnh nhân được thử nghiệm, các tế bào B TIL và các tế bào tủy CD11b+ có mức độ biểu hiện CD200R1 tăng lên so với mẫu từ vùng ngoại vi phù hợp. Dữ liệu này khẳng định các báo cáo trong tài liệu chuyên ngành về sự điều hòa tăng của CD200 và CD200R1 trong vi môi trường khối u (Zheng, et al., 2017; Thommen, et al., 2018; Cassetta, et al., 2019) và gợi ý rằng sự biểu hiện của thụ thể ức chế CD200R1 và phối tử của nó có thể góp phần vào vi môi trường khối u ức chế miễn dịch.

Ví dụ 13: Phong bế sự tương tác CD200/CD200R1 bằng kháng thể kháng CD200-R1

A. Sự dịch chuyển của CD200 đã gắn kết từ trước từ các tế bào biểu hiện CD200R1 bằng kháng thể kháng CD200-R1

Trong ngữ cảnh các tế bào khối u và tế bào miễn dịch thâm nhiễm khối u, tỷ lệ của CD200 được biểu hiện trên các tế bào khối u và/hoặc tế bào nội mô trên mạch máu được cho là sẽ gắn kết sơ bộ với CD200R1 được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch. Để đánh giá khả năng của h10F6 trong việc làm dịch chuyển CD200 đã gắn kết từ trước từ CD200R1, dòng tế bào U937 được thiết kế để biểu hiện hCD200R1 (U937-CD200R1) và được ủ từ trước với nồng độ khác nhau của hCD200-Fc trước khi ủ với h10F6. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách theo dõi sự dịch chuyển của hCD200-Fc đã biotinyl hóa từ U937-CD200R1 bằng h10F6 (**Fig.19**, hình A) hoặc theo dõi sự gắn kết của h10F6 được biotinyl hóa với các tế bào U937-CD200R1 với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của hCD200-Fc (**Fig.19**, hình B). h10F6 có khả năng thay thế CD200-Fc ra khỏi hCD200R1 biểu hiện trên bề mặt tế bào ở cả hai định dạng thử nghiệm, dẫn đến giá trị IC₅₀ phong bế của h10F6 nằm trong khoảng từ 0,16 đến 1,28 nM, tùy thuộc vào nồng độ của hCD200-Fc có mặt. Theo dự kiến, các giá trị IC₅₀ của h10F6 để làm dịch chuyển CD200 đã gắn kết từ trước là cao hơn đáng kể (hiệu lực thấp hơn) so với khi các tế bào biểu hiện CD200R1 được ủ từ trước với h10F6 (IC₅₀ = 0,08nM).

B. Phong bế sự gắn kết của CD200 với các tế bào đuôi gai sơ cấp biểu hiện nội sinh CD200R1 bằng kháng thể kháng CD200-R1

[0101] Do thuộc tính quan trọng trong cơ chế tác động sinh học của h10F6 là ngăn ngừa hữu hiệu CD200 gắn kết với các tế bào biểu hiện CD200R1, các tác giả sáng chế đã đánh giá khả năng của h10F6 trong việc phong bế CD200 tái tổ hợp hòa tan gắn kết với các tế bào đuôi gai được biệt hóa *in vitro* và biểu hiện CD200R1 nội sinh ở mức cao. h10F6 phong bế 100% sự gắn kết của CD200 với các tế bào DC biểu hiện CD200R1 theo cách phụ thuộc nồng độ với giá trị IC₅₀ bằng 0,08nM (**Fig.20**). Ở đây, các DC được biệt hóa *in-vitro* bằng bạch cầu đơn nhân to được cho gắn kết với nồng độ h10F6 tăng lên. Các kháng thể không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa hai lần trước khi cho thêm protein

dung hợp CD200-Fc-FLAG 500nM. Sau 20 phút ủ ở nhiệt độ 4°C, kháng thể PE kháng Flag được bổ sung để phát hiện sự gắn kết của CD200. Các giá trị EC50 của sự gắn kết được xác định bằng cách sử dụng 3 thông số, log10[h10F6] so với sự đáp ứng, sự làm khớp với đường cong không tuyến tính; đường thẳng đã làm khớp được ngoại suy dựa trên mô hình này. Kháng thể đối chứng gắn kết với CD200R1 nhưng không phong bế sự gắn kết của CD200R1-CD200 (không có chất phong bế) không ức chế sự gắn kết của CD200; trên thực tế, dường như nó làm gia tăng sự gắn kết. Đồng thời, các kết quả này chứng minh rằng h10F6 có thể phòng ngừa sự gắn kết của CD200 với CD200R1 trên các tế bào miễn dịch sơ cấp.

Ví dụ 14: Ưc chế sự truyền tín hiệu của CD200R1 bằng kháng thể kháng CD200R1

Hiệu quả của h10F6 đối với sự truyền tín hiệu qua trung gian CD200R1 theo hướng xuôi dòng được xác định tính chất *in vitro* bằng cách sử dụng 2 hệ thử nghiệm trên cơ sở tế bào khác nhau. Một hệ đánh giá khả năng của h10F6 trong việc ngăn ngừa sự huy động DOK2 đến miền nội bào của thụ thể CD200R1. Hệ còn lại đánh giá sự hoạt hóa xuôi dòng qua trung gian CD200R1 của yếu tố nhân kappa B (NFκB) bằng cách sử dụng các gen thông báo NFκB.

Các con đường truyền tín hiệu CD200R1 bắt đầu với sự phosphoryl hóa Y302 của CD200R1 do CD200 gây ra, sau đó là sự huy động DOK2 (Zhang, et al., 2004; Míhrshahi, et al., 2009; Míhrshahi and Brown, 2010). Theo đó, các tác giả sáng chế đã đánh giá khả năng của h10F6 trong việc phong bế sự huy động xuôi dòng của DOK2 bằng cách sử dụng thử nghiệm huy động DOK2 đặc hiệu CD200R1 có bán trên thị trường (EuroFins DiscoverX). Trong hệ thử nghiệm trên cơ sở tế bào *in vitro* này, dòng tế bào Jurkat của người được thiết kế để biểu hiện CD200R1 và DOK2, mỗi thành phần này được cải biến ở đầu tận cùng C bằng mảnh enzyme β-galactosidaza bổ trợ và riêng biệt. Khi DOK2 đến gần miền nội bào của CD200R1, 2 mảnh enzyme đã thiết kế sẽ bổ trợ cho nhau để tạo thành enzyme chức năng có khả năng thủy phân cơ chất độc quyền để tạo ra tín hiệu phát quang hóa học. Do đó, việc đồng nuôi cấy tế bào Jurkat của người với các tế bào HEK293 biểu hiện CD200 tạo ra tín hiệu phát quang

hóa học phụ thuộc liều dùng phản ánh sự truyền tín hiệu CD200R1 (**Fig.21**). Việc bổ sung các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 hòa tan vào môi trường đồng nuôi cấy phong bế sự huy động DOK2 đến CD200R1 do phối tử CD200 theo cách phụ thuộc nồng độ ($IC_{50} = 0,03nM$). Các tế bào HEK293T không có sự biểu hiện nội sinh của CD200 được sử dụng để xác định mức ban đầu của tín hiệu. Sự ức chế là hoàn toàn khi tăng nồng độ kháng thể khi tín hiệu trở lại mức ban đầu (được thể hiện bởi sự kích thích tế bào đối chứng HEK293T).

Các nghiên cứu tiền lâm sàng cho thấy con đường NF κ B chuẩn tắc có thể đóng vai trò thúc đẩy khối u trong các mô hình trên chuột bị bệnh ung thư liên quan đến buồng trứng, viêm ruột kết, tế bào gan và u nguyên bào xốp. Các báo cáo trong tài liệu chuyên ngành cho thấy rằng kiểu hình M2 của các đại thực bào liên quan đến khối u (tumor-associated macrophage: TAM) ức chế miễn dịch và các tế bào ức chế có nguồn gốc từ tủy (myeloid-derived suppressor cell: MDSC) có thể phụ thuộc vào NF κ B (Hagemann, et al., 2008; Li, et al., 2020). Hơn nữa, sự phá vỡ con đường NF κ B chuẩn tắc trong các tế bào tủy có thể làm chậm sự phát triển của khối u, phân cực lại M2 kháng viêm thành sự thâm nhiễm miễn dịch M1 tiền viêm hỗ trợ sự gia tăng của tế bào T CD8⁺ và sự chết tế bào theo chương trình của tế bào khối u (Achyut, et al., 2017). Dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to của người, K562, được thiết kế để biểu hiện CD200R1 và gen thông báo NF κ B- luciferaza để khai thác hiệu quả của sự truyền tín hiệu CD200-CD200R1 đối với con đường NF κ B và khả năng phong bế hiệu quả này của h10F6.

Việc xử lý các tế bào K562 biểu hiện CD200R1 bằng CD200 đã gắn với đĩa (dữ liệu không được thể hiện) hoặc đồng nuôi cấy với các tế bào HEK293T biểu hiện CD200 cảm ứng hoạt tính của gen thông báo NF κ B theo cách phụ thuộc số lượng tế bào (**Fig.22**, hình A). Việc bổ sung các hệ pha loãng theo bậc của h10F6 hòa tan vào môi trường đồng nuôi cấy K562 HEK293-CD200+ này phong bế hữu hiệu và hoàn toàn sự đáp ứng của NF κ B phụ thuộc CD200 đã gắn kết màng với giá trị IC_{50} bằng 2,31nM (**Fig.22**, hình B) và giá trị IC_{50} bằng 3,38nM khi CD200 đã gắn kết với đĩa (dữ liệu không được thể hiện). Các dữ liệu này chứng minh rằng h10F6 phong bế hữu hiệu sự truyền tín hiệu CD200/CD200R1 trong 2 hệ trên cơ sở tế bào độc lập.

Ví dụ 15: Tăng cường sự hoạt hóa tế bào miễn dịch bằng kháng thể kháng CD200R1

A. Hiệu quả của kháng thể kháng CD200R1 trong thử nghiệm về tế bào lymphô hỗn hợp

[0102] Khả năng của h10F6 trong việc làm đảo ngược tác dụng ức chế của DC sinh dung nạp trong ngữ cảnh đồng nuôi cấy tế bào T dị sinh được đánh giá trong thử nghiệm về tế bào lymphô hỗn hợp. Cả sự sản sinh xytokin và các dấu ấn về sự hoạt hóa tế bào T được xác định. Tóm lại, các bạch cầu đơn nhân to được biệt hóa thành các tế bào đuôi gai bằng cách nuôi cấy trong 7 ngày với GMCSF và IL-4. Các tế bào đuôi gai được phân cực thành DC sinh dung nạp hoặc được phân cực thành DC sinh miễn dịch để dùng làm đối chứng dương kích thích miễn dịch. Sau 3 ngày phân cực, các tế bào T-pan và các tế bào DC trưởng thành được trộn lẫn với nhau với sự có mặt của kháng thể h10F6 hoặc đối chứng isotyp. Sau đó, sự sản sinh xytokin và các dấu ấn về sự hoạt hóa tế bào T được phân tích sau khi đồng nuôi cấy từ 4 đến 6 ngày. Việc xử lý bằng h10F6 trong thử nghiệm về tế bào lymphô được trộn với DC sinh dung nạp dẫn đến sự hoạt hóa tế bào T khi được chứng minh bằng mức độ cảm ứng gấp từ 2 đến 3 lần theo cách phụ thuộc thời gian của các xytokin tiền viêm bao gồm IFN γ , IL-12p70, và IL-18 (Fig.23, hình A và C). Cũng quan sát được sự gia tăng đáng kể về dấu ấn hoạt hóa tế bào T CD69 và dấu ấn tăng sinh Ki67, đạt 40-70% mức độ hoạt hóa tối đa như được thể hiện bằng môi trường đồng nuôi cấy DC sinh miễn dịch (Fig.23, hình B). Đồng thời, các dữ liệu này chứng minh khả năng của h10F6 trong việc khôi phục chức năng của tế bào T với sự có mặt của các DC sinh dung nạp.

B. Hiệu quả của kháng thể kháng CD200R1 trong thử nghiệm tế bào T pan để đánh giá sự tiết ra IL-2 và sự sản sinh IFN γ

Khả năng khôi phục chức năng tế bào T của h10F6 cũng được đánh giá trong thử nghiệm tế bào T-pan với sự có mặt của CD200-Fc đã gắn với đĩa (Fig.24, hình A). Các tế bào T-pan của người được phân lập từ những người cho tế bào PBMC khỏe mạnh được kích thích thường xuyên bằng ngưng kết tổ hồng cầu thực vật và IL-2 trong 7 ngày trong môi trường hoàn chỉnh. Sau đó, tế bào được thu hoạch, được để yên với các tác nhân kích thích và gắn mỗi với IL-

4 trong 24 giờ. Việc xử lý sơ bộ này làm gia tăng mức độ biểu hiện của CD200R1 trên các tế bào T-pan, làm cho chúng miễn cảm hơn với phối tử (CD200). Việc xử lý các tế bào T-pan bằng h10F6 50nM cho thấy sự khôi phục chức năng tiết ra IL-2 với sự có mặt của CD200-Fc đã gắn với đĩa. h10F6 cũng khôi phục sự sản sinh IFN γ theo cách phụ thuộc liều dùng (EC50 bằng 0,07nM, như được thể hiện trên Fig.24, hình B). Do đó, h10F6 cũng trực tiếp điều biến chức năng tế bào T độc lập với các tế bào tủy.

Ví dụ 16: Kháng thể kháng CD200R1 làm gia tăng tỷ lệ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC trong thời gian thực theo cách phụ thuộc liều dùng

Các tế bào khối u đích (các tế bào COV644 biểu hiện CD200 nội sinh), được thiết kế để biểu hiện protein phát huỳnh quang màu xanh lục (green fluorescent protein: GFP). Các tế bào khối u COV644 được đánh dấu bằng GFP được ủ với PBMC từ những người cho khỏe mạnh. Tác nhân kích thích (SEB) cũng được bổ sung vào môi trường để hoạt hóa các tế bào miễn dịch. Mức độ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC được định lượng bằng cách xác định mức độ hao hụt cường độ phát huỳnh quang trong mỗi lỗ theo thời gian.

Mức độ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian miễn dịch được khẳng định bằng cách đánh giá bằng mắt thường để đảm bảo rằng sự mất tín hiệu phát huỳnh quang đồng thời với sự tiêu diệt tế bào khối u. Sự hoạt hóa và gắn mỗi thành công được thể hiện rõ ràng bởi sự tạo cụm của các tế bào miễn dịch không được đánh dấu. Sự tiêu diệt tế bào miễn dịch được khẳng định bằng sự phá vỡ màng tế bào được đánh dấu bằng GFP và sự hao hụt của tế bào khối u đích. h10F6 được thử nghiệm trong thử nghiệm về sự phát triển của khối u IncuCyte trong thời gian thực với 3 người cho khác nhau. 15 trong tổng số 24 nghiên cứu được tiến hành, h10F6 kích thích hoạt tính tiêu diệt kháng u khi được định lượng bằng cách giảm tín hiệu GFP trong mỗi lỗ so với đối chứng isotyp. h10F6 làm gia tăng sự chết của tế bào khối u qua trung gian PBMC được gắn mỗi SEB theo cách phụ thuộc liều dùng (Fig.25)

Trên Fig.25, diện tích dưới đường cong (area under the curve: AUC) của tín hiệu GFP từ pha tiêu diệt của 15 thử nghiệm tiêu diệt khối u qua trung gian

PBMC IncuCyte cho thấy hiệu quả của h10F6 là phù hợp với mô hình hồi quy của sự đáp ứng chất ức chế không tuyến tính và các dữ liệu được đánh giá về chất lượng tốt của sự phù hợp. 6 thử nghiệm đối với 3 người cho riêng biệt đã vượt qua ngưỡng chấp nhận được của $R^2 \geq 0,40$. Dữ liệu từ 6 thử nghiệm này được chuyển đổi thành tỷ lệ % tiêu diệt khối u qua trung gian PBMC so với đối chứng isotyp. Giá trị riêng biệt của tỷ lệ % tiêu diệt khối u được tính toán ($n = 4$ lần lặp lại đối với mỗi nồng độ) và được chuyển đổi thành tỷ lệ % tiêu diệt khối u trung bình. Tỷ lệ % tiêu diệt khối u trung bình, được thông báo là tỷ lệ tế bào khối u bị tiêu diệt tăng lên so với đối chứng isotyp, được vẽ biểu đồ theo nồng độ h10F6, và dữ liệu cụ thể của người cho từ các thử nghiệm lặp lại được tập hợp để thông báo nồng độ EC50 đối với h10F6 trong thử nghiệm của người cho, như được minh họa trên **Fig.26**.

Giá trị của mức độ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC trên 3 người cho được thông báo trong **Bảng 16**. h10F6 làm gia tăng mức độ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC theo cách phụ thuộc nồng độ, dẫn đến nồng độ EC50 trung bình bằng 1,37nM (hoặc 0,20 $\mu\text{g/ml}$, nằm trong khoảng: từ 0,17 đến 2,38nM). So với đối chứng isotyp, h10F6 làm gia tăng mức độ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC lên đến 52,9% (riêng biệt) và có hiệu quả tối đa trung bình là 35,2% trên 3 người cho (đối chứng isotyp đạt được tỷ lệ tiêu diệt bằng 0%, và 100% nếu các tế bào khối u không phát ra tín hiệu GFP trong suốt pha tiêu diệt).

Bảng 16: Tóm tắt về hiệu lực và hiệu quả tối đa của h10F6 đối với mức độ tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian PBMC so với đối chứng isotyp

	RG1939	RG1212	RG1307	Trung bình
	N=2	N=1	N=3	NA
EC50 (nM)	0,17	2,38	1,56	1,37
Tỷ lệ % tiêu diệt tăng lên, tối đa	29,8	52,9	22,8	35,2

h10F6 có khả năng làm gia tăng sự chết của tế bào khối u CD200+ qua trung gian PBMC với sự có mặt của PBMC từ người cho được kích thích bằng SEB.

Ví dụ 17: Nghiên cứu độc chất học bằng cách sử dụng h10F6.V1

Sự đánh giá độ an toàn không phải trong lâm sàng của h10F6 bao gồm sự đánh giá dữ liệu được lý *in vitro*, dữ liệu về khả năng dung nạp từ nghiên cứu PK *in vivo* để đánh giá khả năng gắn kết ngoài đích, sự giải phóng xytokin *in vitro*, và khả năng phản ứng chéo trong mô của h10F6, và khả năng dung nạp và nghiên cứu độc chất học GLP của kháng thể thay thế h10F6.V1.

Khả năng dung nạp của h10F6.V1 và khả năng gắn kết ngoài đích và độc tính được đánh giá sau khi sử dụng một liều lớn của h10F6 qua đường IV ở chuột và khỉ cynomolgus. Khả năng của h10F6.V1 trong việc cảm ứng sự giải phóng xytokin bởi các tế bào miễn dịch ngoại vi của người cũng được đánh giá.

A. Khả năng dung nạp ở chuột Sprague-Dawley

h10F6.V1 được dung nạp tốt ở chuột sau khi tiêm liều lớn một lần qua đường IV (từ 1 đến 2 ml/kg) với liều tối đa là 10 mg/kg (2 con/giới tính/nhóm; 1 mg/kg và 10 mg/kg. Các động vật được quan sát về các dấu hiệu lâm sàng có ý nghĩa, tình trạng sắp chết, và tỷ lệ chết ở mỗi thời điểm lấy mẫu và sử dụng liều. Trọng lượng cơ thể được ghi lại ở thời điểm dùng liều và vào các ngày thứ 7, 14, và 21. Không có tình trạng chết sớm hoặc tình trạng sắp chết và không có sự thay đổi liên quan đến sản phẩm thử nghiệm về các dấu hiệu lâm sàng hoặc trọng lượng cơ thể. Kết luận, không quan sát thấy độc tính rõ ràng nào mà sẽ cho thấy thể hiện sự gắn kết, ví dụ sự gắn kết ngoài đích của h10F6.V1 ở các con chuột sau khi sử dụng một liều qua đường IV tối đa là 10 mg/kg.

B. Khả năng dung nạp ở khỉ cynomolgus

h10F6.V1 được dung nạp tốt ở khỉ cynomolgus (2 con/giới tính/nhóm với liều 2 mg/kg và 20 mg/kg) sau khi tiêm một liều lớn qua đường IV (2 ml/kg) với liều tối đa là 20 mg/kg. Các động vật được sàng lọc về sức khỏe chung bởi nhân viên thú y có chứng chỉ khi đến vị trí nghiên cứu. Chỉ các động vật có sức khỏe tốt với các thông số bệnh lý trong lâm sàng phù hợp với dữ liệu tham khảo cụ thể của đàn mới được đưa vào nghiên cứu. Vào ngày dùng liều, các động vật được quan sát trước và sau mỗi thời điểm lấy mẫu trong 6 giờ đầu tiên sau khi dùng liều và lặp lại sau đó ở mỗi thời điểm lấy mẫu. Sau khi dùng liều, các động vật được quan sát ít nhất hai lần mỗi ngày về các dấu hiệu lâm sàng có ý nghĩa, tỷ lệ chết, và các dấu hiệu của sự đau đớn và tình trạng nguy

cấp, và ít nhất một lần mỗi ngày về vẻ bề ngoài và tình trạng sức khỏe chung. Trọng lượng cơ thể được ghi lại ở thời điểm trước khi dùng liều, ở thời điểm dùng liều, và ít nhất là hàng tuần sau khi dùng liều. Lấy mẫu máu ở thời điểm trước khi dùng liều, 24 giờ sau khi dùng liều, và 35 ngày sau khi dùng liều để đánh giá sự thay đổi về huyết học và hóa học trong huyết thanh. Không có tỷ lệ chết sớm hoặc tình trạng sắp chết và không có sự thay đổi liên quan đến sản phẩm thử nghiệm về các dấu hiệu lâm sàng, trọng lượng cơ thể, huyết học và hóa học huyết thanh. Kết luận, không quan sát thấy có độc tính rõ ràng để chỉ ra sự gắn kết ngoài đích của h10F6 ở khỉ cynomolgus sau khi sử dụng một lần qua đường IV với liều tối đa 20 mg/kg.

C. Thử nghiệm về sự giải phóng xytokin

Khả năng giải phóng xytokin bởi PBMC sau khi tiếp xúc với h10F6 được đánh giá và được phát hiện là không có hiệu quả. Sự đáp ứng của các mẫu máu toàn phần và PBMC được lấy từ 10 người cho khỏe mạnh với việc điều trị bằng h10F6.V1 được so sánh với việc điều trị bằng kháng thể kháng CD3 hoặc SEB (các đối chứng dương đối với thử nghiệm PBMC và máu toàn phần tương ứng), IgG1 kappa được làm cho giống với của người kháng lysozym của gà với việc điều trị bằng đối chứng isotyp có sự đột biến miền Fc của N297G (đối chứng isotyp âm), cũng như không có đối chứng điều trị. Các mẫu máu toàn phần được xử lý ở định dạng hòa tan, và PBMC được xử lý ở định dạng được phủ ướt, đã gắn với đĩa. Sự đáp ứng phụ thuộc nồng độ đối với h10F6.V1 được đánh giá ở nồng độ 0,002, 0,02, 0,2, 2, và 20 $\mu\text{g/ml}$ theo cả hai định dạng điều trị. Sự giải phóng xytokin được đánh giá ở một thời điểm duy nhất, 24 giờ sau khi xử lý để gây cảm ứng IL-2, IL-6 TNF α , và IFN γ .

Việc xử lý bằng h10F6.V1 không gây ra sự giải phóng xytokin của IL-2, TNF α , và IFN γ đáng chú ý bất kỳ trong các điều kiện hoặc nồng độ được thử nghiệm bất kỳ. Việc xử lý bằng h10F6.V1 không gây ra sự giải phóng IL-6 đáng chú ý bất kỳ trong định dạng hòa tan của mẫu máu toàn phần. Tất cả những người cho đều có nồng độ IL-6 ở mức thấp đến trung bình theo định dạng được phủ ướt, đã gắn với đĩa của PBMC, sau khi xử lý bằng h10F6. Quan sát được nồng độ của IL-6 ở các mẫu được xử lý bằng h10F6.V1 là tương đương với khi xử lý bằng kháng thể đối chứng âm isotyp IgG1 và thấp hơn so

với đối chứng dương kháng CD3 khi được sử dụng ở cùng nồng độ. Không quan sát được mối tương quan bất kỳ giữa nồng độ h10F6.V1 và nồng độ IL-6 được xác định. h10F6 không cho thấy có bằng chứng về sự giải phóng xytokin *in vitro* của các đối chứng âm IL-2, IL-6, TNF α , hoặc IFN γ trên đây khi được thử nghiệm trong mẫu máu toàn phần (ví dụ, định dạng xử lý hòa tan) hoặc PBMC (ví dụ, định dạng xử lý được phủ ướt, đã gắn với đĩa) từ 10 người cho khỏe mạnh.

Ví dụ 18: Đặc tính dược lý của kháng thể thay thế làm ví dụ

A. Sự tạo ra chất thử nghiệm không phải trong lâm sàng của kháng thể thay thế trong các tế bào Expi-HEK293

Kháng thể h10F6 không phản ứng chéo với CD200R1 được biểu hiện ở các loài được thử nghiệm không thuộc lâm sàng bao gồm chuột nhắt, chuột thường, thỏ, chó, và các động vật linh trưởng không phải người (khỉ rhesus, khỉ marmoset và khỉ cynomolgus). Do đó, kháng thể thay thế được làm cho giống với của người hoàn toàn gắn kết với CD200R1 của khỉ cynomolgus, h10F6.V1, được phát triển để đánh giá các mối nguy hại tiềm tàng có liên quan đến sự ức chế CD200R1. h10F6.V1 là biến thể của h10F6, và có chung trình tự chính, ngoại trừ 3 axit amin trong vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity-determining region: CDR) của chuỗi nặng và 1 axit amin trong vùng CDR của chuỗi nhẹ.

h10F6.V1 được tạo ra trong hệ biểu hiện Expi-HEK293 bằng cách sử dụng cùng quy trình như được mô tả đối với h10F6. Các đặc tính của h10F6.V1 được thể hiện trong **Bảng 17** dưới đây.

Bảng 17: Các đặc tính của vật liệu h10F6.V1

Phân tử	HPLC (% monome)	Khối lượng quan sát được theo phổ khối lượng (Da)	K _D theo Biacore (nM) (sự gắn kết với MfCD200R1)	Nội độc tố (EU/mg)
h10F6.V1 được tạo ra trong dòng tế bào Expi- HEK293	>99	145,066	2,63	0,03

B. Sự gắn kết của kháng thể thay thế với các tế bào PBMC được phân lập từ khỉ Cynomolgus

Để khẳng định rằng h10F6.V1 gắn kết với CD200R1 nội sinh được biểu hiện trên các tế bào của khỉ cynomolgus, sự gắn kết của h10F6.V1 với tập hợp con của tế bào miễn dịch ngoại vi được xác định bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng bằng cách sử dụng tế bào PBMC từ khỉ cynomolgus.

Trong tế bào PBMC được phân lập từ 3 con khỉ, h10F6.V1 biểu hiện sự gắn kết theo dự kiến với các tế bào T CD4⁺ (**Fig.27**). Sự gắn kết với các tế bào T được đánh giá bằng cách thử nghiệm các hệ pha loãng theo bậc của h10F6.V1. Quan sát được sự gắn kết phụ thuộc liều, với giá trị EC50 nằm trong khoảng từ 0,34 đến 1,54nM.

C. Phong bế sự tương tác MfCD200/MfCD200R1 bằng kháng thể thay thế

Khả năng của h10F6.V1 trong việc phong bế sự gắn kết của MfCD200R1 với MfCD200 đã cố định được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA. Kháng thể thay thế này phong bế sự tương tác MfCD200R1:MfCD200 với giá trị IC50 phong bế bằng 2,45nM, như được thể hiện trên **Fig.28**.

Dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to của người, K562, được thiết kế để biểu hiện ổn định MfCD200R1. Trình tự của MfCD200R1 được xác định rõ ràng bằng phương pháp phân tích tin sinh học và khẳng định trình tự thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN được chiết từ thực phẩm của khỉ từ 2 người cho. Sự gắn kết của MfCD200 được dung hợp với đuôi Fc của hIgG1 không được glycosyl hóa với các tế bào K562 biểu hiện MfCD200R1 được khẳng định bằng thiết bị FACS. Sự gắn kết này được phong bế mạnh bởi h10F6.V1 (IC50 = 0,50nM), trong khi h10F6 không gắn kết MfCD200R1 không phong bế sự tương tác này (**Fig.29**).

D. Dược động học đơn liều của kháng thể thay thế ở khỉ Cynomolgus

h10F6.V1 là chất thay thế của h10F6 với ái lực gắn kết cao với CD200R1 từ khỉ cynomolgus. Do h10F6 không gắn kết với CD200R1 từ khỉ cynomolgus, các loài độc tố chính, nghiên cứu PK liều đơn của h10F6.V1 được thực hiện để đánh giá các đặc tính PK của nó và khả năng dung nạp ở khỉ cynomolgus, và xác định tính thích hợp của nó để sử dụng trong nghiên cứu

nhận biết mỗi nguy hại của GLP. Profin PK của nồng độ h10F6.V1 theo thời gian ở khỉ được thể hiện trên **Fig.30**.

Các thông số PK trung bình của h10F6.V1 ở khỉ được tóm tắt trong **Bảng 18** dưới đây. Sau khi tiêm một liều lớn qua đường IV bằng 20 mg/kg cho khỉ cynomolgus, nồng độ h10F6.V1 trong huyết thanh giảm đi theo cách hai pha. Sự thanh thải h10F6.V1 là tuyến tính theo thời gian cho thấy không có bằng chứng về ADA hoặc đặc tính thanh thải không tuyến tính khác (ví dụ, sự phân bố được chất qua trung gian đích; TMDD) trong tối đa 35 ngày. Thời gian bán hủy cuối trung bình là 10,2 ngày, và các giá trị trung bình về sự thanh thải và thể tích phân bố theo ước tính ở trạng thái ổn định là phù hợp với các giá trị có thể là điển hình cho IgG được làm cho giống với của người với PK tuyến tính ở khỉ.

Bảng 18: Các thông số PK của kháng thể thay thế sau khi sử dụng một liều qua đường IV cho khỉ Cynomolgus

Liều dùng	Thông số PK trung bình (N=3M)				
	Cmax (ug/ml)	AUClast (ngày*ug/ml)	T1/2 (ngày)	CL (ml/kg/ngày)	VSS (ml/kg)
20 mg/kg	515	3670	10,2	4,97	69,9
CV %	17,9	2,7	14,8	5,4	6,8

h10F6.V1 có PK tuyến tính ở khỉ, điều này gợi ý rằng cơ chế thanh thải không đặc hiệu, không bão hòa, tuyến tính là các yếu tố góp phần chính vào sự thanh thải h10F6.V1 ở khỉ với liều dùng 20 mg/kg được nghiên cứu. h10F6.V1 được dung nạp tốt đến ngày thứ 35 dựa trên các quan sát trong lâm sàng và sự đánh giá các thông số hóa học và huyết học trong huyết thanh (xem phần 14.2.3.1). Do đó, PK và khả năng dung nạp của h10F6.V1 ở khỉ hỗ trợ cho tính thích hợp của nó làm chất thay thế cho h10F6 và việc sử dụng nó trong nghiên cứu độc chất học của GLP.

Ví dụ 19: Nghiên cứu độc chất học bằng cách sử dụng kháng thể thay thế

Việc đánh giá sự gắn kết của h10F6 với CD200R1 được biểu hiện ở các loài khác cho thấy rằng nó không phản ứng chéo với CD200R1 được biểu hiện

ở các loài được sử dụng để đánh giá độ an toàn không thuộc lâm sàng. Do đó, không thể đánh giá khả năng gây độc tiềm tàng của h10F6 ở các loài động vật có liên quan về mặt dược lý và kháng thể thay thế gắn kết với CD200R1 từ khỉ cynomolgus, h10F6.V1, được phát triển để đánh giá độ an toàn không thuộc lâm sàng nhằm mục đích xác định mối nguy hại.

A. Khả năng dung nạp trong các nghiên cứu đơn liều ở khỉ cynomolgus

h10F6.V1 được dung nạp tốt ở khỉ cynomolgus (3 con đực) sau khi tiêm một liều lớn qua đường IV (2 ml/kg, 20 mg/kg). Các động vật được sàng lọc về sức khỏe tổng quát bởi nhân viên thú y có chứng chỉ khi đến địa điểm nghiên cứu. Chỉ các động vật có sức khỏe tốt với các thông số bệnh lý lâm sàng phù hợp với dữ liệu tham khảo đặc hiệu đàn mới được đưa vào nghiên cứu. Vào ngày dùng liều, các động vật được quan sát trước và sau mỗi thời điểm lấy mẫu trong 6 giờ đầu tiên sau khi dùng liều và lặp lại ở mỗi thời điểm lấy mẫu tiếp theo. Sau khi dùng liều, các động vật được quan sát ít nhất hai lần mỗi ngày về các dấu hiệu lâm sàng có ý nghĩa, tỷ lệ chết, và dấu hiệu về tình trạng đau và tình trạng nguy cấp, và ít nhất một lần mỗi ngày về tình trạng sức khỏe tổng quát và vẻ bề ngoài. Trọng lượng cơ thể được ghi lại ở thời điểm trước khi dùng liều, ở thời điểm dùng liều, và ít nhất là hàng tuần sau khi dùng liều. Mẫu máu được lấy ở các thời điểm trước khi dùng liều, 24 giờ sau khi dùng liều, và 35 ngày sau khi dùng liều để đánh giá sự thay đổi về huyết học và hóa học trong huyết thanh. Không có tỷ lệ chết sớm hoặc tình trạng sắp chết và không có sự thay đổi liên quan đến sản phẩm thử nghiệm về các dấu hiệu lâm sàng, trọng lượng cơ thể, huyết học hoặc hóa học trong lâm sàng. Không quan sát thấy độc tính rõ ràng để có thể chỉ ra rằng việc ức chế sự tương tác của CD200/CD200R1 ở khỉ cynomolgus sau khi dùng một lần qua đường IV với liều 20 mg/kg là nguy hiểm.

B. Đặc tính dược lý về độc chất học và độ an toàn trong nghiên cứu liều lặp lại ở khỉ Cynomolgus

Nghiên cứu GLP với liều lặp lại có thể xác định độc tính tiềm tàng của h10F6.V1 khi được sử dụng mỗi tuần một lần bằng tiêm chậm liều lớn qua đường IV, ví dụ, trong 4 tuần, cho các con khỉ cynomolgus đực và cái nhằm mục đích xác định mối nguy hại của độc tính có thể có liên quan đến sự gián

đoạn của tương tác CD200/CD200R1. Nghiên cứu này cũng có thể đánh giá khả năng đảo ngược tiềm tàng của sự phát hiện bất kỳ sau khoảng thời gian phục hồi 6 tuần. Ngoài ra, các đặc điểm của TK và các dấu ấn sinh học khám phá có thể được đánh giá. Các liều dùng có thể được chọn dựa trên nghiên cứu PD liều đơn không phải GLP, như đã mô tả trên đây. Dựa vào sự dự đoán RO, liều dùng 100 mg/kg có thể tạo ra khoảng thời gian bão hòa đích kéo dài. Liều dùng 10 mg/kg có thể không tạo ra các dấu hiệu quan sát được và có thể tạo ra khoảng 99% RO trong khoảng thời gian dùng liều mỗi tuần một lần. Việc thiết kế nghiên cứu được thể hiện trong **Bảng 19** dưới đây.

Bảng 19: Thiết kế nghiên cứu cho nghiên cứu độc chất học về GLP trong 4 tuần của kháng thể thay thế bằng cách tiêm truyền trong tĩnh mạch cho khỉ *Cynomolgus*

Nhóm #	Điều trị bằng	Liều lượng (mg/kg/liều)	Nồng độ (mg/ml)	Thể tích liều dùng (ml/kg)	Số lượng con đực	Số lượng con cái
1	Chất dẫn thuốc	0	0	2	5	5
2	Kháng thể thay thế	10	5	2	3	3
3	Kháng thể thay thế	100	50	2	5	5

Sự ảnh hưởng liên quan đến sản phẩm thử nghiệm đối với các tiêu chí về độc chất học tiêu chuẩn bao gồm sự quan sát lâm sàng, trọng lượng cơ thể, sự thay đổi trọng lượng cơ thể, mức tiêu thụ thực phẩm, nhãn khoa, huyết học, hóa học lâm sàng, sự đông máu, phân tích nước tiểu, trọng lượng cơ quan, mô bệnh học tổng thể và chi tiết có thể được đánh giá. Ngoài ra, sự ảnh hưởng đến các thông số dược lý về độ an toàn (hành vi thần kinh, điện tâm đồ, nhịp tim, huyết áp, hoặc nhịp thở) có thể được theo dõi. Ngoài các thông số tiêu chuẩn, sự ảnh hưởng đến các thông số xác định kiểu miễn dịch máu ngoại vi (CD3, FoxP3, CD25, CD159a, CD20, CD4, Ki67, và CD8) và nồng độ xytokin (IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, IFN γ , và TNF α) có thể được theo dõi, ví dụ, bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã được xác nhận. Các mẫu dùng cho TK, và phương pháp

phân tích dấu ấn sinh học thăm dò có thể được thu thập để đánh giá. Khả năng dung nạp cục bộ cũng có thể được đánh giá.

Các thông số và tiêu chí sau đây được đánh giá trong nghiên cứu này: tỷ lệ chết, sự quan sát lâm sàng, trọng lượng cơ thể, mức tiêu thụ thực phẩm định tính, nhãn khoa, điện tâm đồ định tính, nhiệt độ cơ thể, khám thần kinh, nhịp thở, các thông số bệnh lý lâm sàng (huyết học, sự đông máu, hóa học lâm sàng, và phân tích nước tiểu), phân tích sinh học và các thông số độc lực, các thông số của kháng thể kháng thuốc, xác định kiểu miễn dịch, phân tích mức độ phân bố của thụ thể, phân tích xytokin, xử lý huyết tương thăm dò, thăm dò mẫu máu toàn phần để tìm ARN, trọng lượng cơ quan, và khám tổng thể và chi tiết.

Việc sử dụng h10F6.V1 với liều 10 hoặc 100 mg/kg cho khỉ cynomolgus bằng cách tiêm liều lớn qua đường trong tĩnh mạch, 4 tuần một lần, không liên quan đến sự thay đổi về quan sát lâm sàng, mức tiêu thụ thức ăn, trọng lượng cơ thể, khám nhãn khoa, điện tim, nhiệt độ cơ thể, khám thần kinh, nhịp thở, huyết học, sự đông máu, hóa học lâm sàng, các thông số phân tích nước tiểu, hoặc tế bào học tủy xương.

Đối với việc định kiểu miễn dịch, quan sát được sự liên quan đến h10F6.V1 được giới hạn ở sự gia tăng mức độ biểu hiện của Ki67 trên các tế bào lymphô T, tế bào lymphô T CD25+, và tế bào NK vào ngày 15 trước khi dùng liều và ngày 29 ở nhóm sử dụng liều 10 và 100 mg/kg. Việc sử dụng h10F6.V1 dẫn đến làm giảm tỷ lệ % thụ thể tự do và làm gia tăng tỷ lệ % phân bố của thụ thể (% RO) trên bạch cầu trung tính với liều 10 mg/kg vào ngày 1: 48 giờ sau khi dùng liều và ngày 8 trước khi dùng liều; và với liều 100 mg/kg vào ngày 1: 48 giờ sau khi dùng liều cho đến khi kết thúc khoảng thời gian hồi phục vào ngày 63. Cũng có sự gia tăng tỷ lệ % tổng lượng thụ thể trên các tế bào lymphô T hỗ trợ đối với cả hai nhóm dùng liều vào ngày 22: 48 giờ sau khi dùng liều và tỷ lệ % RO tăng lên đối với các tế bào lymphô T của cả hai nhóm dùng liều vào ngày 1: 48 giờ sau khi dùng liều cho đến ngày 29. Các mức tăng này trở lại gần bằng mức ban đầu vào ngày 50. Không có sự thay đổi liên quan đến h10F6.V1 trong các quần thể tế bào được thử nghiệm khác bất kỳ hoặc các dấu ấn hoạt hóa của cả hai nhóm dùng liều.

Sự đánh giá xytokin cho thấy không có thay đổi về nồng độ IL-2, IL-6,

IL-8, MCP-1, IFN- γ , và TNF- α trong huyết tương so với tiền nghiên cứu và các khoảng đối chứng có thể được cho là do việc sử dụng h10F6.V1 ở thời điểm bất kỳ đối với tất cả các động vật được cho dùng liều.

Để đánh giá vi mô, khi gây chết êm ái giai đoạn cuối, quan sát được tỷ lệ mắc bệnh cao hơn và/hoặc mức độ nghiêm trọng của sự thâm nhiễm tế bào đơn nhân ở não (mức độ nhẹ) và mắt (mức độ nhẹ) của một con cái được cho sử dụng liều 100 mg/kg, tuyến thượng thận (ở mức rất nhỏ) của các động vật được cho sử dụng liều ≥ 10 mg/kg, và tuyến yên (ở mức rất nhỏ) của các con cái được cho sử dụng liều 100 mg/kg. Khi gây chết êm ái phục hồi, quan sát được tỷ lệ mắc bệnh cao hơn và/hoặc mức độ nghiêm trọng của sự thâm nhiễm tế bào đơn nhân ở não (mức độ nhẹ) của một con đực được cho sử dụng liều 100 mg/kg, tuyến thượng thận (ở mức rất nhỏ) của một con cái được cho sử dụng liều 100 mg/kg, và tuyến yên (ở mức rất nhỏ) của các con đực được cho sử dụng liều 100 mg/kg. Có thể quan sát được sự thâm nhiễm tế bào đơn nhân dưới dạng sự phát hiện cơ bản hoặc có liên quan đến việc sử dụng sản phẩm sinh học. Quan sát được tỷ lệ mắc bệnh cao và/hoặc mức độ nghiêm trọng ở các động vật được cho dùng liều, không tương ứng với tỷ lệ mắc bệnh theo giới tính, và sự khác biệt về mức độ nghiêm trọng ở mức thấp cho thấy rằng sự thâm nhiễm này rất có thể là hiệu quả của nhóm không đặc hiệu có liên quan đến việc sử dụng sản phẩm sinh học chứ không phải hiệu quả liên quan đến h10F6.V1 theo cách trực tiếp và/hoặc góp phần không thể được loại trừ hoàn toàn. Ở giai đoạn gây chết êm ái cuối và hồi phục, không quan sát thấy sự khác biệt về trọng lượng cơ quan hoặc sự phát hiện vĩ mô liên quan đến h10F6.V1.

Kết luận, việc sử dụng h10F6.V1 bằng cách tiêm qua đường trong tĩnh mạch (tiêm chậm với liều lớn) mỗi tuần 1 lần vào các ngày 1, 8, 15, và 22 được dung nạp tốt ở khỉ cynomolgus với mức liều ≤ 100 mg/kg. Các thay đổi về mô bệnh học bao gồm sự thâm nhiễm tế bào đơn nhân ở não, mắt (chỉ gây chết êm ái giai đoạn cuối), và tuyến yên với liều 100 mg/kg, và tuyến thượng thận với liều ≥ 10 mg/kg. Các thay đổi này có thể liên quan đến phức hợp miễn dịch từ các kháng thể kháng thuốc và được cho là không có hại. Dựa trên các kết quả này, mức liều mà không quan sát thấy tác dụng có hại được cho là 100 mg/kg.

Ví dụ 20: Tóm tắt đặc tính dược lý so sánh của h10F6 và kháng thể thay thế

Dữ liệu sơ bộ thu được bằng cách sử dụng vật liệu được tạo ra trong các tế bào Expi-293HEK chỉ ra rằng h10F6.V1 gắn kết với MfCD200R1 tái tổ hợp với giá trị K_D bằng 2,63 nM, điều này chứng minh rằng ái lực gắn kết của nó đối với MfCD200R1 có thể là tương đương với (khoảng 20 lần) ái lực gắn kết của h10F6 đối với hCD200R1, như được thể hiện trong **Bảng 20** dưới đây. Phù hợp với các kết quả của nghiên cứu sự gắn kết protein tái tổ hợp, kháng thể thay thế được thử nghiệm có thể gắn kết với các tế bào T CD4⁺ nguyên phát của khỉ cynomolgus T biểu hiện CD200R1 với ái lực tương đương (khoảng 4 lần; **Bảng 20**) với h10F6 gắn kết với các tế bào T của người. Hơn nữa, kết quả của các nghiên cứu sự phong bế *in vitro* đã chứng minh rằng h10F6.V1 có thể phong bế sự tương tác giữa MfCD200R1 và MfCD200 với hiệu lực tương đương với sự phong bế của h10F6 đối với hCD200R1 và hCD200 của người trong cả thử nghiệm ELISA và hệ biểu hiện trên cơ sở tế bào biểu hiện quá mức MfCD200R1, trong ~6 đến 7 lần; Bảng 20).

Bảng 20: Đặc tính dược lý tương đương của h10F6 và kháng thể thay thế

	Ái lực gắn kết của SPR (K_D ; nM)	Sự gắn kết bề mặt-tế bào (EC50; nM)	ELISA phong bế (IC50; nM)	Sự phong bế bề mặt-tế bào (IC50; nM)
h10F6 – hCD200R1:hCD200	0,12	0,40	0,36	0,08
Kháng thể thay thế – hCD200R1:hCD200	2,63	1,30	2,45	0,50

Tóm lại, các kết quả này cho thấy rằng kháng thể thay thế h10F6.V1 có thể ức chế sự gắn kết của MfCD200R1:MfCD200 theo cách tương đương với sự ức chế của h10F6 đối với sự gắn kết hCD200R1:hCD200.

Thông số dược động học so sánh của h10F6 và h10F6.V1

Các đặc tính PK của h10F6.V1 và h10F6 là tương tự khi được đánh giá ở khỉ cynomolgus với liều đơn 20 mg/kg được sử dụng bằng cách tiêm liều lớn qua đường IV. Thời gian bán hủy cuối trung bình của h10F6.V1 và h10F6 tương ứng là 10,2 ngày và từ 11,5 đến 13,3 ngày, và mức độ tiếp xúc của chúng

là tương đương (khoảng 1,5 lần khi được xác định theo C_{max} và AUC_{last}). PK của h10F6.V1 được sản sinh trong các tế bào CHO-K1 sẽ được đánh giá trong nghiên cứu nhận biết mối nguy hại của GLP. h10F6 là kháng thể IgG đặc hiệu hCD200R1, không được glycosyl hóa, và mang điện tích trung hòa và do đó được cho là có đặc tính PK tương tự khi h10F6 được sản sinh trong các tế bào CHO-K1 hoặc trong các tế bào Expi-HEK293.

Mặc dù phần mô tả trên đây sáng chế đã được mô tả ở một số chi tiết bằng cách ví dụ và nhằm mục đích minh họa rõ ràng và dễ hiểu, phần mô tả này bao gồm cả các ví dụ, phần mô tả, và các phương án được mô tả ở đây nhằm mục đích minh họa được dự định để làm ví dụ, và không được hiểu theo nghĩa làm giới hạn sáng chế. Một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ ràng có thể thực hiện nhiều cải biến hoặc thay đổi khác nhau đối với các ví dụ, phần mô tả, và các phương án được mô tả ở đây và vẫn được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này và các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Ngoài ra, một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận biết nhiều phương pháp và quy trình tương đương với các phương pháp và quy trình được mô tả ở đây. Tất cả các phương pháp và quy trình tương đương này cần được hiểu là vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế và được bao gồm trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Các phương án bổ sung của sáng chế được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

Sáng chế bao gồm tất cả các tài liệu công bố, đơn sáng chế, bằng độc quyền sáng chế, hoặc các tài liệu khác được đề cập ở đây được kết hợp rõ ràng bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng cho tất cả các mục đích với phạm vi giống như mỗi tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, đơn sáng chế hoặc các tài liệu khác riêng biệt này được chỉ ra cụ thể riêng biệt là được đưa vào đây bằng cách viện dẫn với toàn bộ nội dung của nó cho tất cả các mục đích và được nêu trọn vẹn ở đây. Trong trường hợp có sự khác biệt, bản mô tả này, kể cả các thuật ngữ cụ thể sẽ được sử dụng.

Tài liệu tham khảo

1. Mahrshahi et al., (2009) “ Essential Roles for Dok2 and RasGAP in CD200 Receptor-Mediated Regulation of Human Myeloid Cells.” J. Immunology. 183:4879-4886.
2. Mahrshahi et al., (2010) “ Downstream of Tyrosine Kinase 1 and 2 Plays Opposing Roles in CD200 Receptor Signaling.” J. Immunology. 185:7216-7222
3. Wang et al., (2019) “Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy.” Nat. Med. Vol 25:656-666.
4. Woodle, E. Steve et al., (1999), “Phase 1 Trial of a Humanized, Fc Receptor Nonbinding OKT3 Antibody, huOKT3Yγ1 (Ala-Ala) in the Treatment of Acute Renal Allograft Rejection”, Transplantation, 68(5): 608-616 (1999)).
5. Linsley P.S., et al., “Copy Number Loss of the Interferon Gene Cluster in Melanomas Is Linked to Reduced T Cell Infiltrate and Poor Patient Prognosis”, PLoS One, 9(10): e109760 (2014).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD200R1 bao gồm (i) vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ nhất (HVR-L1), vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ hai (HVR-L2), và vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ ba (HVR-L3); và (ii) vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ nhất (HVR-H1), vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ hai (HVR-H2), và vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ ba (HVR-H3), trong đó:

- (a) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 15, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 16, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 17;
- (b) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 19, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 20, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 21; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 23, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 24, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 25;
- (c) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 27, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 28, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 29; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 31, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 32, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 33;
- (d) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 35, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 36, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 37; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 39, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 40, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 41;
- (e) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 43, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 44, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 45; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 47, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 48, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 49;
- (f) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 51, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 52, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 53; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 55, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 56, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 57;
- (g) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 59, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 60, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 61; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 63, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 64, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 65;

- (h) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 77, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 78, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 79; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 81, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 82, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 83;
- (i) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 85, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 86, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 87;
- (j) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 81, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 82, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 83; hoặc
- (k) vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 77, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 78, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 79; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 85, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 86, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 87.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, hoặc 76.

3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó

- (a) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 10, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 14;
- (b) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 18, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 22;
- (c) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 26, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 30;
- (d) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính

- đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 34, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 38;
- (e) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 42, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 46;
- (f) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 50, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 54;
- (g) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 58, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 62;
- (h) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 66, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 67;
- (i) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 76, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 80;
- (j) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 66, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 84;
- (k) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 66, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 80; hoặc
- (l) kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 76, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ

ID NO: 84.

4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa gồm trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 68, 71, và 74.

5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa:

- (a) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 69;
- (b) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 70;
- (c) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 71; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 88;
- (d) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 71; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 72;
- (e) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 89;
- (f) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 73;
- (g) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 68; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 88;
- (h) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 71; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 89; hoặc
- (i) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 74; và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự SEQ ID NO: 75.

6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này khác biệt bởi một hoặc nhiều đặc tính sau:

- (a) gắn kết với hu-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M;
- (b) gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt hoặc hu-CD200R1-iso4-Ref, và hu-CD200R1-iso1-Alt hoặc hu-CD200R1-iso1-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M;
- (c) gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt và hu-CD200R1-iso4-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M;
- (d) gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt, hu-CD200R1-iso4-Ref, hu-CD200R1-iso1-Alt, và hu-CD200R1-iso1-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M;
- (e) gắn kết với cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M;
- (f) gắn kết với hu-CD200R1 và cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M;
- (g) phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1-iso4-Alt (SEQ ID NO: 1), hu-CD200R1-iso4-Ref (SEQ ID NO: 2), hu-CD200R1-iso1-Alt (SEQ ID NO: 3), và hu-CD200R1-iso1-Ref (SEQ ID NO: 4) được xác định bằng thử nghiệm ELISA với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 10nM;
- (h) phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1 được biểu hiện trên tế bào với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM;
- (i) gắn kết với các tế bào T của người với giá trị EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM;
- (j) làm gia tăng sự sản sinh IFN γ từ các tế bào khối u của người ít nhất là 1,2 lần với nồng độ kháng thể nhỏ hơn hoặc bằng 100nM;
- (k) làm gia tăng sự sản sinh IFN γ hoặc IL-2 từ các tế bào T của người được phủ hu-CD200-Fc so với đối chứng IgG ít nhất là 1,2 lần;
- (l) làm gia tăng sự hoạt hóa các tế bào T CD4 $^{+}$ của người hoặc các tế bào T CD8 $^{+}$ của người ít nhất là 1,5 lần;
- (m) không có hoạt tính chủ vận đối với sự truyền tín hiệu CD200R1;
- (n) phong bế sự cảm ứng hoạt tính của pDok2 trong các dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to U937 được điều trị bằng hu-CD200-Fc hòa tan; hoặc
- (o) phong bế sự phiên mã NF κ B do các dòng tế bào biểu hiện hu-CD200R1 gắn kết với hu-CD200 gây ra.

7. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD200R1 theo điểm 1 và chất mang được dụng.

8. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62, 67, 80, hoặc 84.

9. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có tính đồng nhất ít nhất 90% với trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 69, 70, 72, 73, 75, 88, và 89.

10. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó dược phẩm này còn chứa chất hóa trị liệu hoặc kháng thể có tính đặc hiệu đối với phân tử kiểm soát miễn dịch.

11. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó kháng thể kháng CD200R1 là chất có hoạt tính duy nhất của dược phẩm này.

12. Kháng thể kháng CD200R1 chứa (i) trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) có trình tự SEQ ID NO: 69, và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 68.

13. Kháng thể kháng CD200R1 chứa (i) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 67, và (ii) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 66.

14. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với hu-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4.

15. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt hoặc hu-CD200R1-iso4-Ref, và hu-CD200R1-iso1-Alt với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2, và polypeptit hu-CD200R1-iso1-Alt của trình tự SEQ ID NO: 3.

16. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt hoặc hu-CD200R1-iso4-Ref, và hu-CD200R1-iso1-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2, và polypeptit hu-CD200R1-iso1-Ref của trình tự SEQ ID NO: 4.

17. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt và hu-CD200R1-iso4-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1, polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2.

18. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với hu-CD200R1-iso4-Alt, hu-CD200R1-iso4-Ref, hu-CD200R1-iso1-Alt, và hu-CD200R1-iso1-Ref với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R1-iso4-Alt của trình tự SEQ ID NO: 1, hoặc polypeptit hu-CD200R1-iso4-Ref của trình tự SEQ ID NO: 2, và polypeptit hu-CD200R1-iso1-Alt của trình tự SEQ ID NO: 4 hoặc polypeptit hu-CD200R1-iso1-Ref polypeptide của trình tự SEQ ID NO: 3.

19. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit cyno-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5.

20. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với thể đồng dạng hu-CD200R1 và cyno-CD200R1 với ái lực gắn kết nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, trong đó ái lực gắn kết được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) với polypeptit hu-CD200R của trình tự SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4, và polypeptit cyno-CD200R1 của trình tự SEQ ID NO: 5.

21. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này phong bế sự gắn kết của hu-CD200-Fc với hu-CD200R1 được biểu hiện trên tế bào với giá trị IC_{50} nhỏ hơn hoặc

bằng 2,5nM, trong đó tế bào này là tế bào U937 biểu hiện ổn định hu-CD200R1.

22. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với các tế bào T của người với giá trị EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 2,5nM, trong đó các tế bào T của người là tế bào T CD4+ hoặc tế bào T CD8+.

23. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này làm gia tăng sự sản sinh IFN γ từ các tế bào khối u của người ít nhất là 1,2 lần, với nồng độ kháng thể nhỏ hơn hoặc bằng 100nM, trong đó loại tế bào khối u được chọn từ kết-trực tràng, màng trong tử cung, phổi, u melanin, buồng trứng, tụy, hoặc tuyến tiền liệt.

24. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này phong bế sự phiên mã NF κ B do hu-CD200 của tế bào K562 biểu hiện hu-CD200 gắn kết với hu-CD200R1 của hu-CD200R1.

25. Kháng thể kháng CD200R1 bao gồm:

- (a) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 10, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 14;
- (b) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 18, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 22;
- (c) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 26, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 30;
- (d) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 34, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 38;
- (e) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 42, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 46;
- (f) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 50, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 54;
- (g) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO:

- 58, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 62;
- (h) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 66, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 67;
- (i) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 76, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 80;
- (j) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 66, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 84;
- (k) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 66, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 80; hoặc
- (l) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 76, và trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 84.

26. Kháng thể kháng CD200R1 bao gồm:

- (a) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 68, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 69;
- (b) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 68, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 70;
- (c) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 71, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 88;
- (d) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 71, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 72;
- (e) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 68, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 89;
- (f) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 68, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 73;
- (g) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 68, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 88;
- (h) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 71, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 89; hoặc

- (i) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 74, và trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 75.

27. Kháng thể kháng CD200R1 bao gồm: (i) vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ nhất (HVR-L1), vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ hai (HVR-L2), và vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ ba (HVR-L3); và (ii) vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ nhất (HVR-H1), vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ hai (HVR-H2), và vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ ba (HVR-H3), bao gồm vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 11, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 12, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 13; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 15, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 16, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 17.

28. Kháng thể kháng CD200R1 bao gồm: (i) vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ nhất (HVR-L1), vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ hai (HVR-L2), và vùng siêu biến của chuỗi nhẹ thứ ba (HVR-L3); và (ii) vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ nhất (HVR-H1), vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ hai (HVR-H2), và vùng siêu biến của chuỗi nặng thứ ba (HVR-H3), bao gồm vùng HVR-L1 của trình tự SEQ ID NO: 77, vùng HVR-L2 của trình tự SEQ ID NO: 78, và vùng HVR-L3 của trình tự SEQ ID NO: 79; và vùng HVR-H1 của trình tự SEQ ID NO: 81, vùng HVR-H2 của trình tự SEQ ID NO: 82, và vùng HVR-H3 của trình tự SEQ ID NO: 83.

29. Kháng thể kháng CD200R1 chứa (i) trình tự axit amin của chuỗi nặng (HC) của trình tự SEQ ID NO: 88, và (ii) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ (LC) của trình tự SEQ ID NO: 71.

30. Kháng thể kháng CD200R1 chứa (i) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của trình tự SEQ ID NO: 80, và (ii) trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của trình tự SEQ ID NO: 76.

FIG. 1A

Trình tự miền VL

OX108-LC	1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES	56
22.1-LC	1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES	56
10F6-LC	1 DIVLTQSPPSLAVSLGQRATMSCRASESVDYSGNSFMHWFQQKAGQPPKLLIYRASNLES	56
9B8-LC	1 QIVLTQSPALTSASPGKVTMTCSASSSV-----SYMWFQQKPRSSPKPWIYLTSKLAS	56
5D1-LC	1 DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSIS---KYLAWYQEKPGTKNKFLIYSGSTLQS	56
10A2-LC	1 DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSIS---KYLAWYQEKPGTKNKLLIYSGSTLQS	56
1F3-LC	1 DVQMIQSPSSLSASLGDKVTMTCAQASHTI-----NLNWFQQKPGKAPKLLIYGTSNLED	56
11E4-LC	1 DVQMIQSPSSLSASLGDKVTMTCAQASHTI-----NLNWFQQKPGKAPKLLIYGTSNLED	56
OX108-LC	57 GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYQCQHSRE-LLTFGAGTKVEIK	107
22.1-LC	57 GVPVRFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYQCQHNRE-LLTFGAGTKLELK	107
10F6-LC	57 GIPARFSGSGSRTDFTLTINPLEADDVATYCHQSNEDPPTFGGGTKLEMK	107
9B8-LC	57 GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYCCQWSSYPPLTFGAGTKLELK	107
5D1-LC	57 GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQYNEYPWTFGGGKLEIK	107
10A2-LC	57 GIPSRFSGSGSVTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQYNEYPWTFGGGKLEIK	107
1F3-LC	57 GVPPRFSGSGYGTDFTLTISSLEDEDMATYFCLQHTYLPWTFGGGKLEIK	107
11E4-LC	57 GVPPRFSGSGYGTDFTLTISSLEDEDMATYFCLQHTYLPWTFGGGKLEIK	107

FIG. 1B

Trình tự miền VH

OX108-HC 1 EVKLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDTNYNE 61
 22.1-HC 1 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMFWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDDTKYNE 61
 10F6-HC 1 QVQLKESGPGLVAPSSQSLITCTVSGFSLTNYAVSVVRQPPGKGLWLGVMWAG-GGTNYNS 61
 9B8-HC 1 EVQLQQSGTVLRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMHVVKQRPQQGLEWIGRIDPANDNTKYAP 61
 5D1-HC 1 EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMHVVKQRPQQGLEWIGRIDPENGNTKYGP 61
 10A2-HC 1 EVQLQQSGAEFVRPGASVKLSCTTSGFYIKDDYIHHVVKQRPQQGLEWIGRIDPANGNTKYAP 61
 1F3-HC 1 EVQLQQSGAEFVRPGASVRLSCTTSGFYIKDDYIHHVVKQRPQQGLEWIGRIDPANGNTKYAP 61
 11E4-HC 1 EVQLQQSGTVLRPGASVKMSCEASGYTFTSYVMHWVKQSPGQGLEWVGAIYPGNSDTNYNQ 61

OX108-HC 62 KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAREDYYGSR---WGYWGQGTTLTVSS 113
 22.1-HC 62 KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAREDYYGSR---FVYWGQGTTLTVSS 113
 10F6-HC 62 VFKSRLTISKDNSKSQVFLKMNSLQTDLTARYYCARERPLTGV---MDYWGQGTSTVTVSS 113
 9B8-HC 62 KFDRAITITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTRVEGRGTGY--FDYWGQGTTLTVSS 113
 5D1-HC 62 KFDKATITADTSSNTAYLQFSSLTSEDTAVYYCTRQLGLRRVWYALDYWGQGTSTVTVSS 113
 10A2-HC 62 KFDKATITADTSSNTAYLQLSRLTSEDTAVYYCARQLGLRRTWYSLDYWGQGTSTVTVSS 113
 1F3-HC 62 KFDKATITADTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYCTRQLGLRRTWYAMDYWGQGTSTVTVSS 113
 11E4-HC 62 KFKGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTNEDSAVYYCTTA---V---GSYWGQGTTLTVSA 113

FIG. 2

Trình tự miền VH

Dòng mầm của người	1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYAVSWVRQPPGKGLVGLVGMWAGGGTNYN	60
10F6 của chuột	1	...K...A..QS..I.....	60
10F6 được làm cho giống với của người	1	E...Q.....K..ET..L.....	60
Dòng mầm của người	61	SVFKSRLTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCARERPLTGVMQDYWGQGLVTVSS	113
10F6 của chuột	61	S..F..MN.LQTD...R.....S.....	113
10F6 được làm cho giống với của người	61	N..S..LS.VTAA...V.....L.....	113

Trình tự miền VL

Dòng mầm của người	1	DIVLTQSPDLSLAVSLGERATINCRASESVDYSGNSFMHWFQQKPGQPPKLLIYRASNL	60
10F6 của chuột	1	P.....Q...MS.....A.....	60
10F6 được làm cho giống với của người	1	D.....E...IN.....P.....	60
Dòng mầm của người	61	GIPDRFSGSGSRDFTLTITSSLQAEADVAVYYCHQSNEDPPTFGGGTKVEIK	107
10F6 của chuột	61	...A.....NP.E.D...T.....L.M.	107
10F6 được làm cho giống với của người	61	...D.....SS.Q.E...V.....V.I.	107

FIG. 3

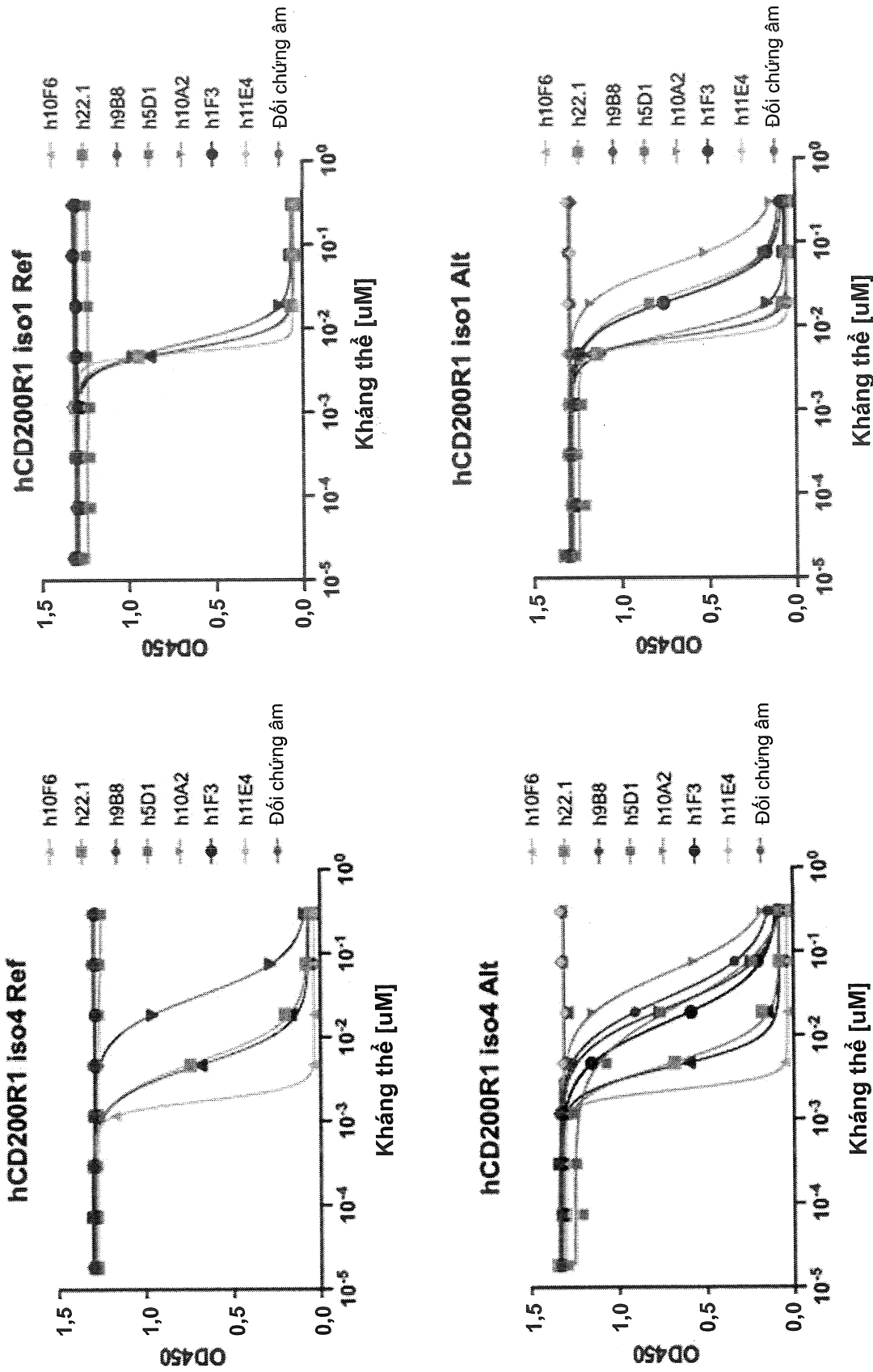
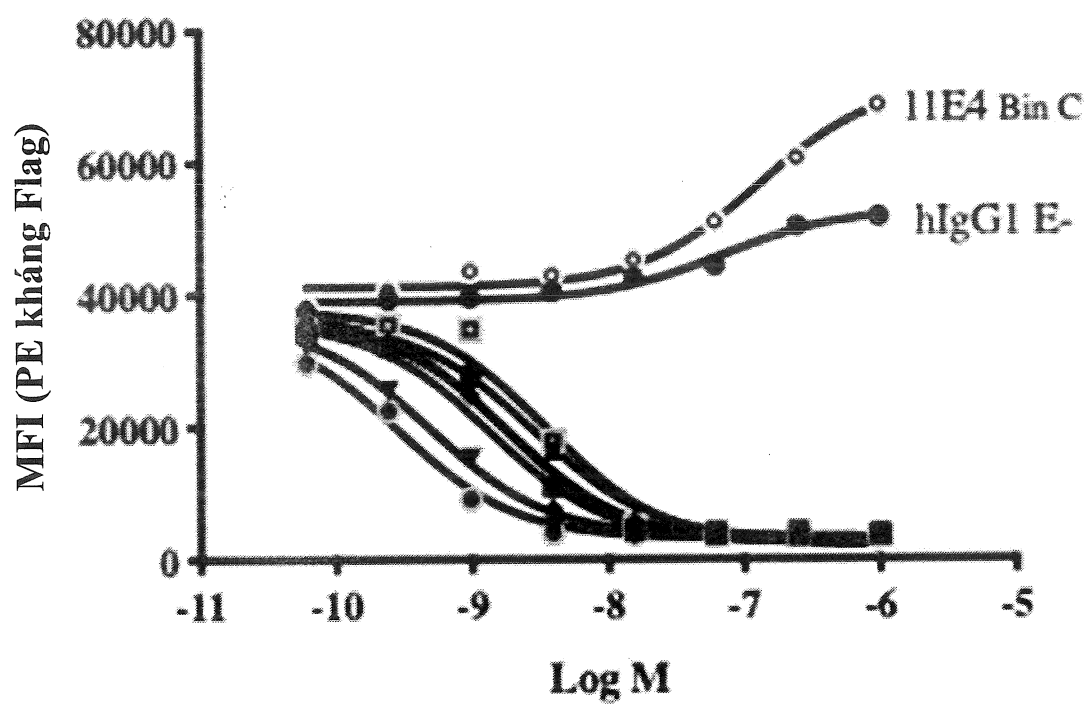


FIG. 4

U937-CD200R1 FACS

thử nghiệm phong bế IgG được làm cho giống với của người của CD200FcFlag 55nM



<i>IC50</i>		
OX108 BinA	2,8nM	■
h22.1 BinA	1,8nM	▲
h10F6 BinA	0,28nM	●
h9B8 BinB	0,5nM	◆
h5D1 BinB	1,3nM	◆
h10A2 BinB	1,6nM	◆
h1F3 BinB	3,5nM	■

FIG. 5A

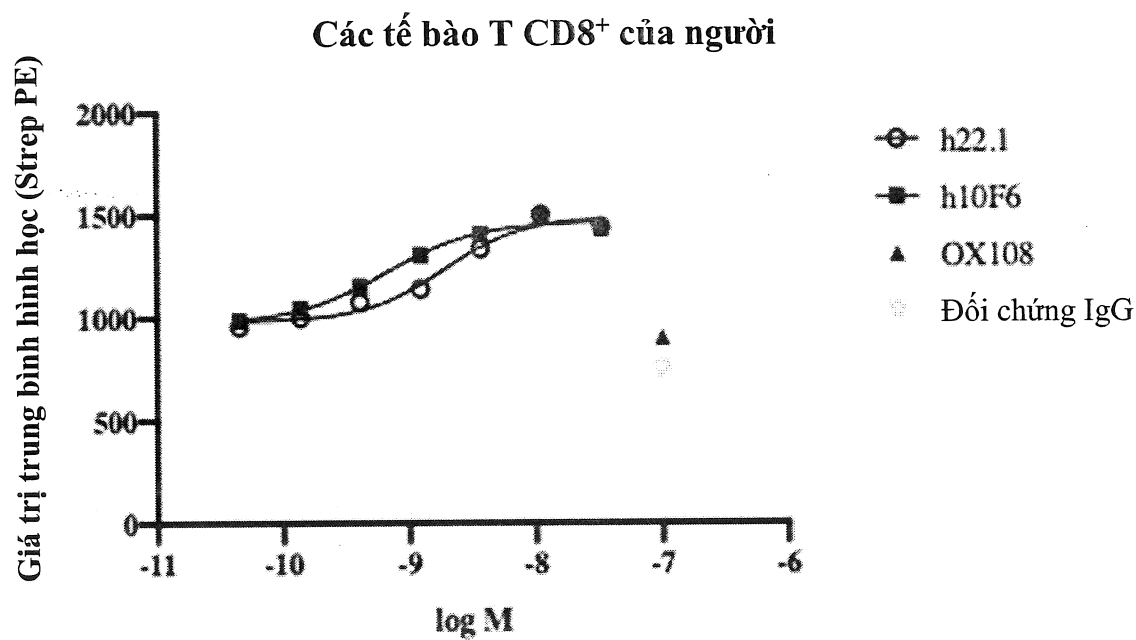
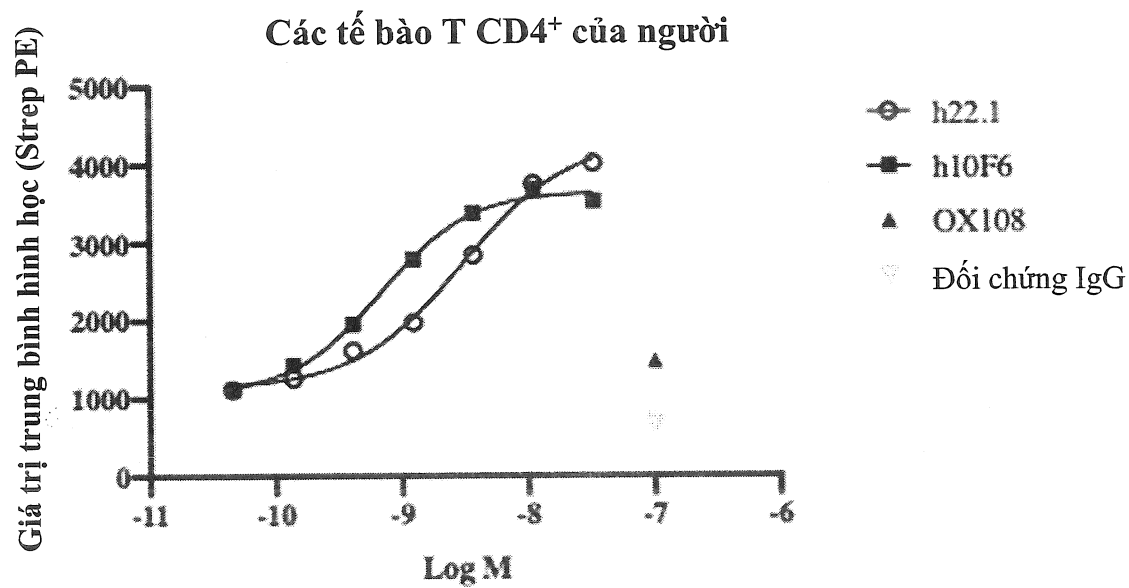


FIG. 5B

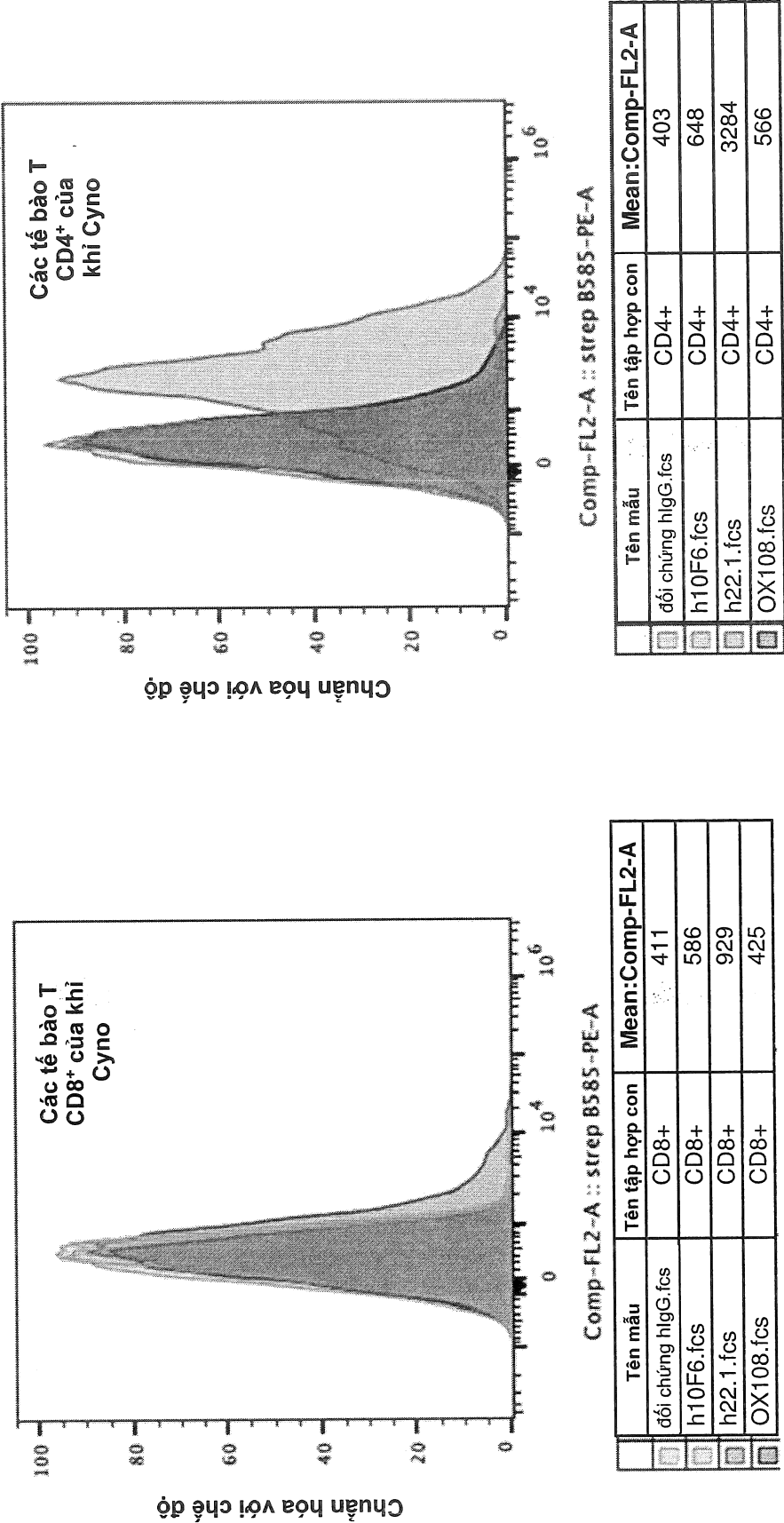


FIG. 6

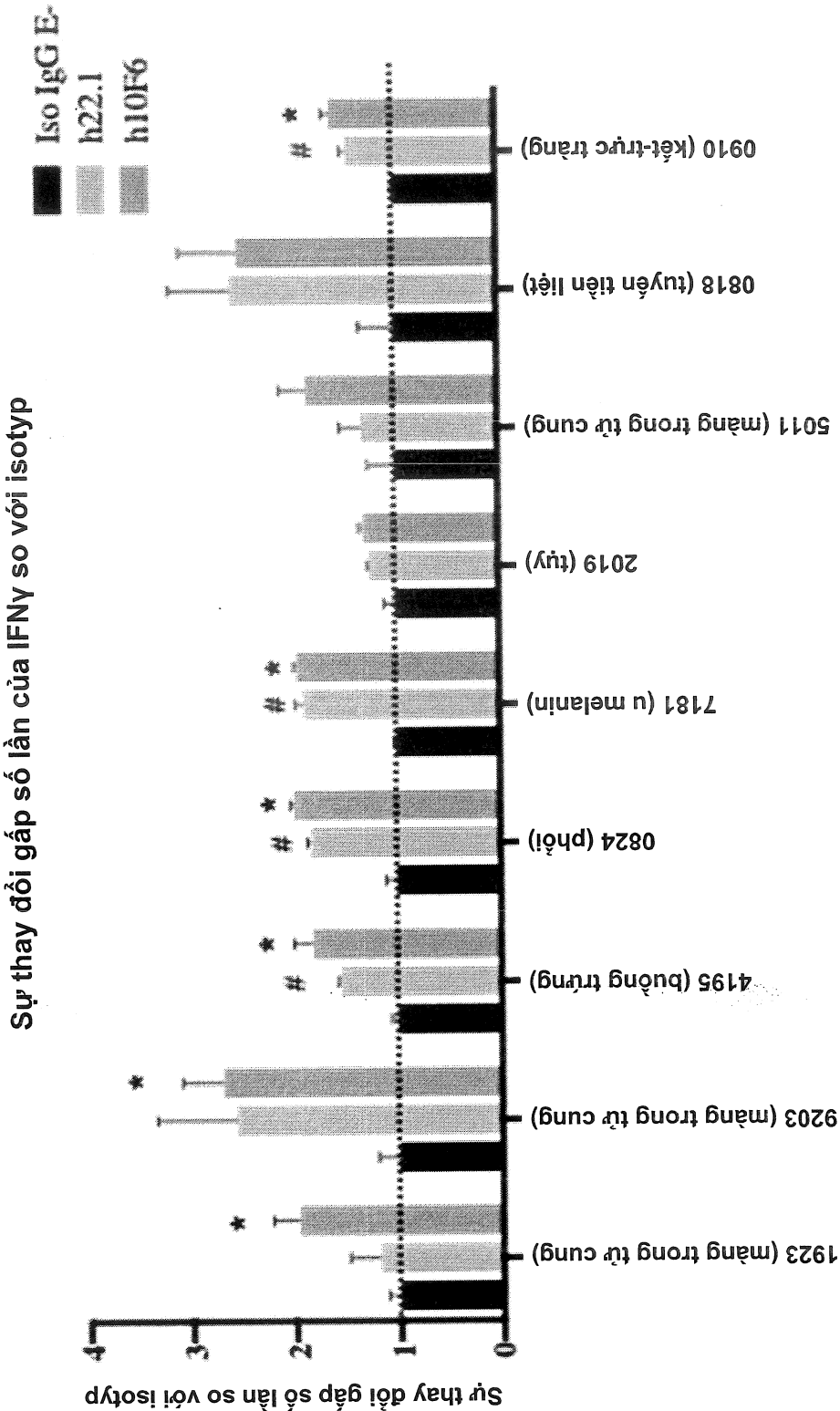


FIG. 7A

Người cho 203

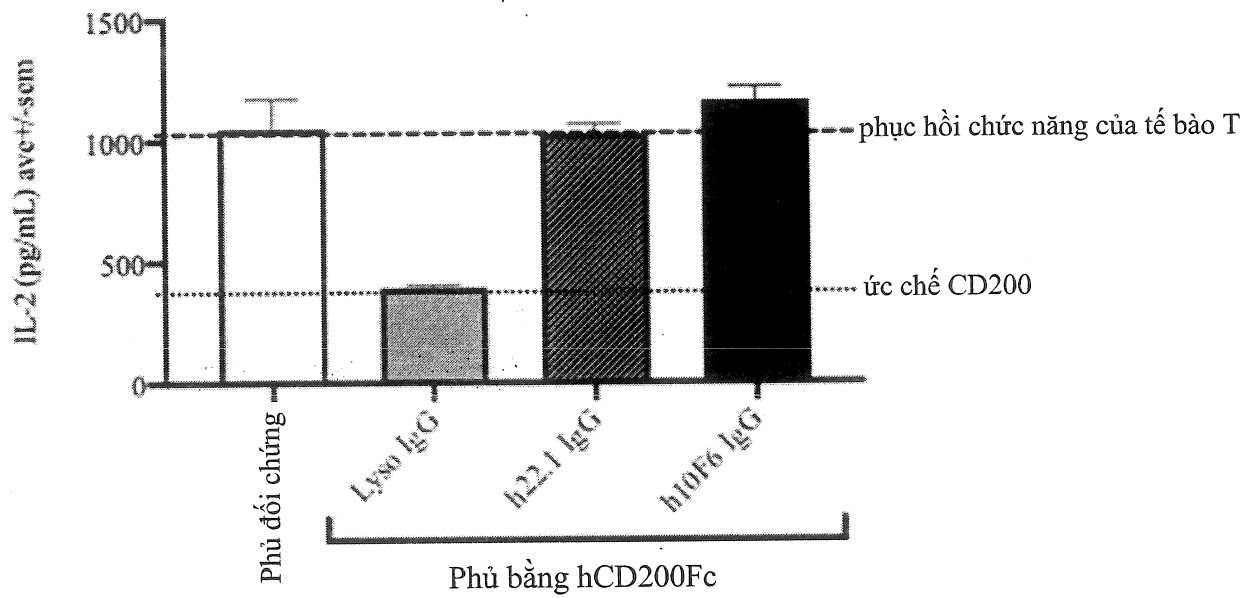
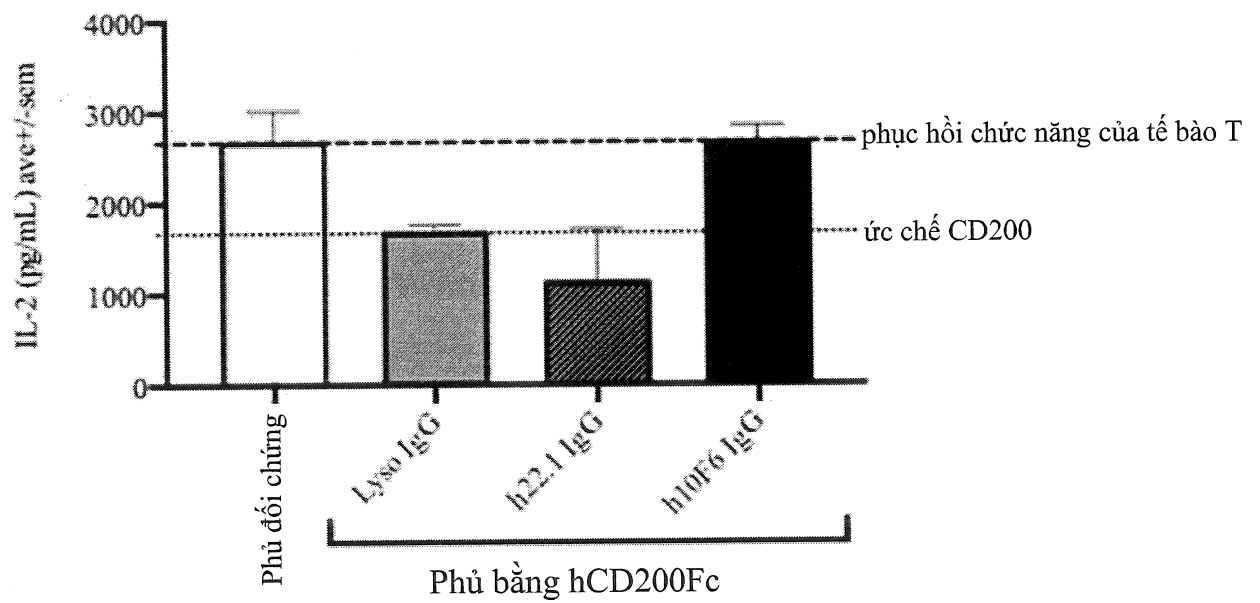


FIG. 7B

Người cho 538



Người cho 203

FIG. 7C

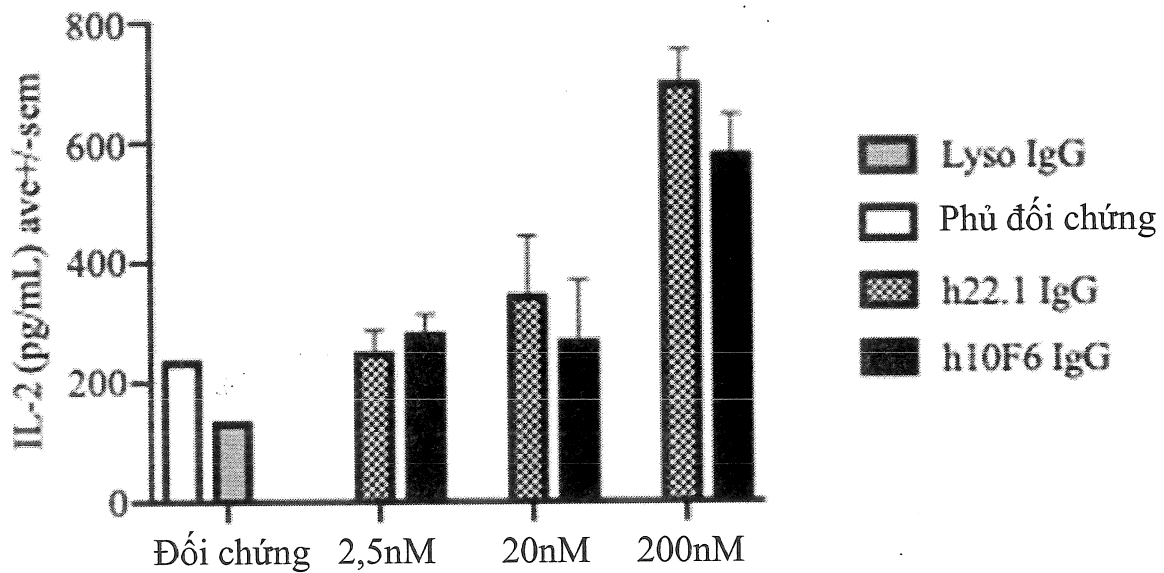


FIG. 7D

Người cho 124

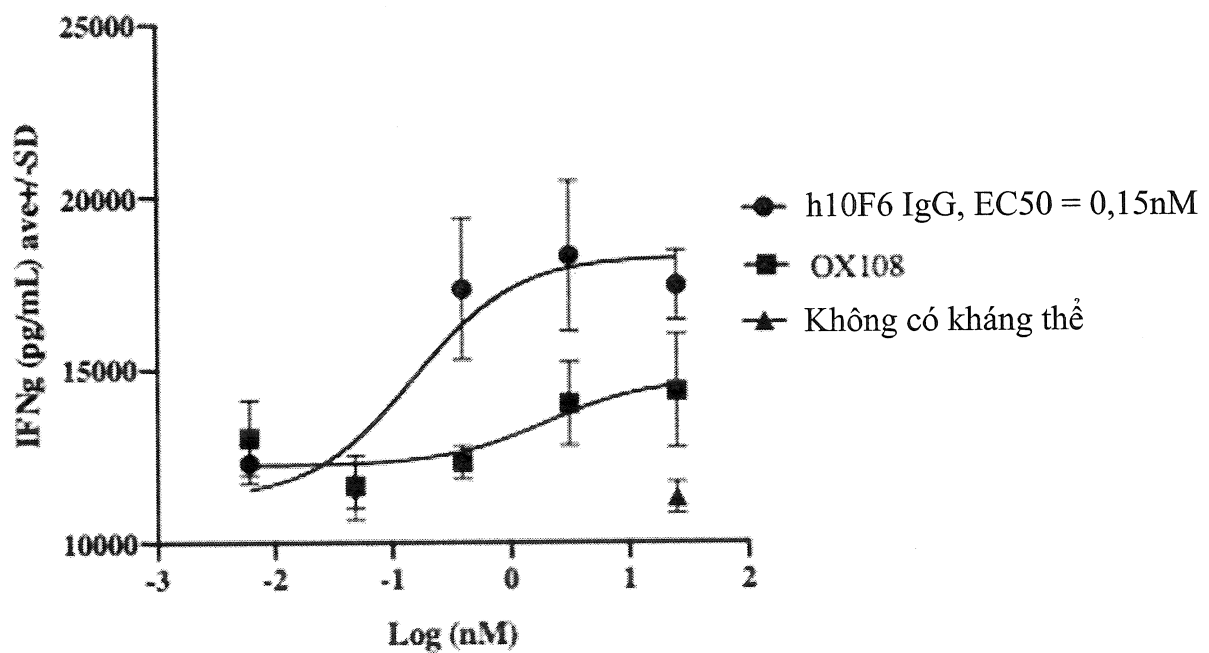


FIG. 8A

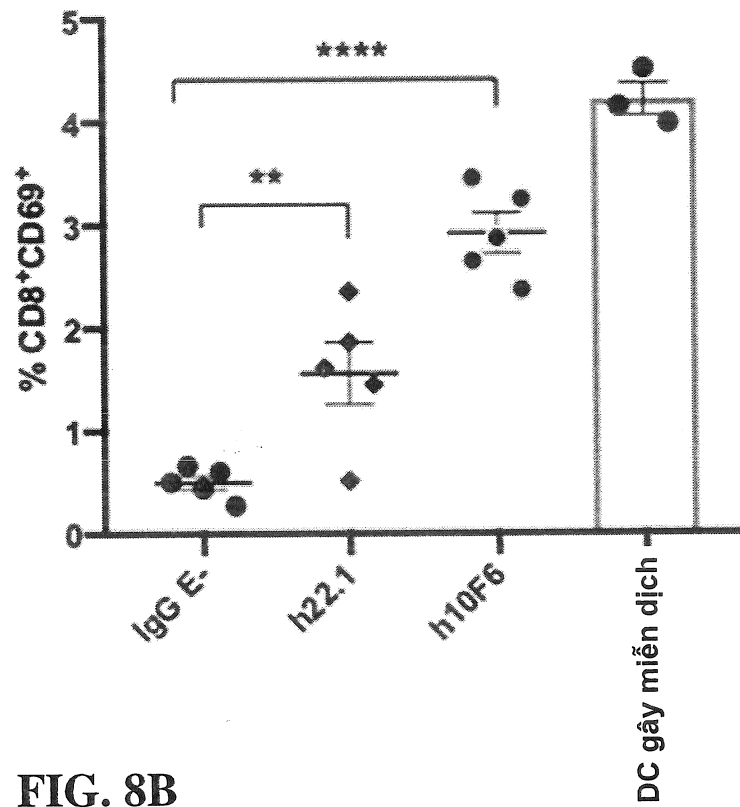


FIG. 8B

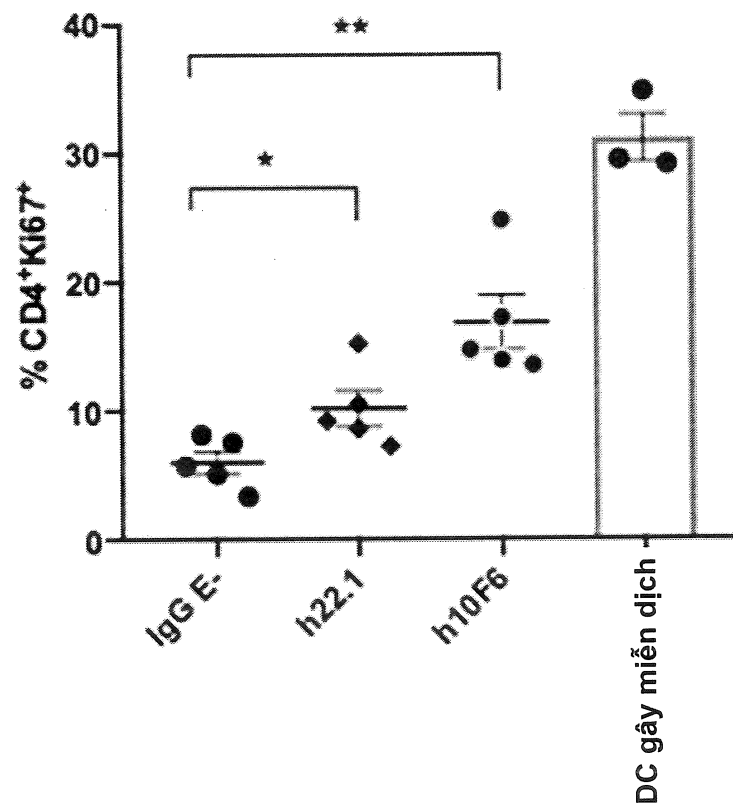


FIG. 8C

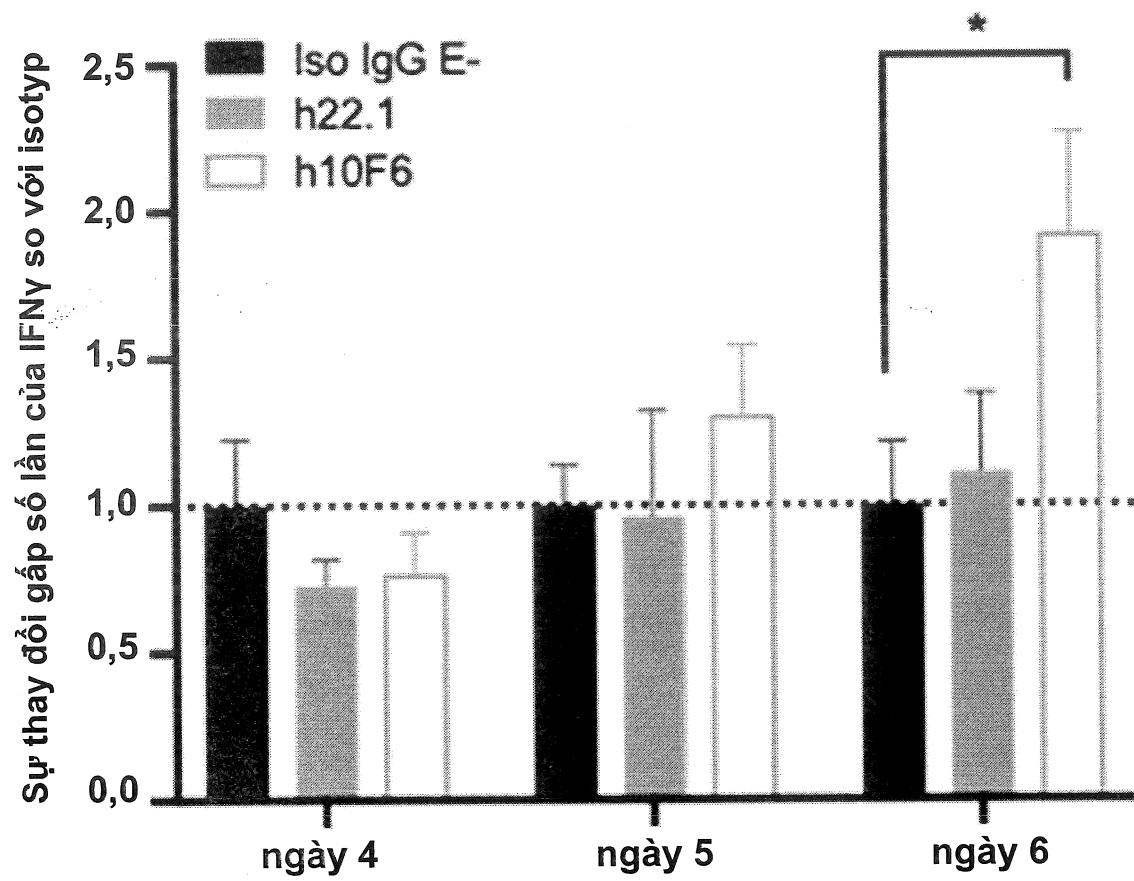


FIG. 9

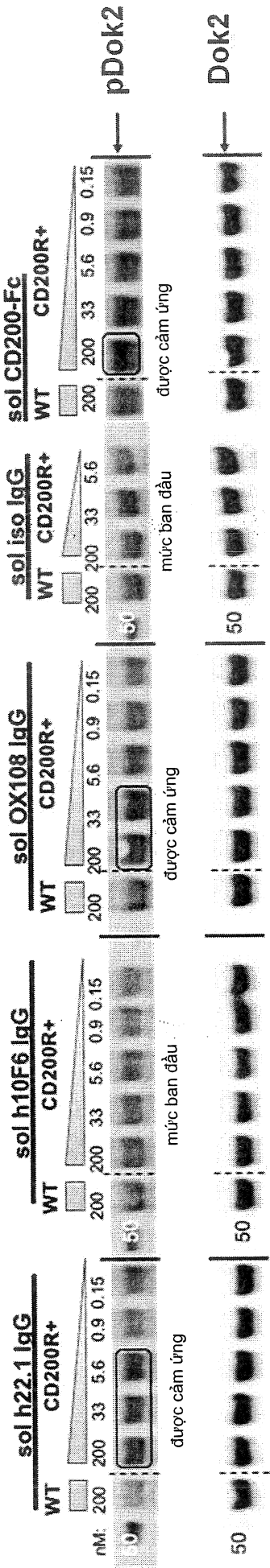


FIG. 10A

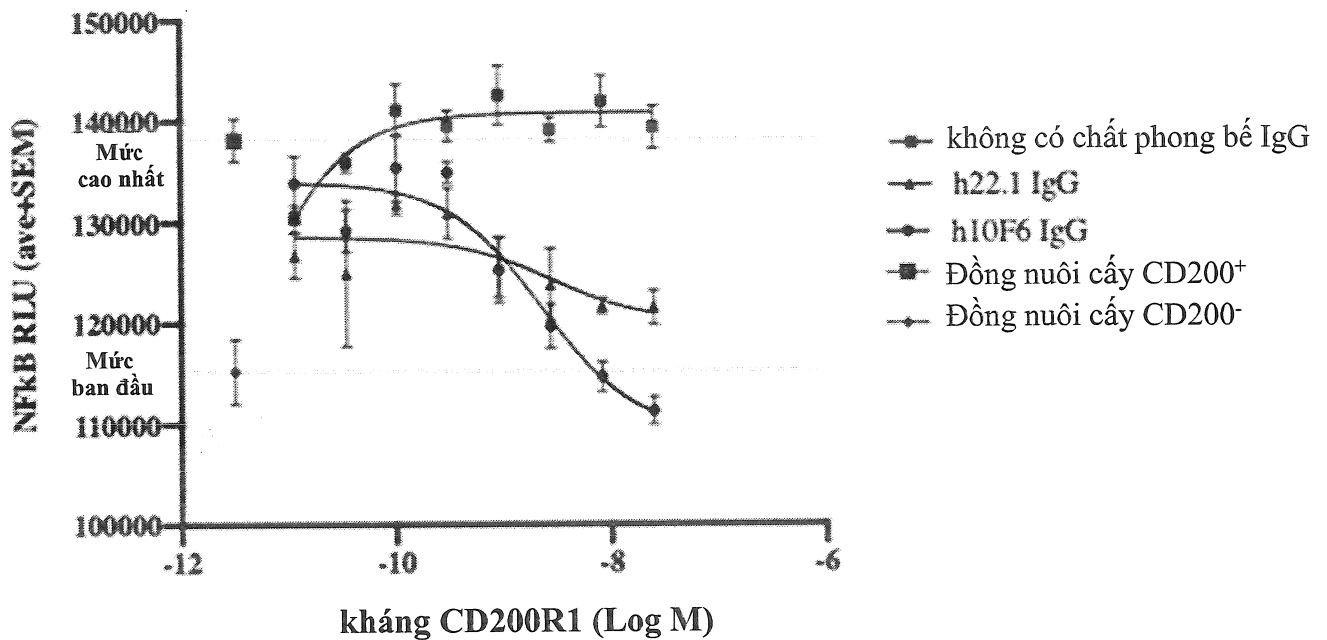


FIG. 10B

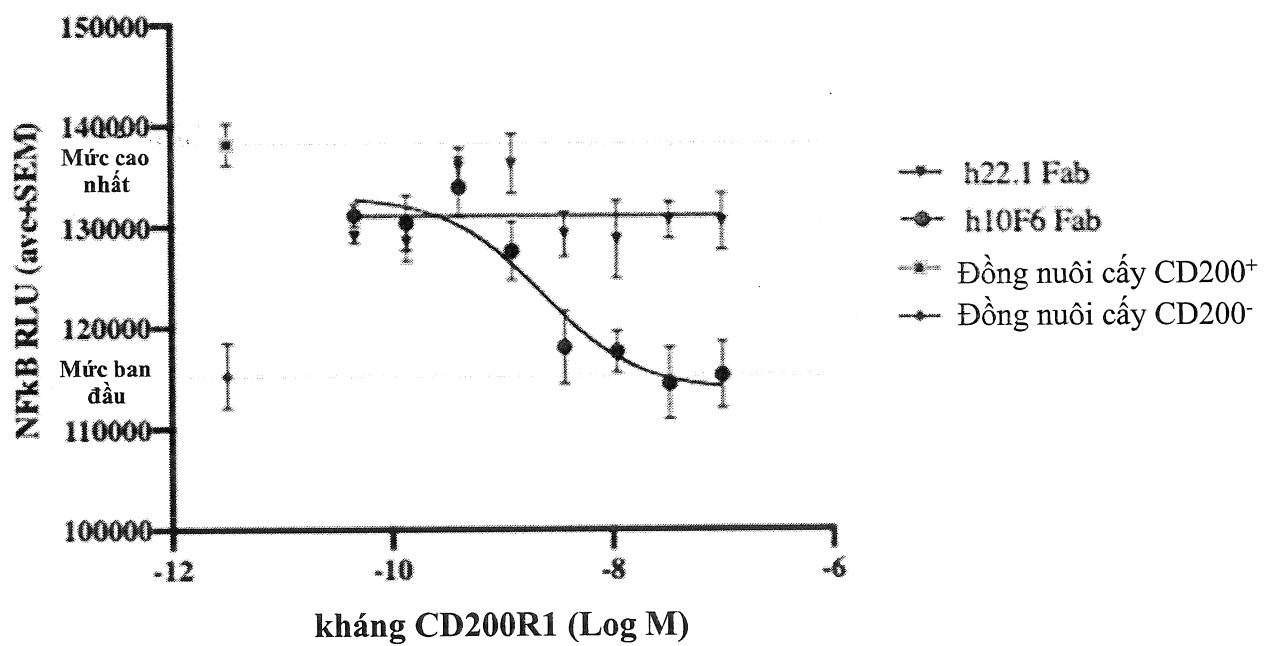
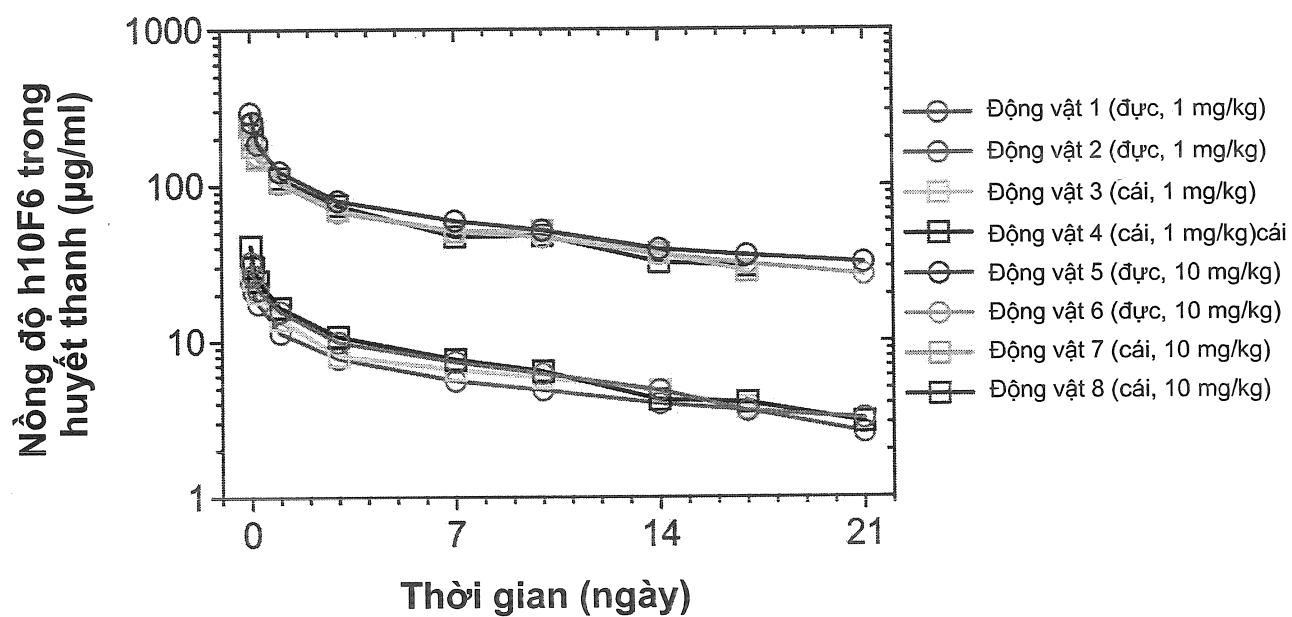


FIG. 11



mAb=22.1

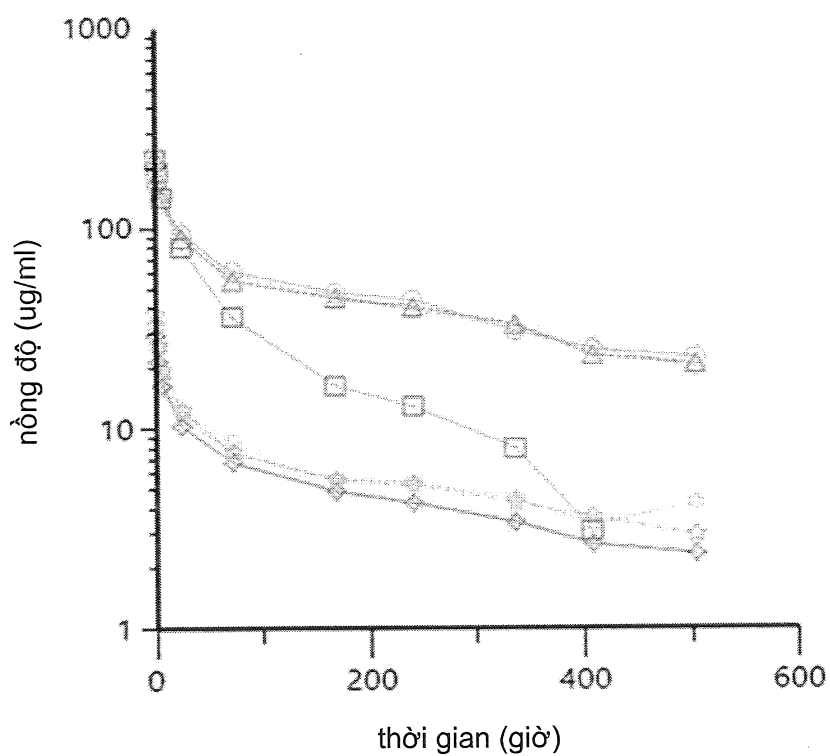
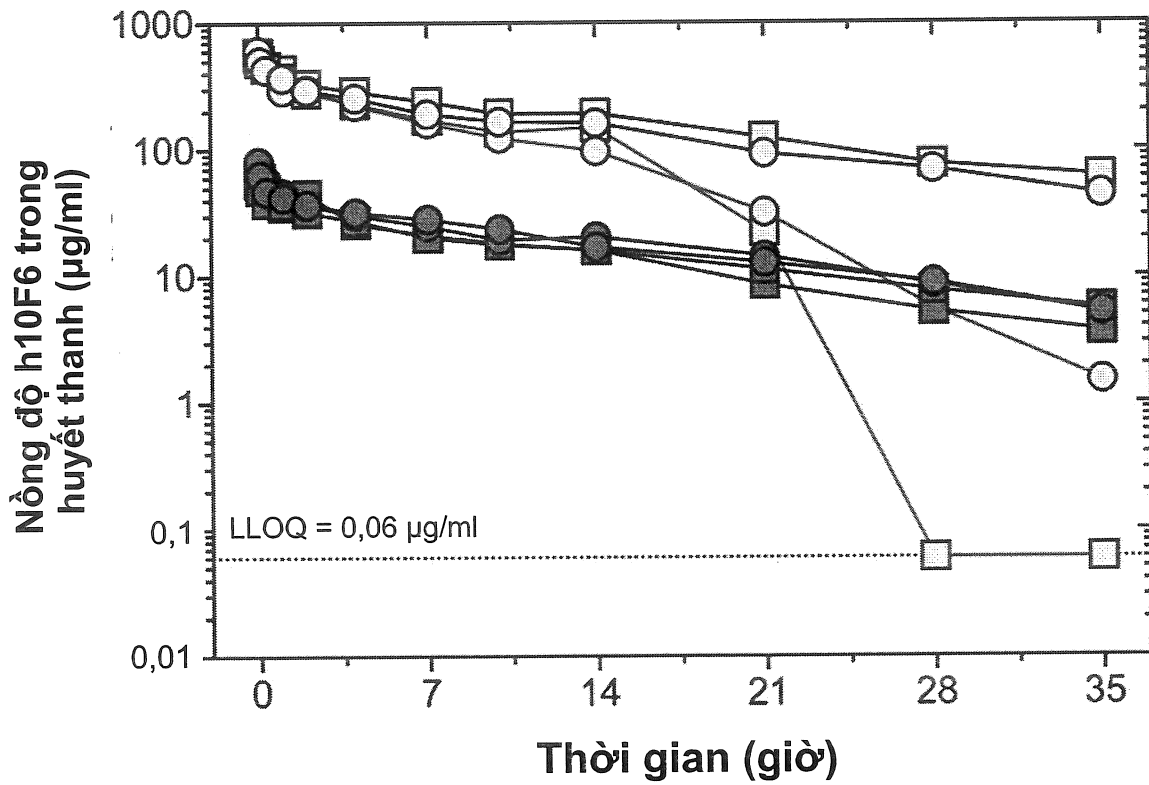


FIG. 12



- 20 mg/kg, đực
- 20 mg/kg, cái
- 2 mg/kg, đực
- 2 mg/kg, cái

FIG. 13A

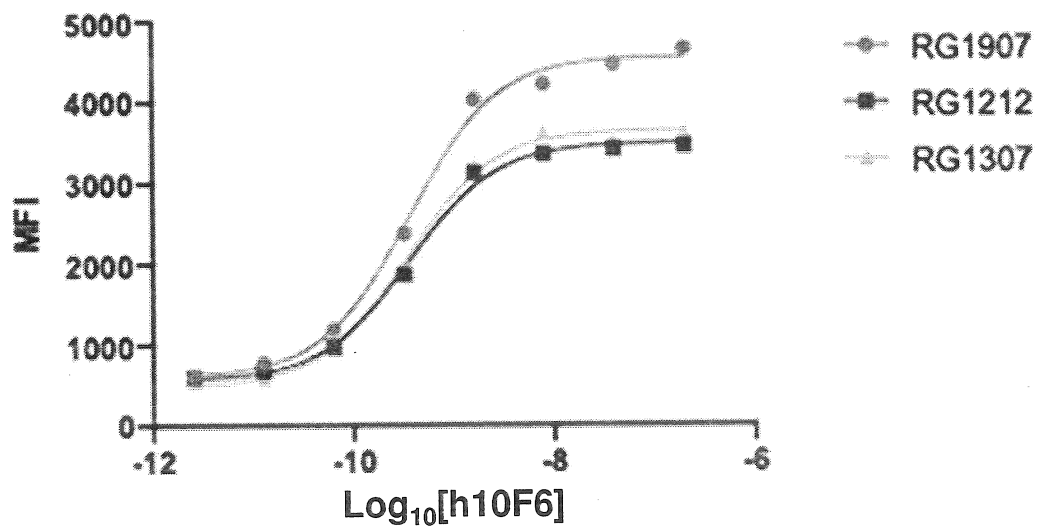
Các tế bào T CD4⁺

FIG. 13B

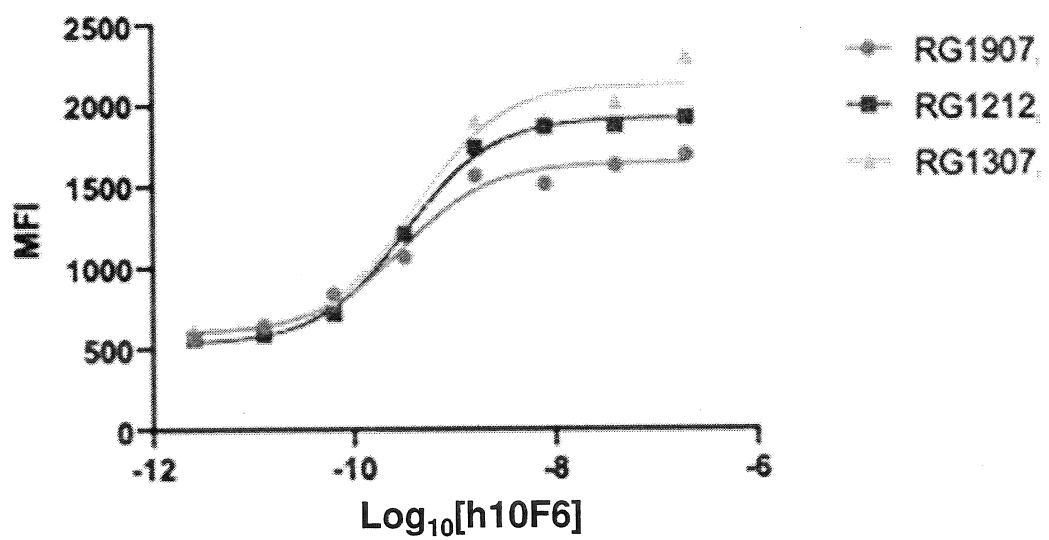
Các tế bào T CD8⁺

FIG. 14

MoDC

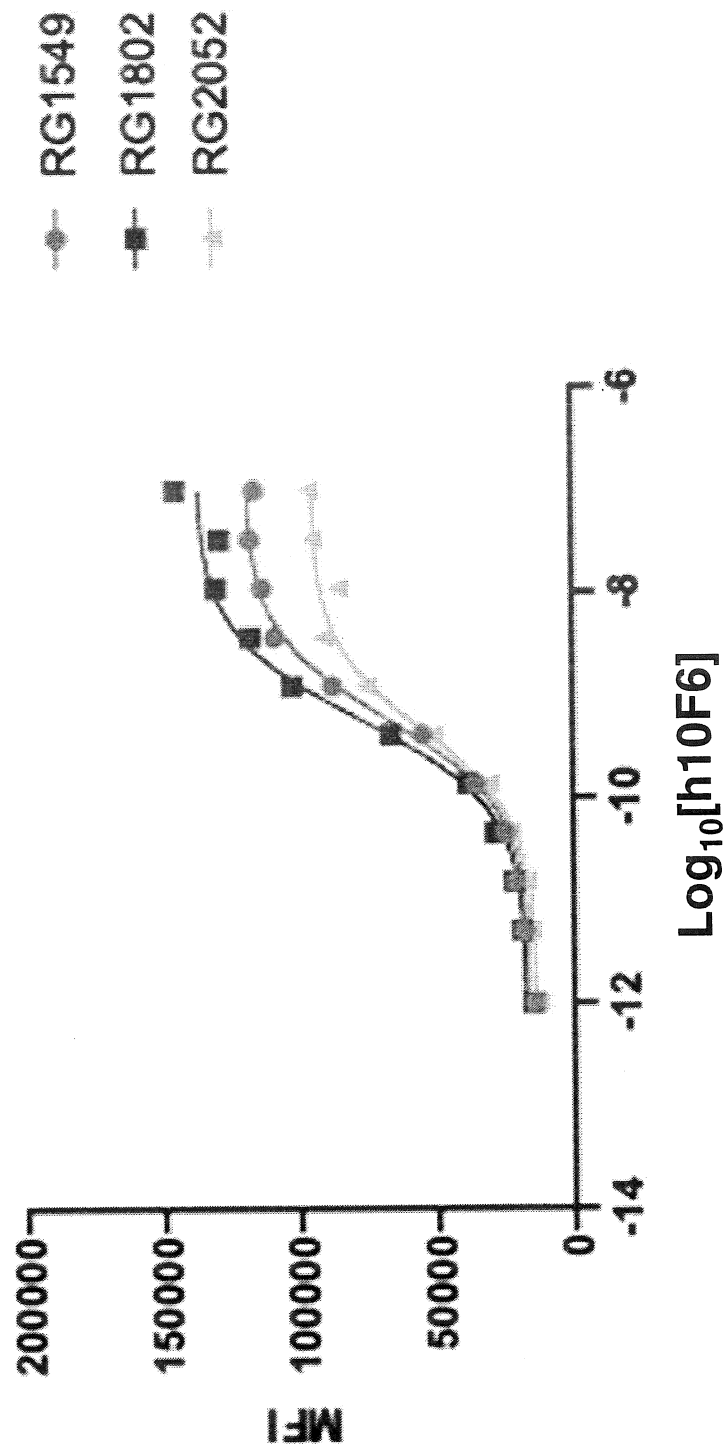


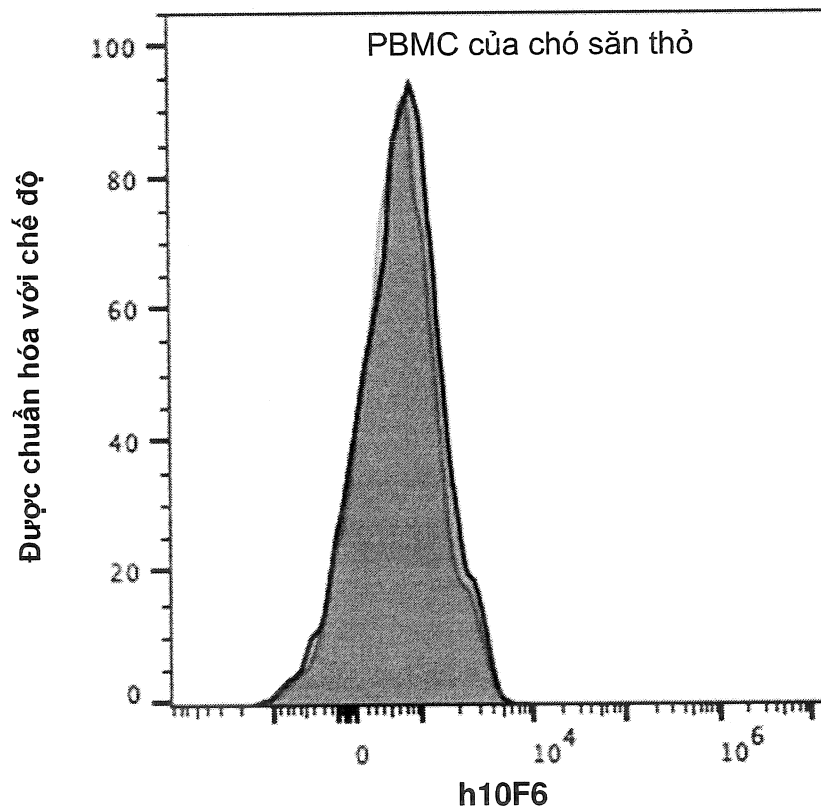
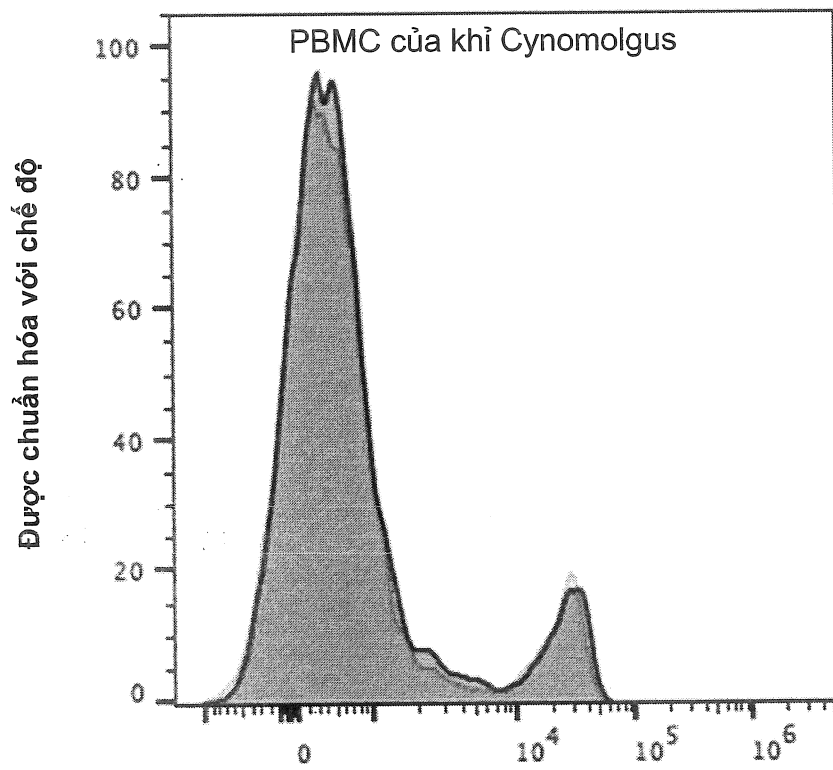
FIG. 15

FIG. 15

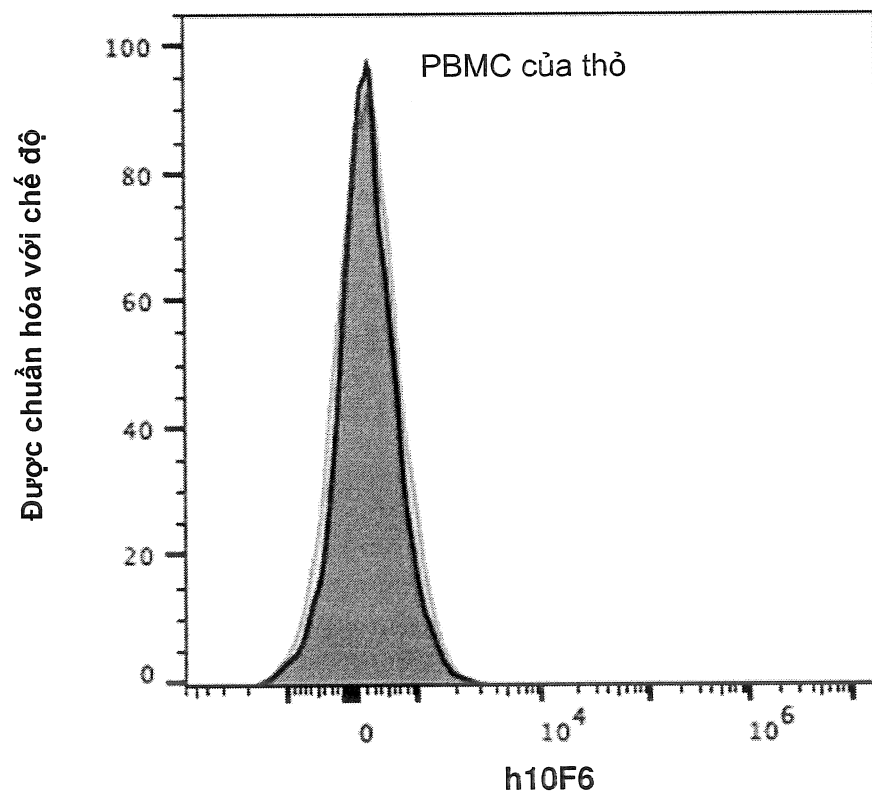
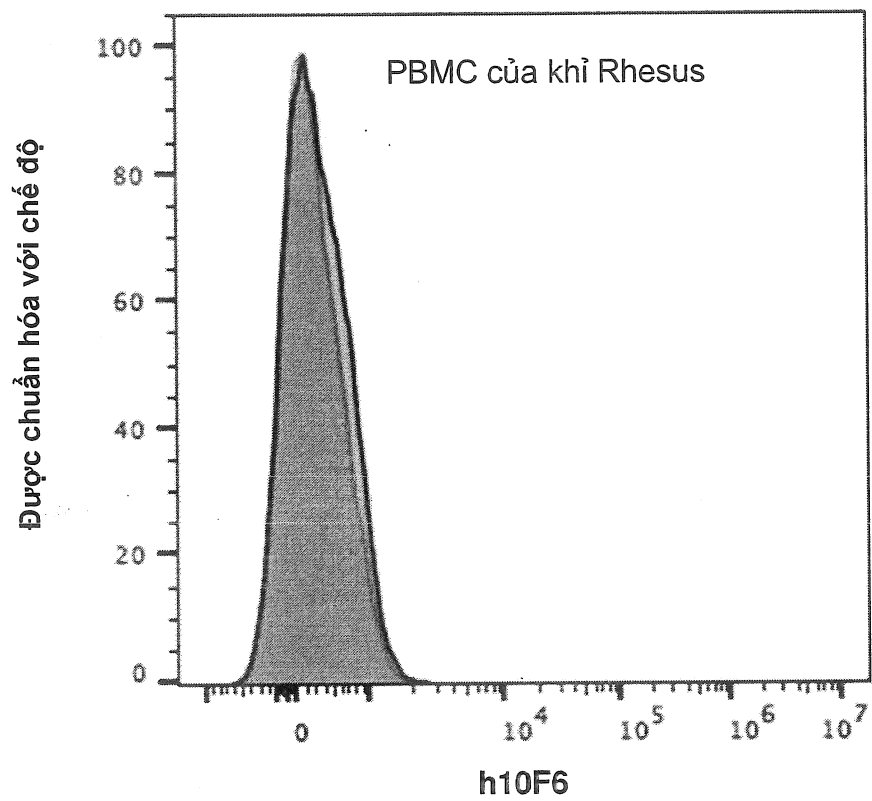


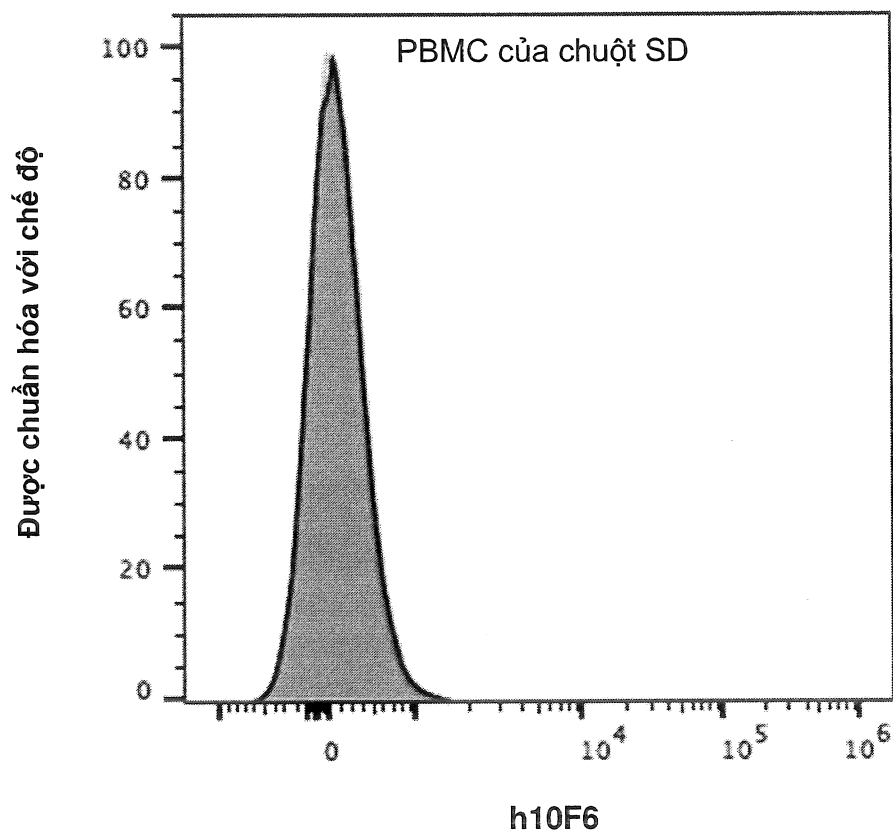
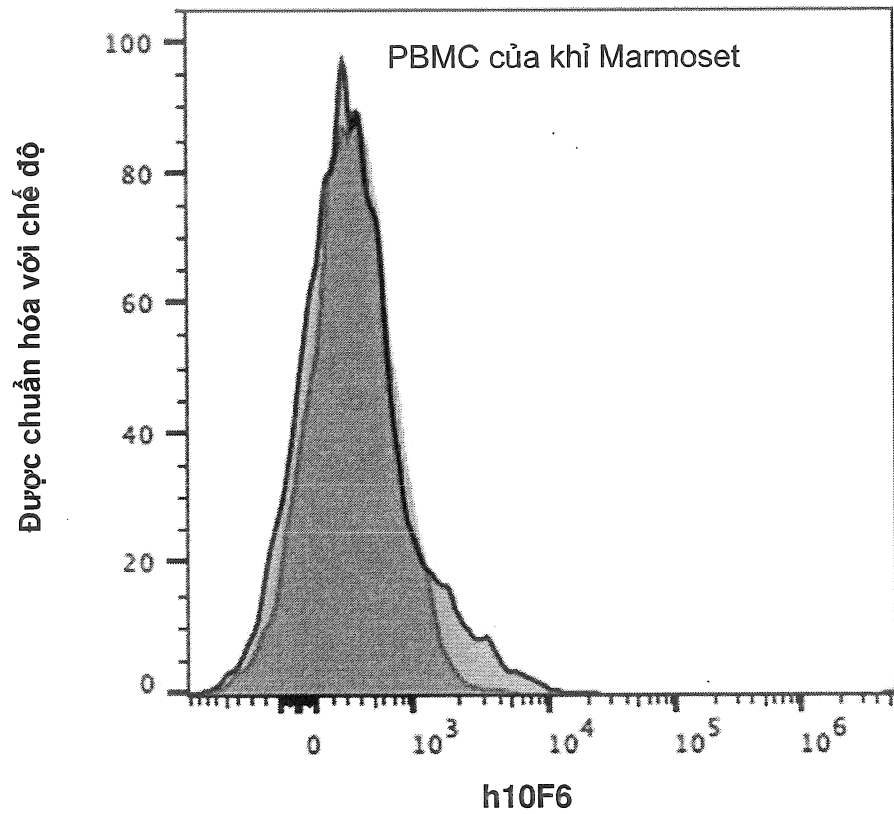
FIG. 15

FIG. 16

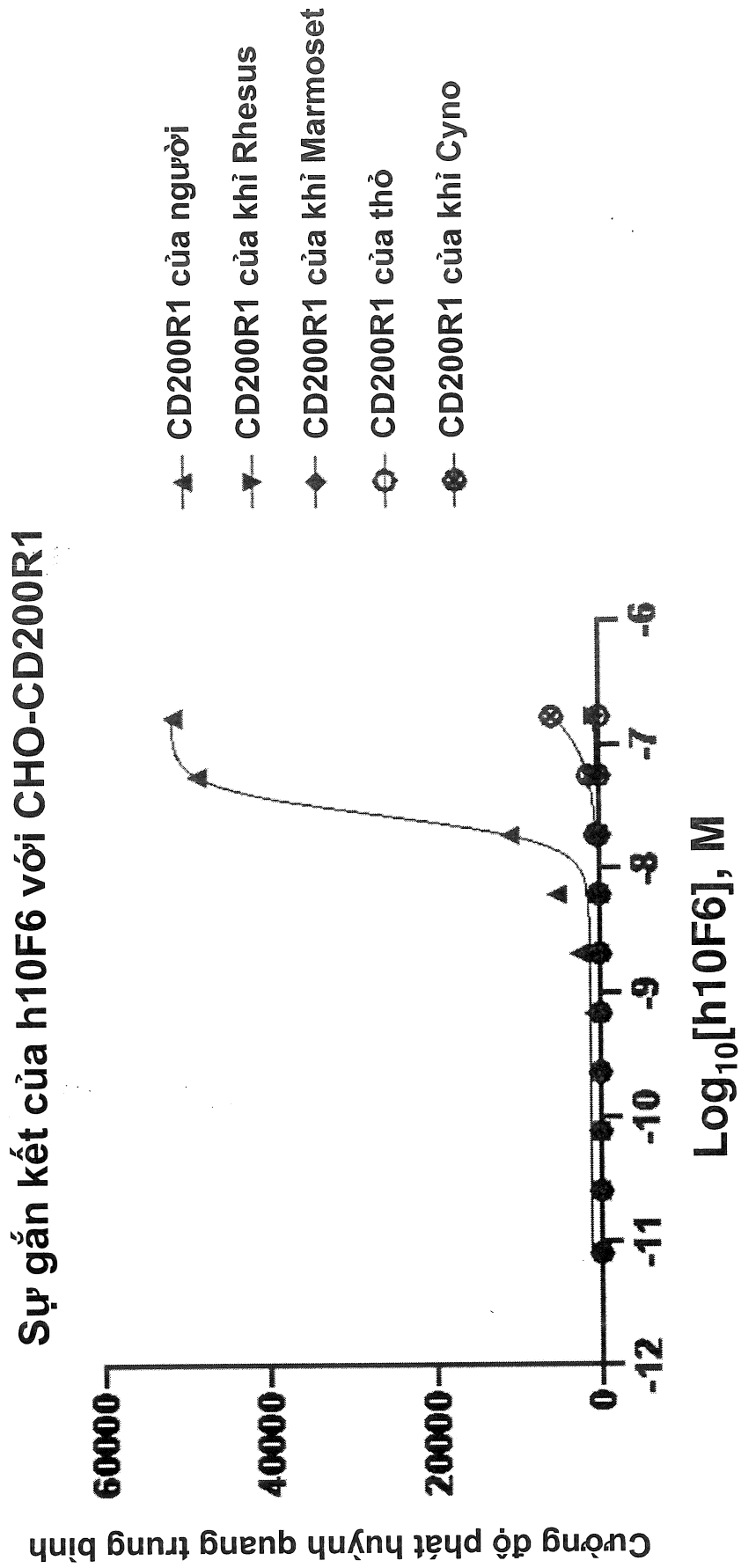


FIG. 17

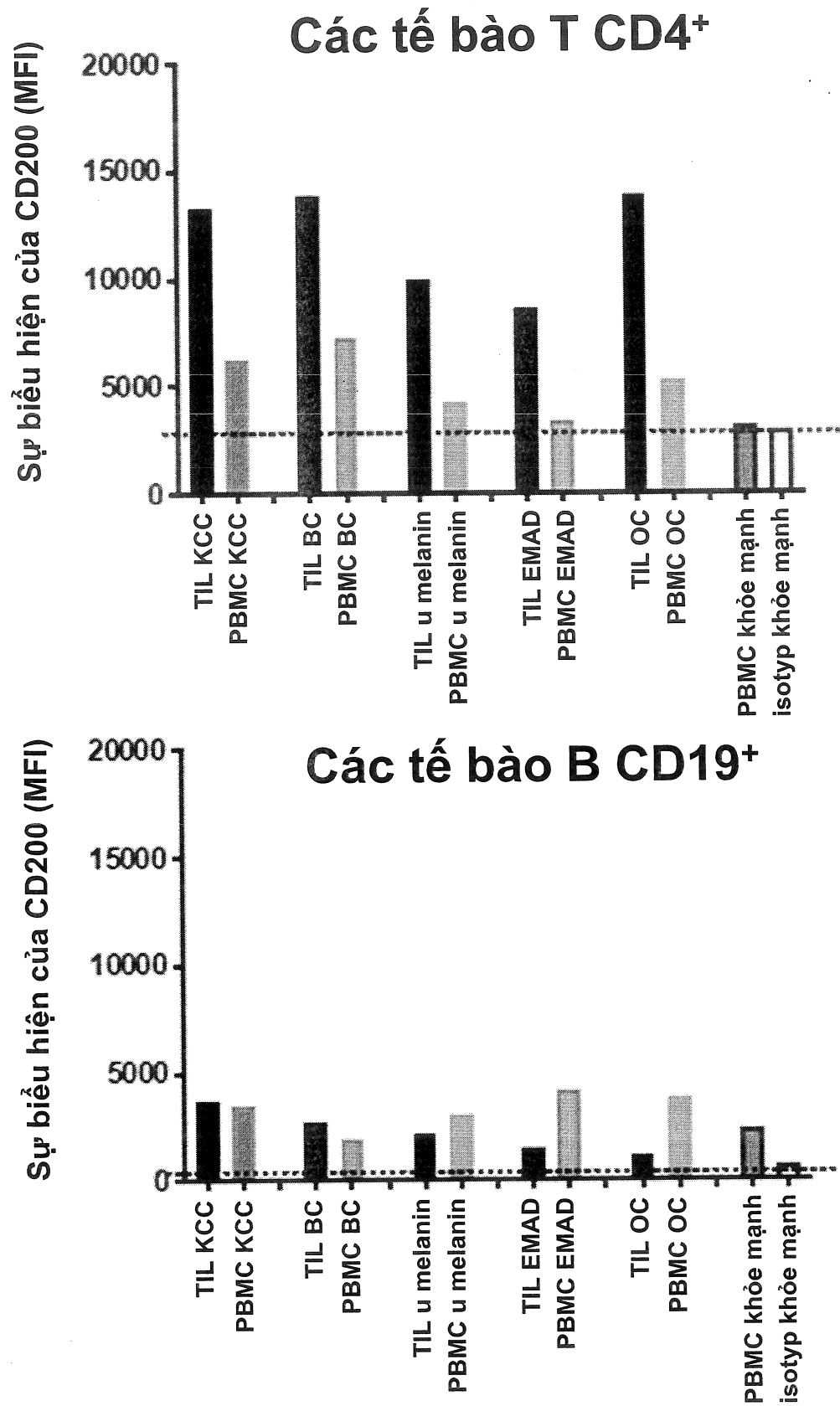


FIG. 17

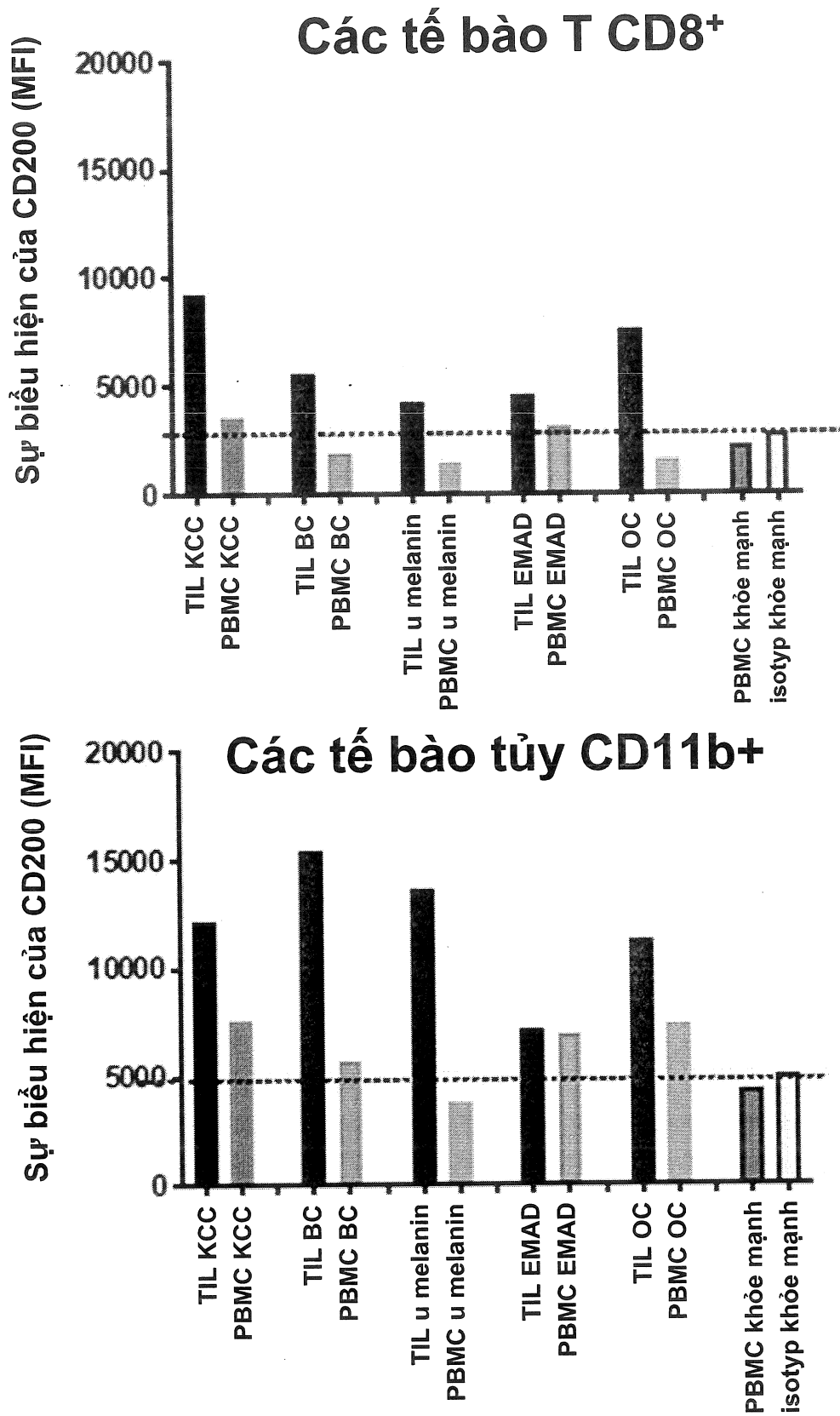


FIG. 18

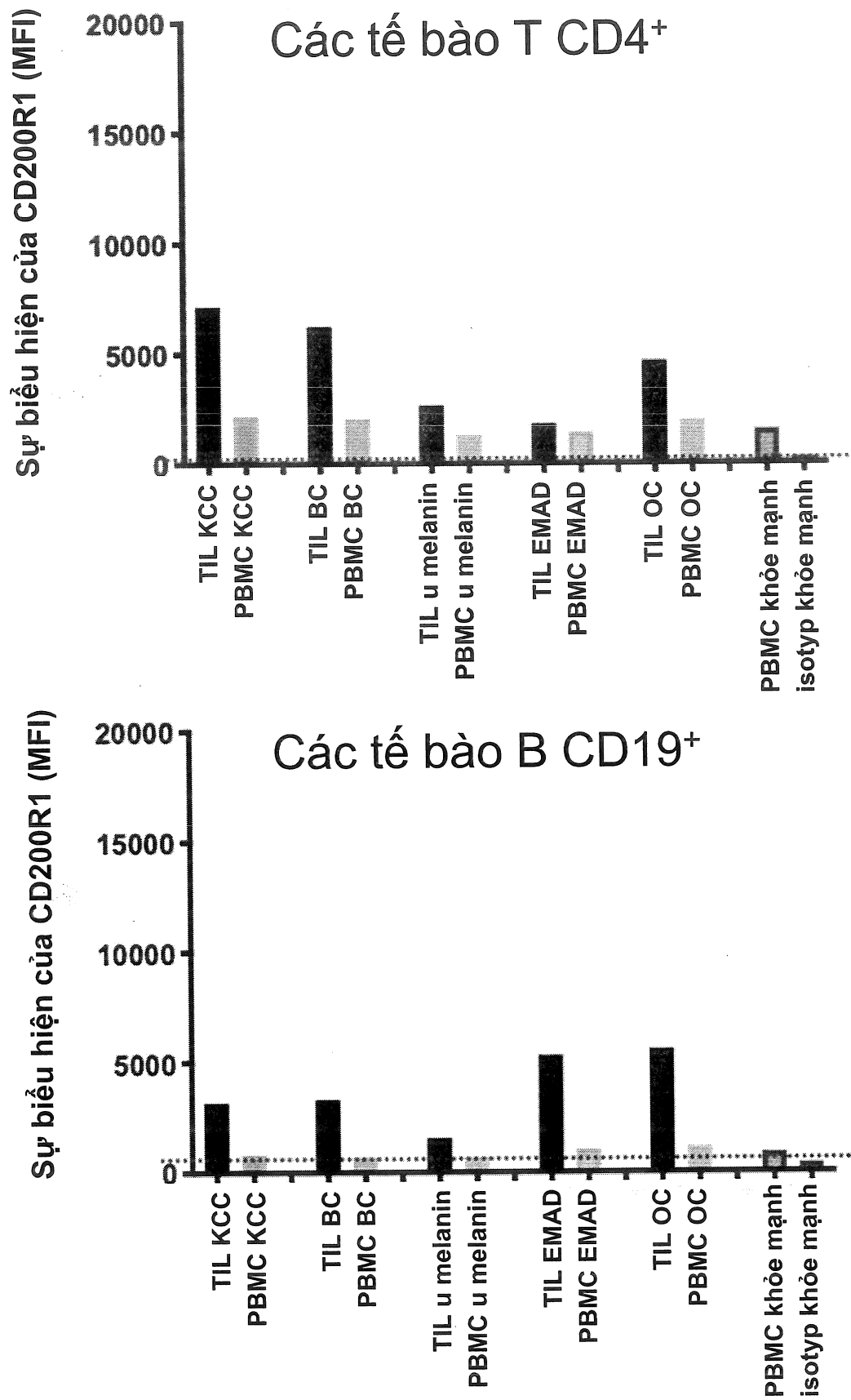


FIG. 18

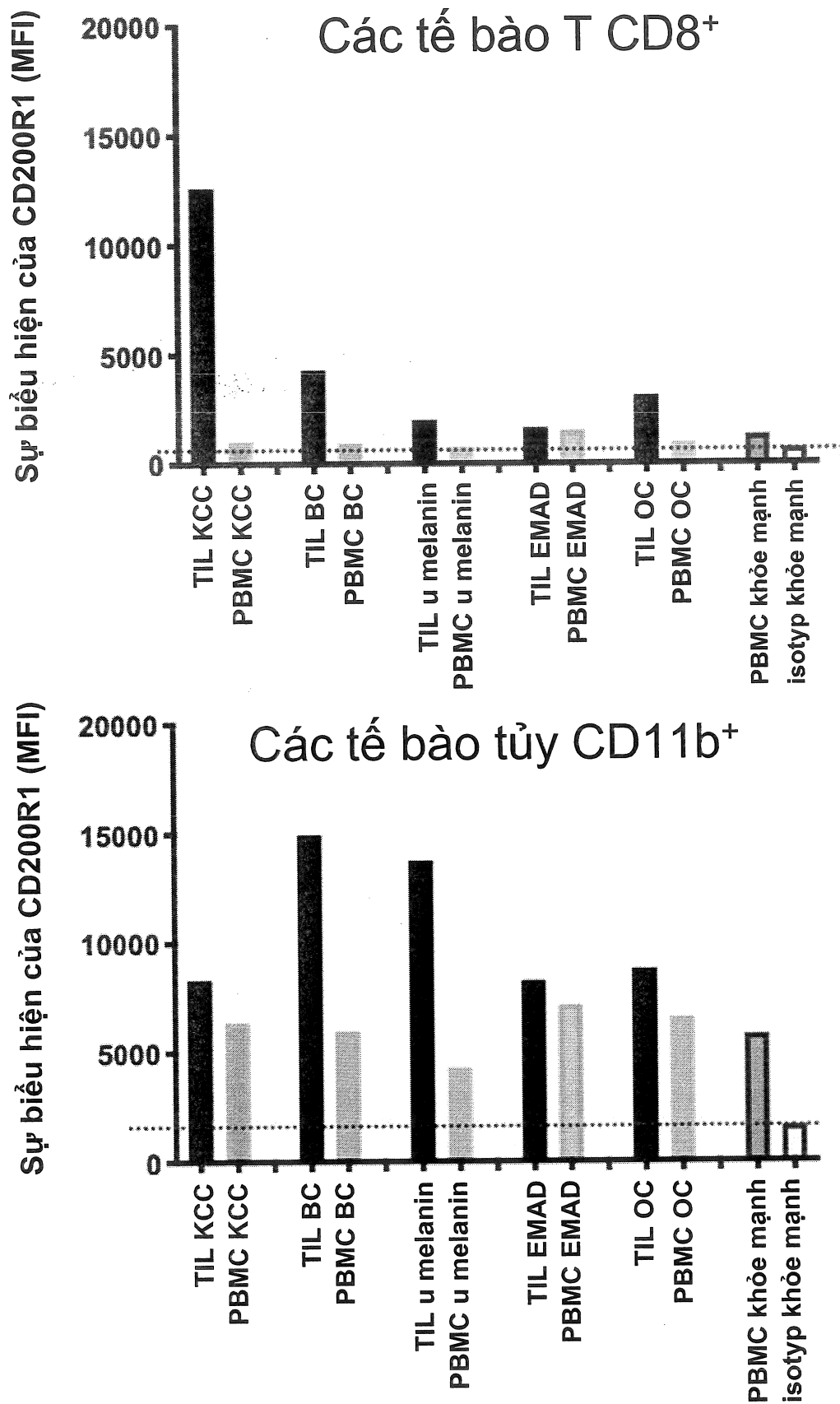
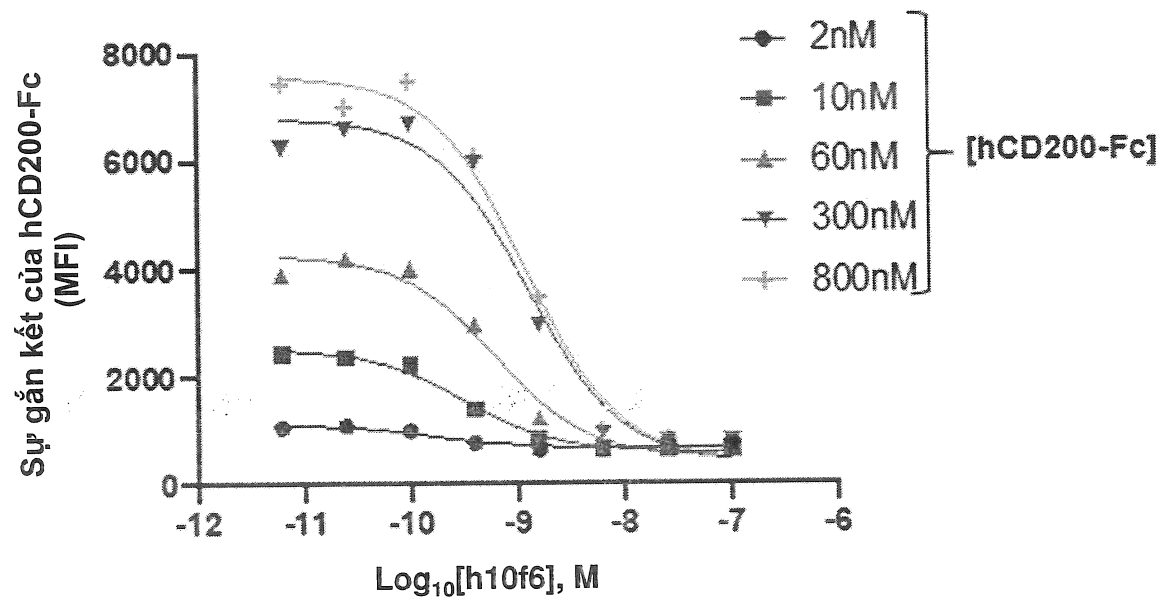


FIG. 19A

Sự dịch chuyển hCD200-Fc được biotinyl hóa bởi h10F6

**FIG. 19B**

Sự gắn kết của h10F6 được biotinyl hóa với hCD200R1 trên các tế bào có hCD200-Fc được gắn kết sơ bộ

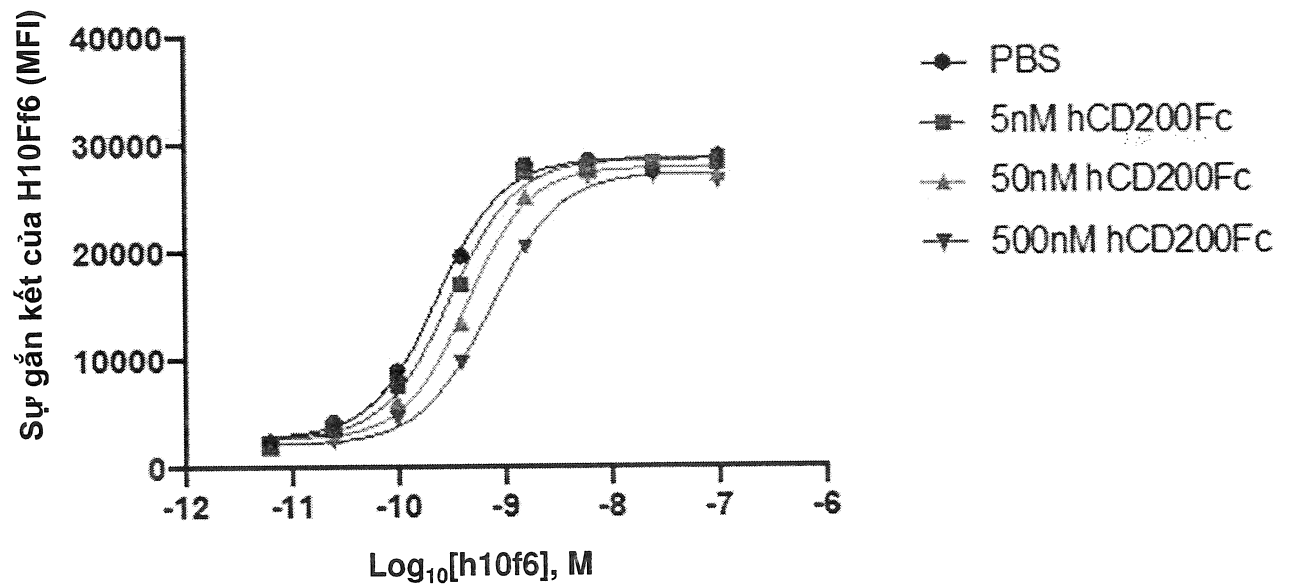


FIG. 20

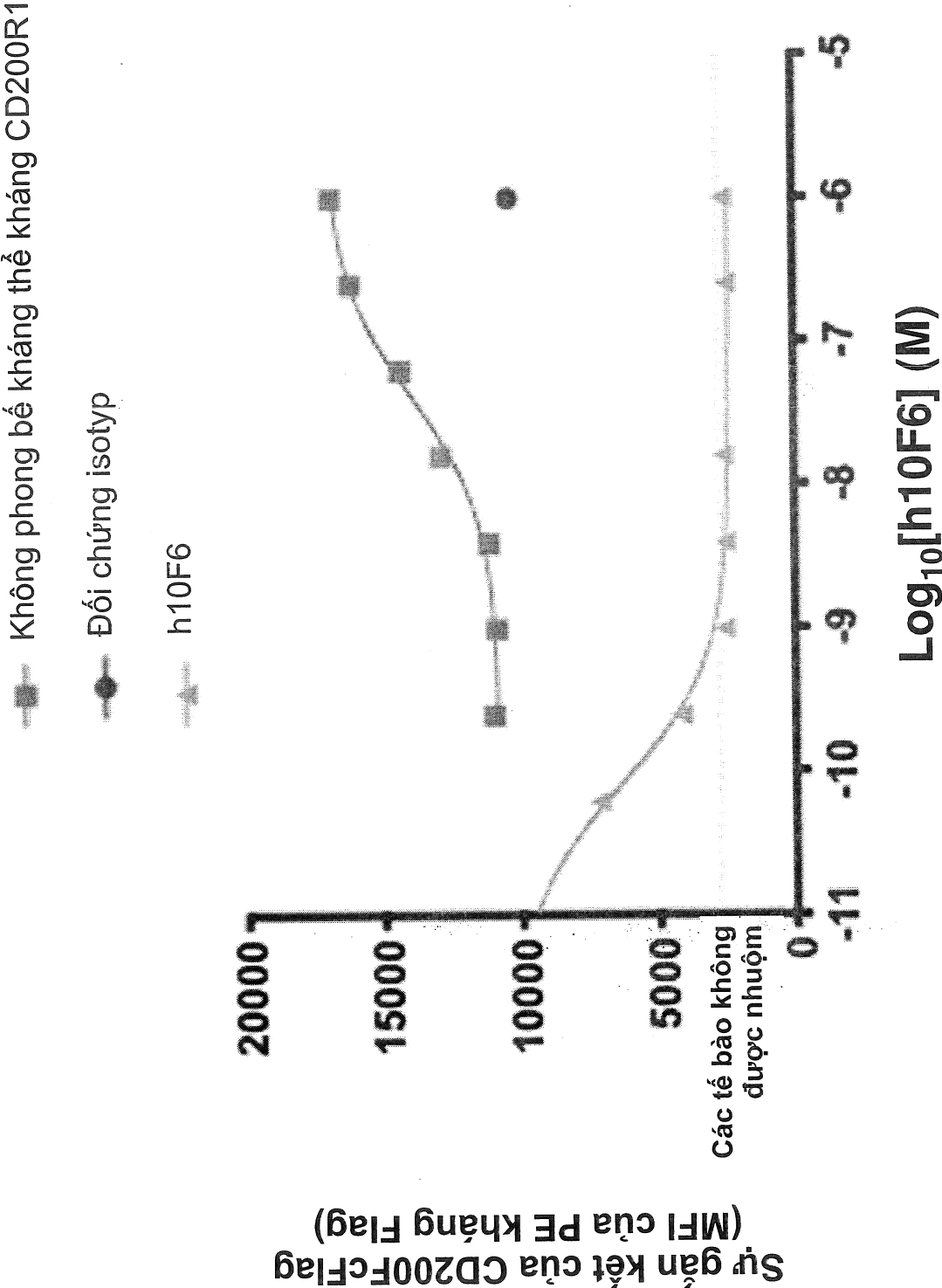


FIG. 21

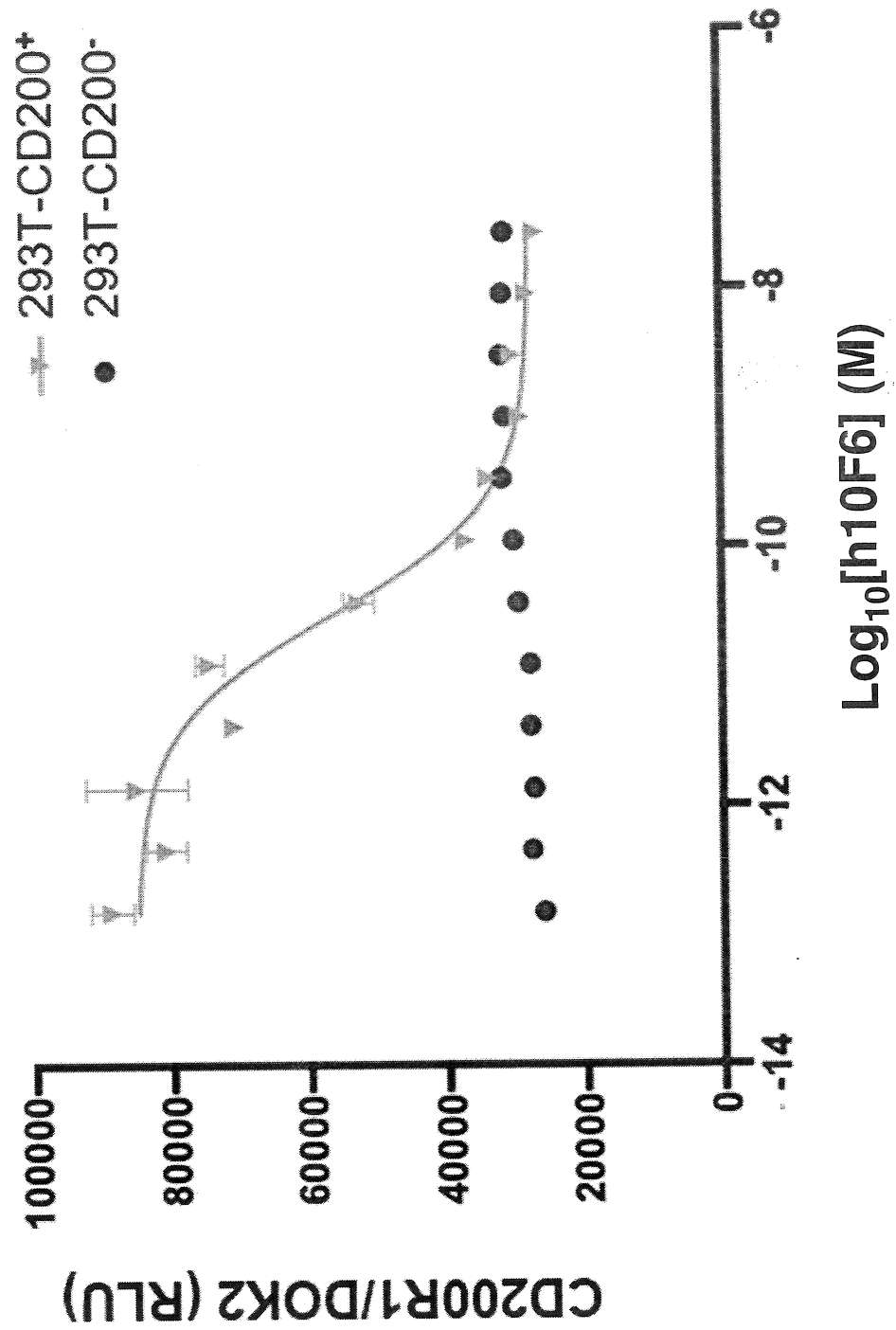


FIG. 22A

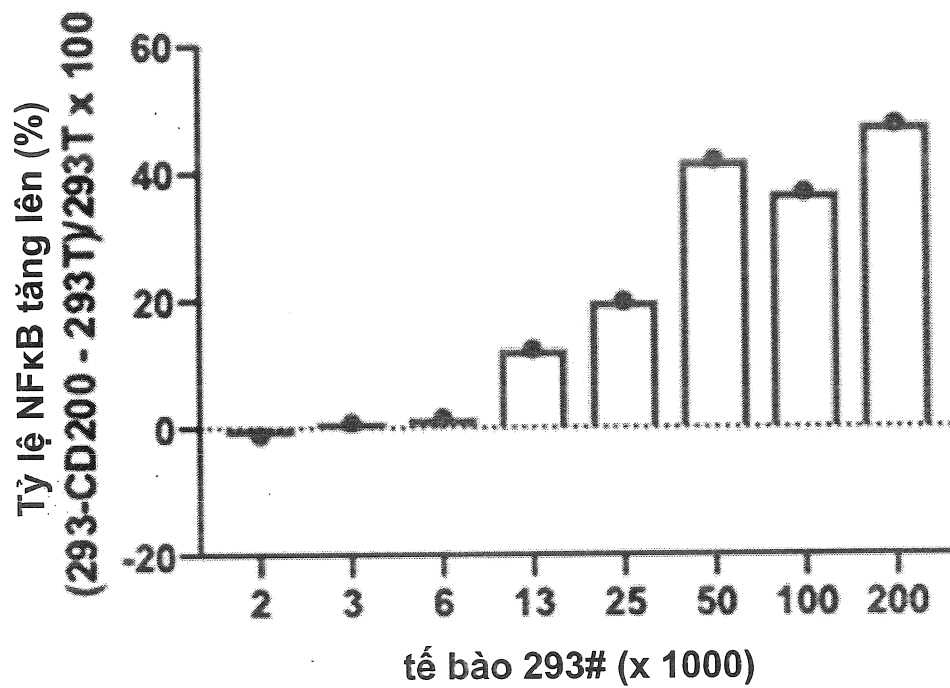


FIG. 22B

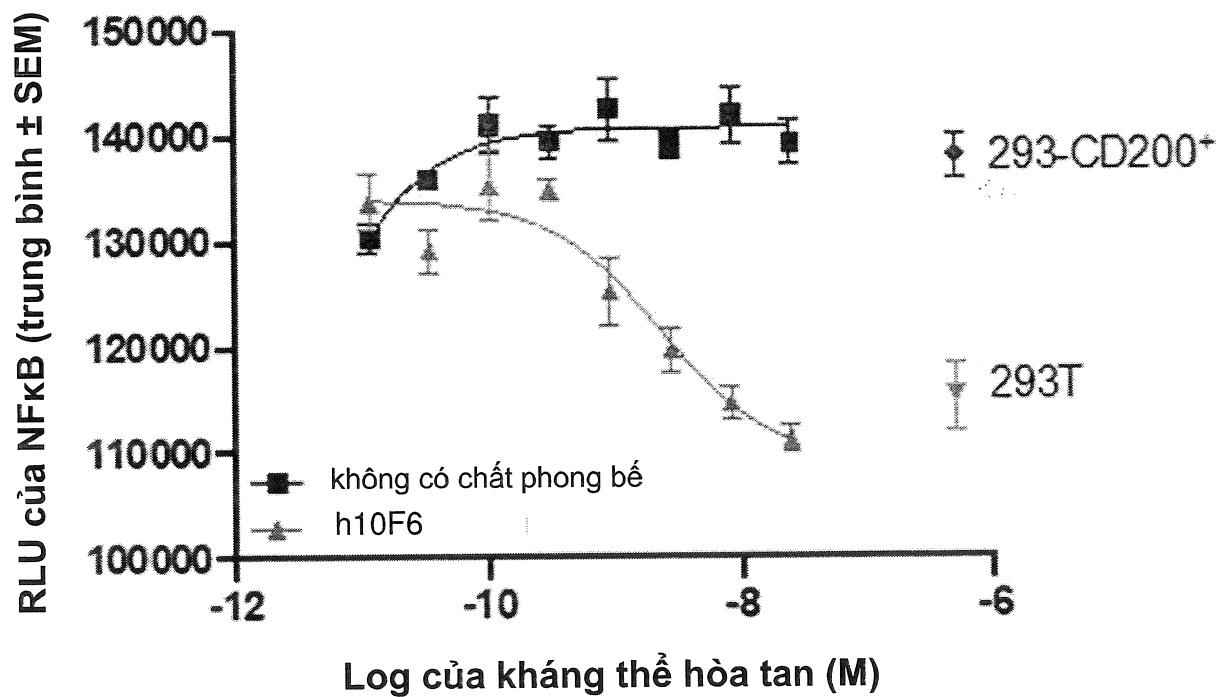


FIG. 23A

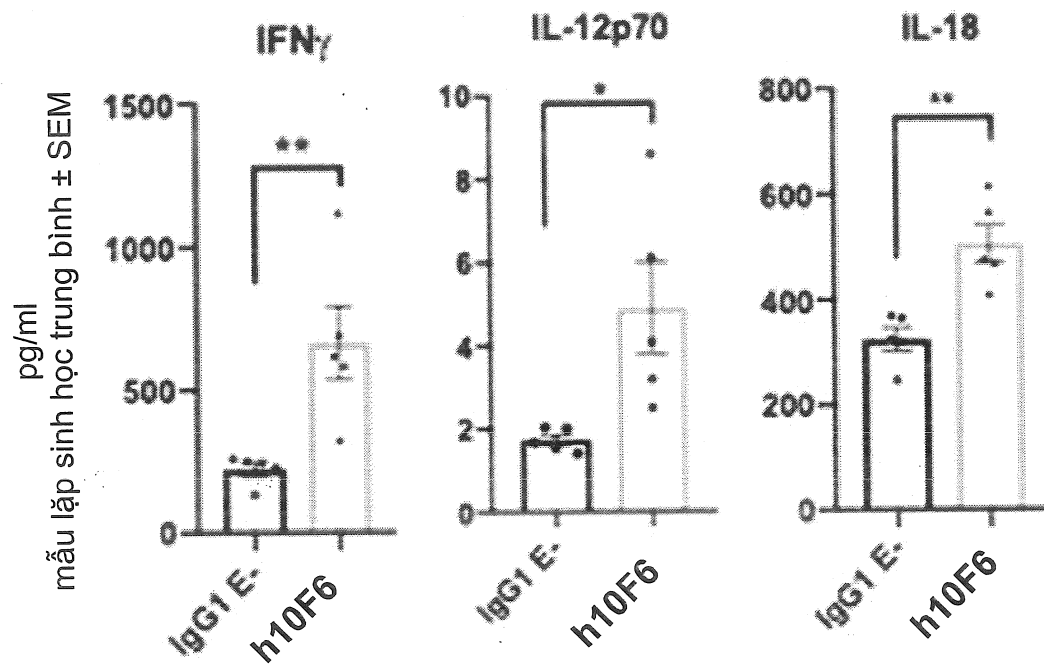


FIG. 23B

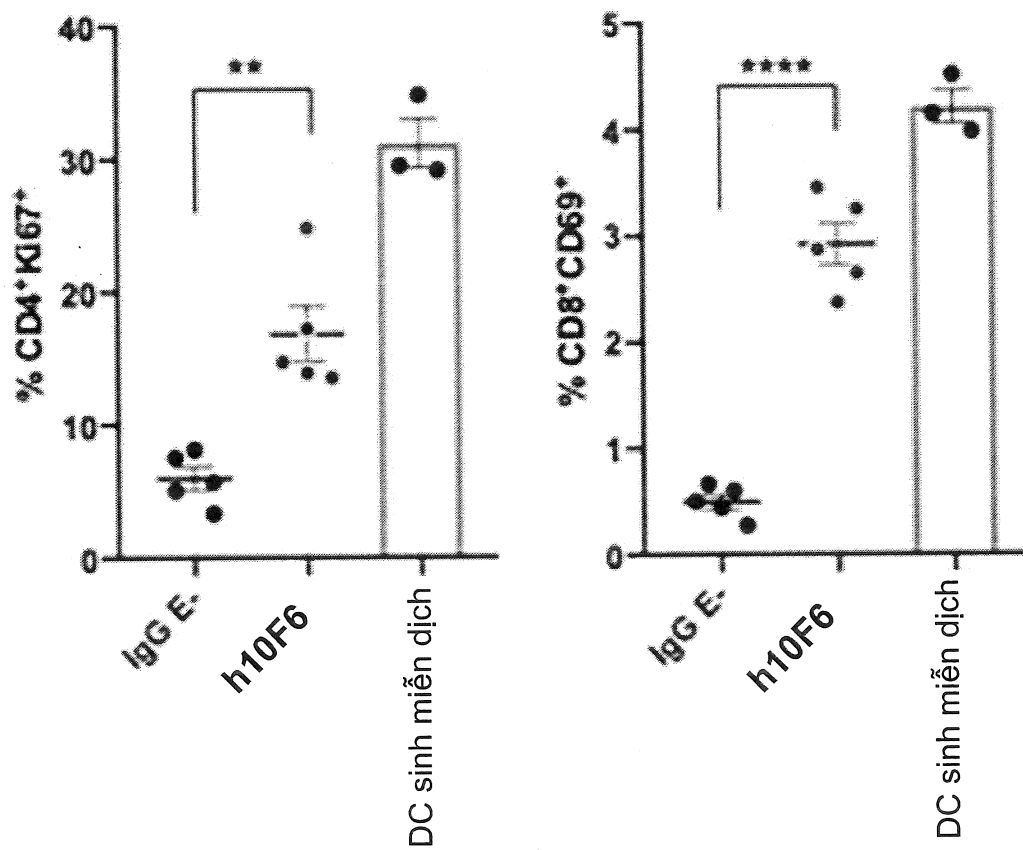


FIG. 23C

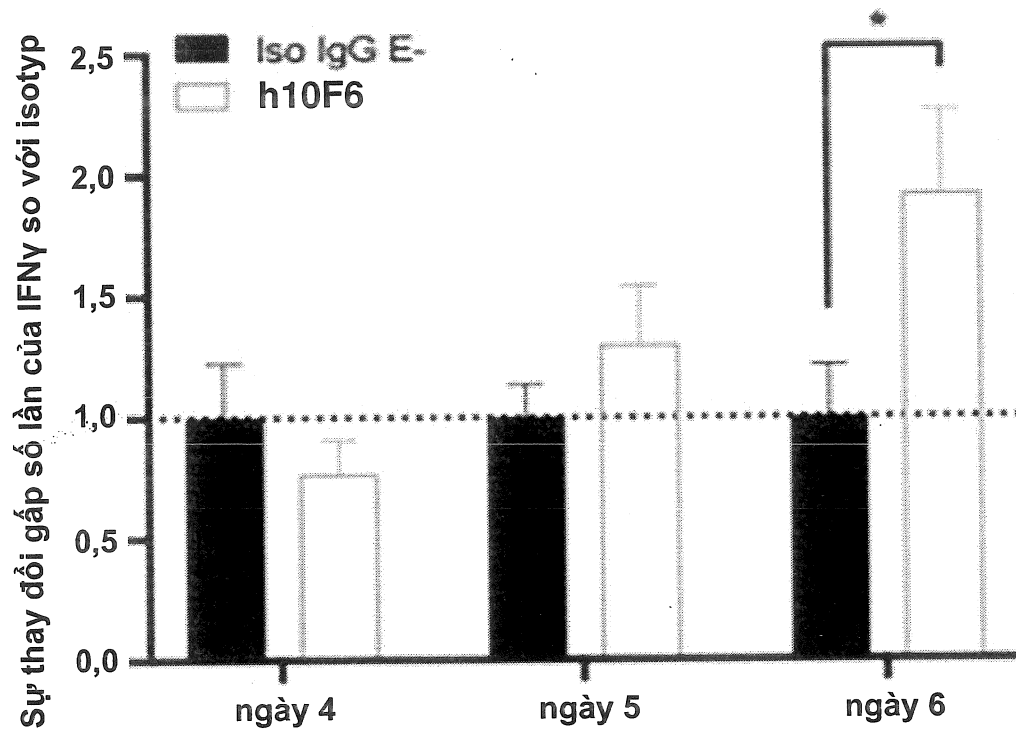


FIG. 24A

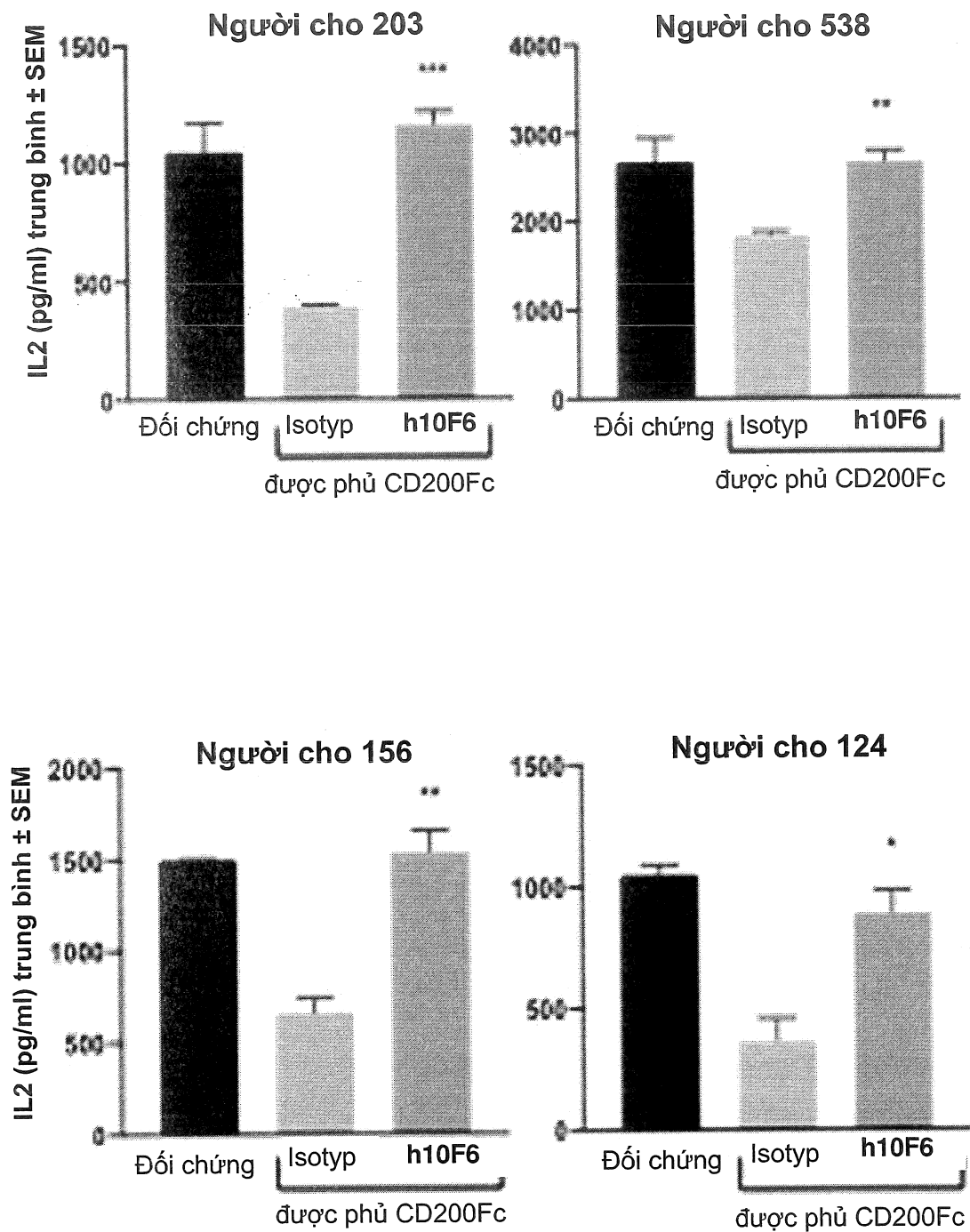


FIG. 24B

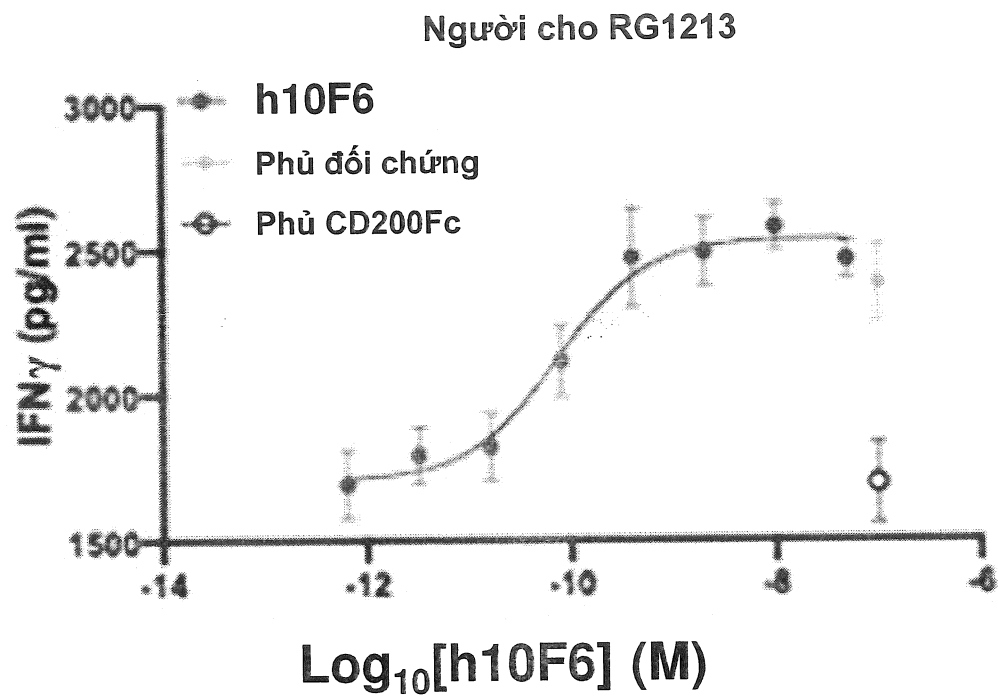


FIG. 25A

RG1212

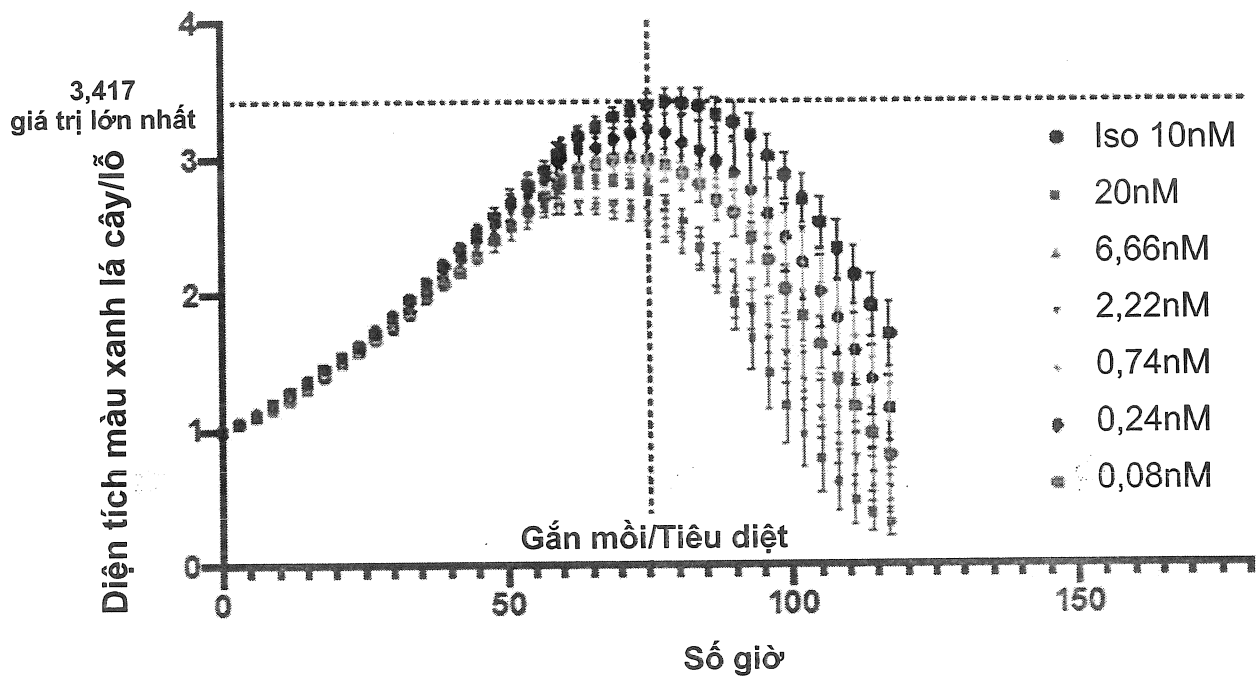


FIG. 25B

RG1212

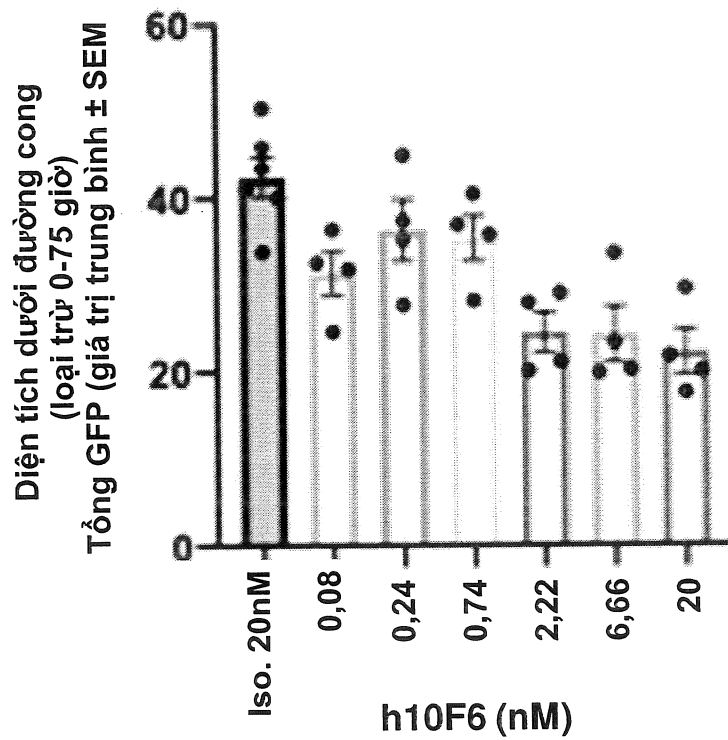


FIG. 26A

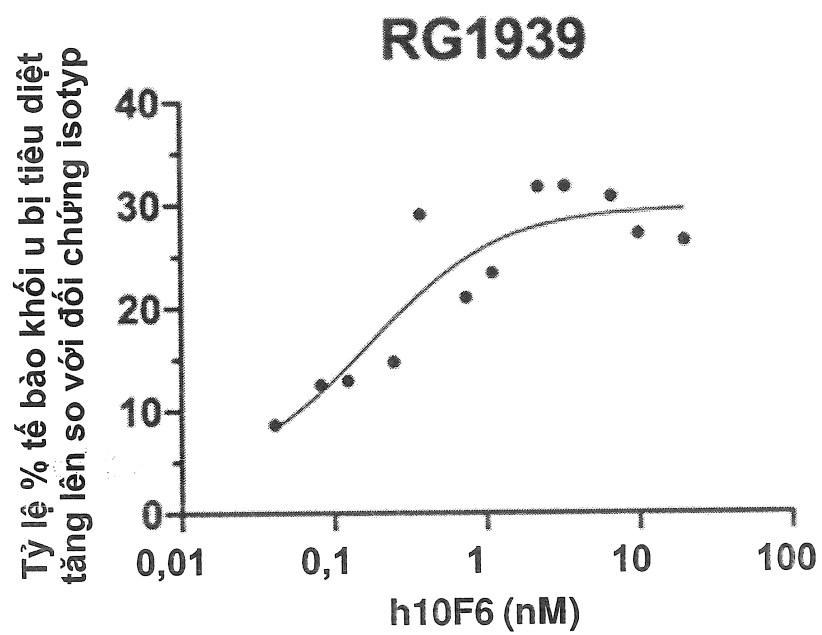


FIG. 26B

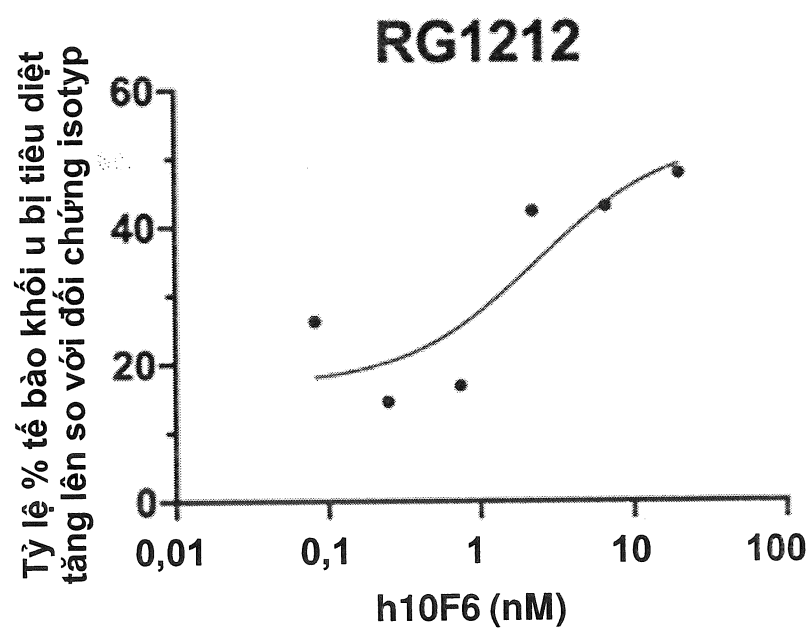


FIG. 26C

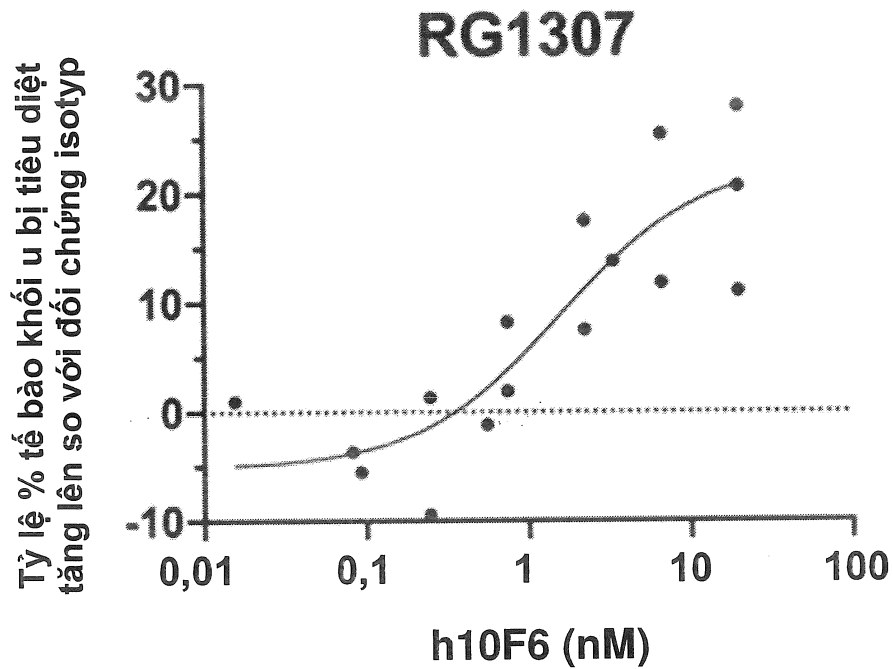


FIG. 26D

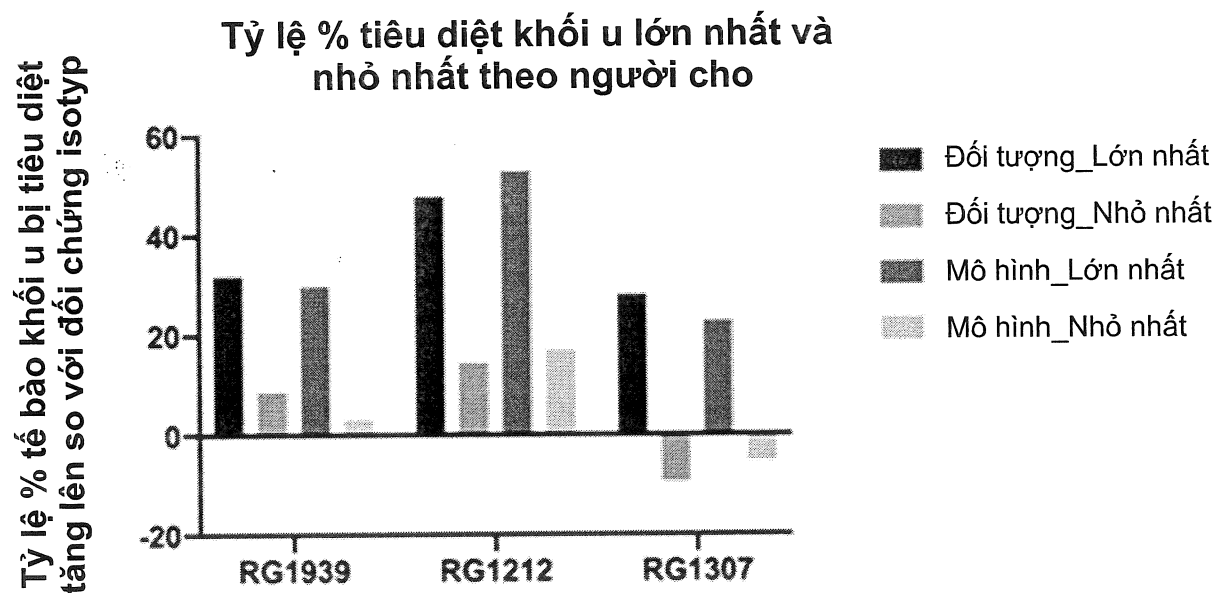


FIG. 27

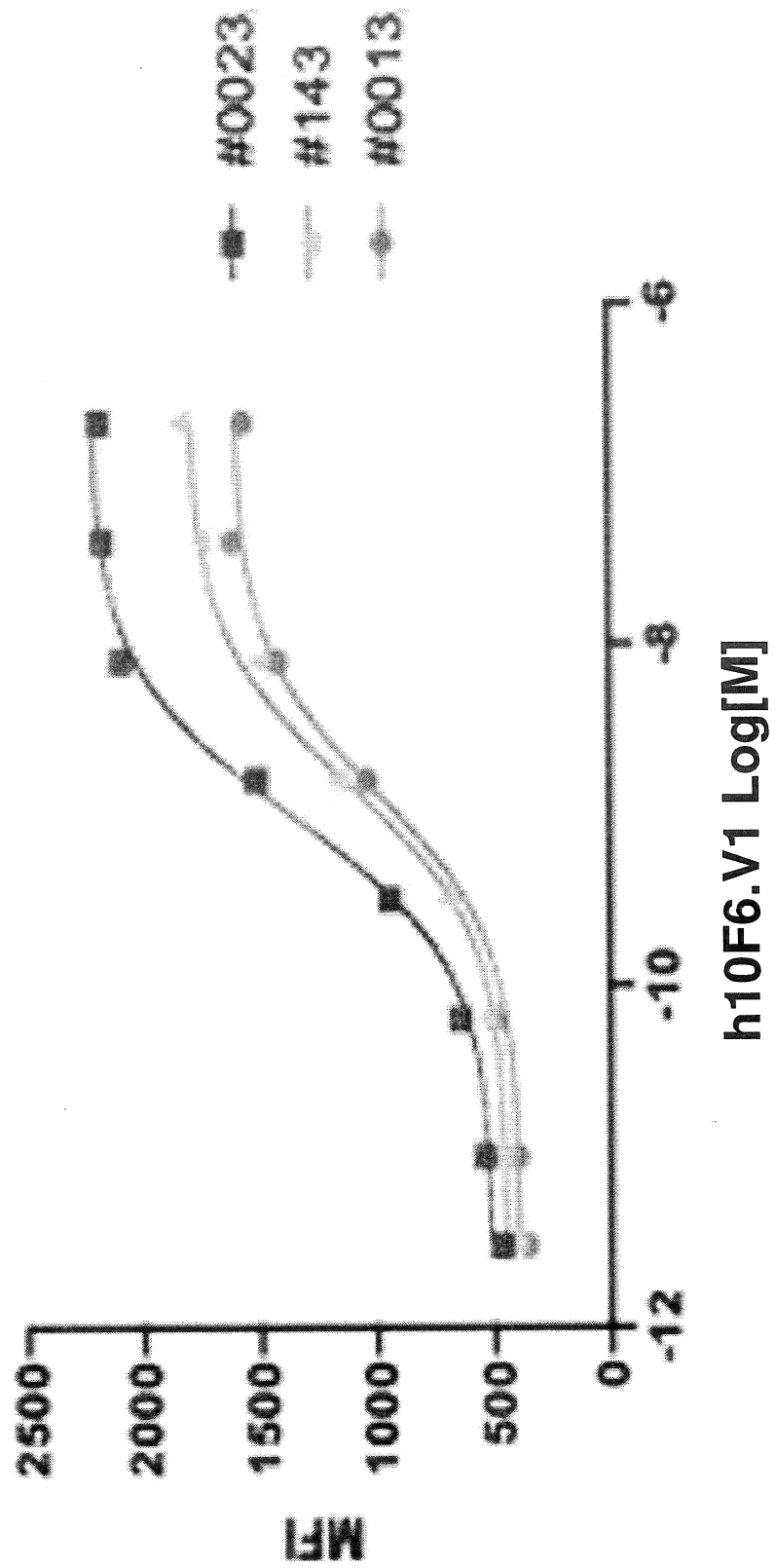
Các tế bào T CD4⁺ của khỉ

FIG. 28

Thử nghiệm ELISA phong bế (MfCD200:MfCD200R1)

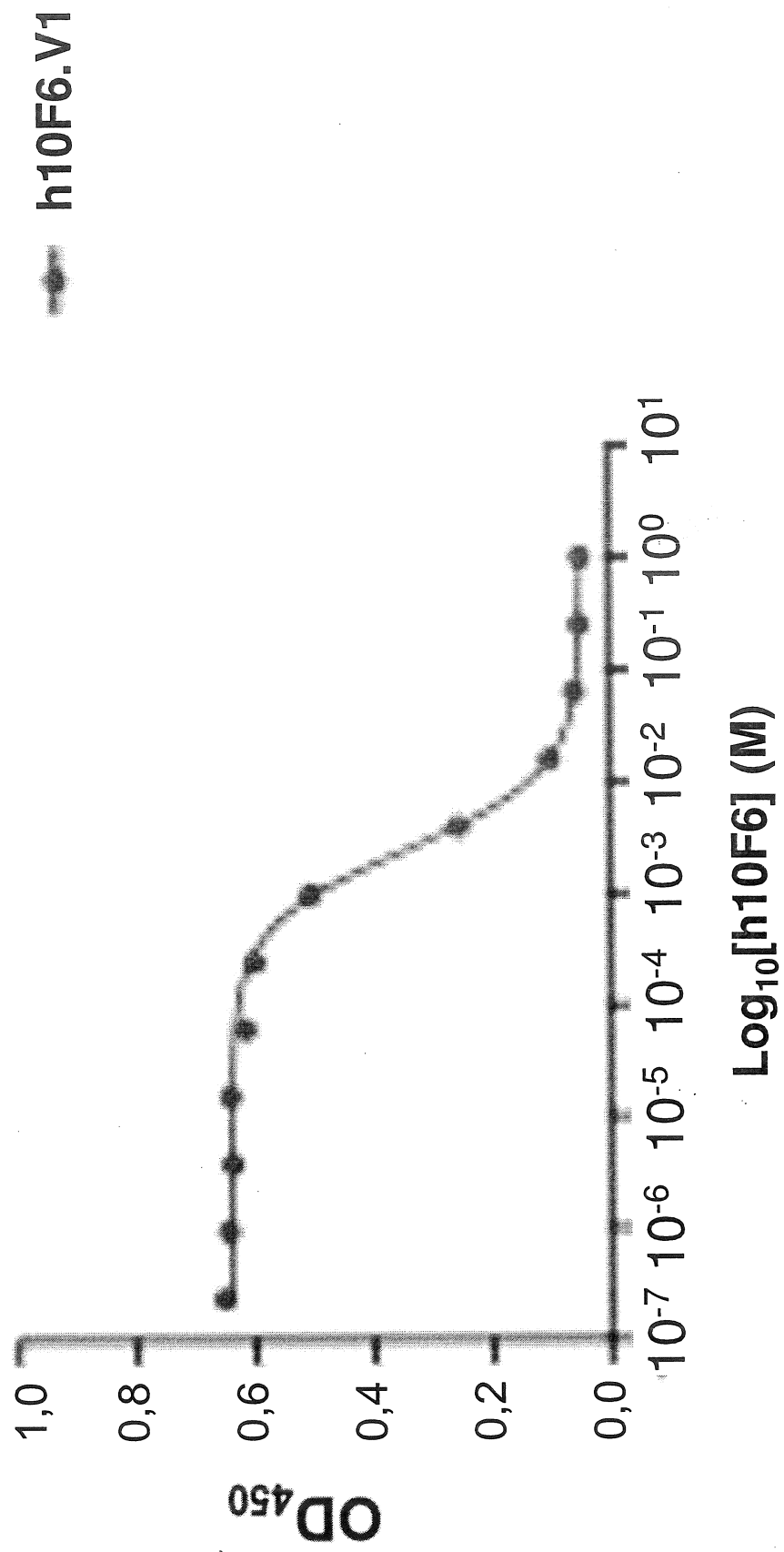


FIG. 29

Sự gắn kết của MfCD200 với MfCD200R1 được biểu hiện trên các tế bào K562

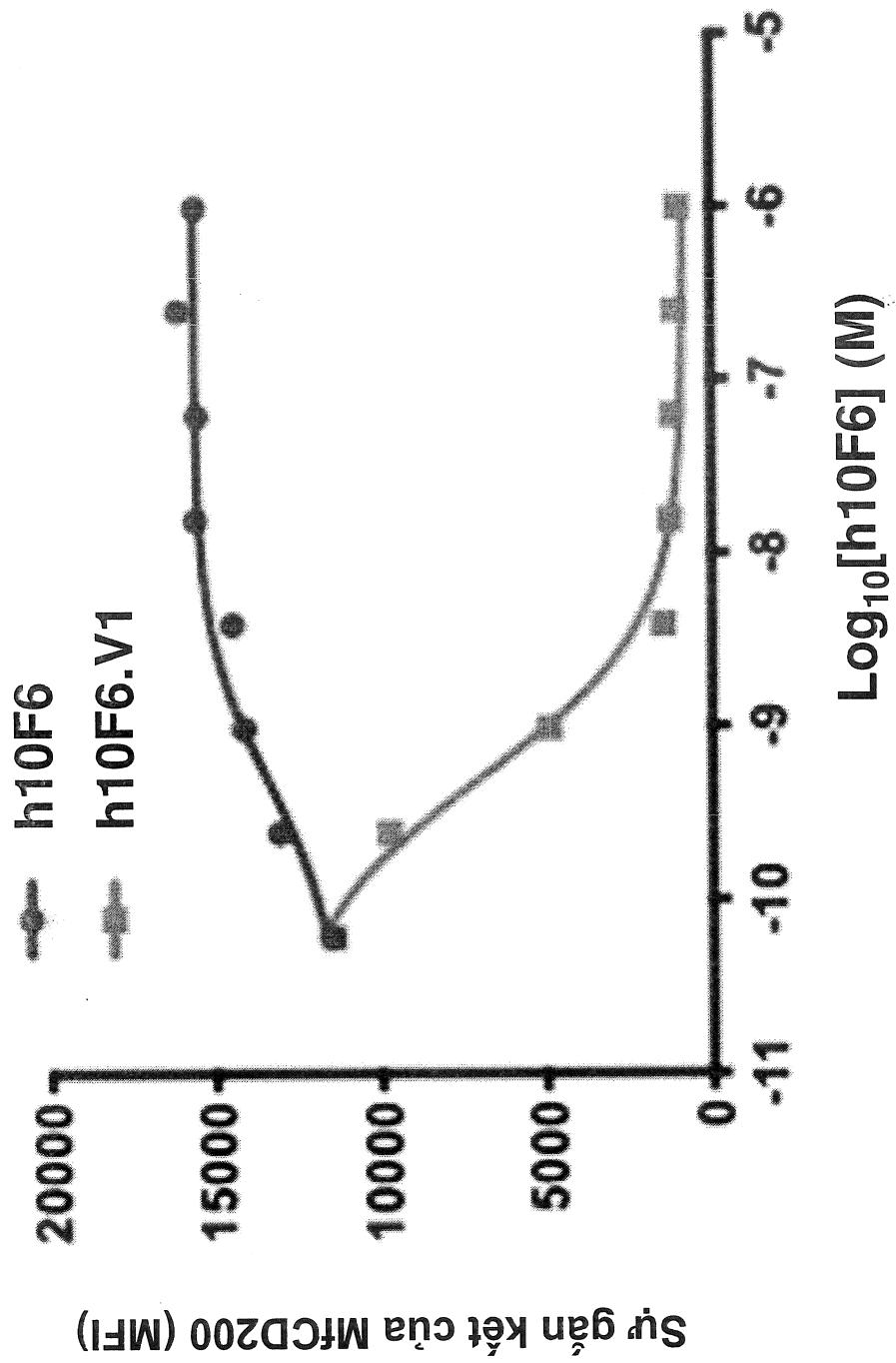


FIG. 30

