



(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)



1-0029626

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2013-01801

(22) 14/11/2011

(86) PCT/EP2011/070058 14/11/2011

(87) WO/2012/065950 24/05/2012

(30) 61/413,567 15/11/2010 US

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/11/2013 308A

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) HEUSSER, Christoph (CH); RUSH, James (AU); VINCENT, Karen (GB).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP TRỰC TIẾP CHỐNG LẠI POLYPEPTIT CD40 VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các biến thể Fc của kháng thể kháng CD40 và dược phẩm chứa kháng thể này, thích hợp để sử dụng trong điều trị rối loạn bệnh lý như rối loạn tự miễn và viêm và/hoặc để phòng hoặc làm giảm nguy cơ thải mảnh ghép trong việc cấy ghép. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến biến thể chứa đoạn cố định âm (constant fragment - Fc) của các kháng thể kháng CD40 và được phẩm và phương pháp sử dụng kháng thể này để điều trị các rối loạn bệnh lý như rối loạn tự miễn và viêm và/hoặc để phòng hoặc làm giảm nguy cơ thải mảnh ghép trong cấy ghép.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mặc dù có sẵn nhiều phương pháp điều trị ức chế miễn dịch đối với bệnh tự miễn, nhưng vẫn còn nhu cầu lớn chưa được thỏa mãn về các thuốc hiệu quả và an toàn hơn ở một nhóm bệnh nhân lớn. Ví dụ, mặc dù đã có báo cáo về hiệu quả của các liệu pháp làm cạn kiệt/ức chế tế bào B như Rituximab và Belimumab ở bệnh viêm khớp dạng thấp, luput ban đỏ hệ thống, hội chứng Sjögren, và bệnh đa xơ cứng, nhưng các liệu pháp điều trị này chỉ có hiệu quả ở một phần bệnh nhân bị bệnh, và, với Rituximab, có nguy cơ đi kèm là bệnh não chất trắng đa ổ tiến triển. Ngoài ra, nhiều kiểu tế bào bạch cầu khác thường có liên quan đến bệnh học của các bệnh tự miễn này như đại thực bào, tế bào đuôi gai và tế bào T, do đó các biện pháp can thiệp điều trị nhằm vào các loại tế bào khác hoặc con đường miễn dịch chính mà sẽ ức chế chức năng của chúng có thể có lợi. Nhiều vai trò liên quan đến miễn dịch của CD40-CD154 trong việc hoạt hóa và thực hiện chức năng hoặc các kiểu tế bào này đã được xác định, dường như là kháng thể kháng CD40 sẽ mang lại lợi ích điều trị cho các bệnh nhân mắc các bệnh tự miễn được nêu ở trên vượt xa cả lợi ích mà gần đây đạt được bởi các liệu pháp điều trị hiện nay. Ngoài ra, vai trò chính đối với các tương tác CD40-CD154 ở bệnh viêm ruột như bệnh Crohn và viêm loét đại tràng, và các mối liên quan cơ học của con đường CD40 với bệnh học ở nhiều rối loạn hiếm như bệnh viêm mạch tự miễn, bệnh pemphigut thông thường, và ITP cũng làm nổi bật tiềm năng của kháng thể kháng CD40 ở các chỉ định này.

Các thuốc ức chế miễn dịch hiện có được sử dụng sau khi ghép tạng rắn mang lại hiệu quả tuyệt vời trong một khoảng thời gian ngắn. Sự thải cấp tính trong giai đoạn mới sau ghép được quan sát thấy ở 5% – 20% người nhận (tùy thuộc vào

cơ quan, nhóm bệnh nhân, và chế độ dùng thuốc) và tỷ lệ của việc mất mảnh ghép với sự thải cấp tính trong giai đoạn mới sau ghép là dưới 5% đối với sự cấy ghép bất kỳ. Gần đây nhu cầu chính không được thỏa mãn là khả năng dung nạp thuốc ức chế miễn dịch của bệnh nhân và sự tồn tại của mảnh ghép trong một thời gian dài. Sau khi ghép thận, 33% bệnh nhân chết và/hoặc mất mảnh ghép trong vòng 5 năm; tuổi tử vong trung bình của người cấy ghép là 58 năm. Các chất ức chế calcineurin (calcineurin inhibitor - CNI) vẫn là cơ sở chính của liệu pháp ức chế miễn dịch đối với hầu hết bệnh nhân cấy ghép. Trong khi tính gây độc trên thận và tỷ lệ mắc bệnh tim mạch có liên quan đến các CNI là một trong số các tác nhân của bệnh thận ghép cùng loại mãn tính cũng như tỷ lệ chết ở bệnh nhân có mảnh ghép chức năng, theo cách khác thuốc ức chế miễn dịch đầu tiên chưa có khả năng thay thế cho các CNI. Nói chung, vẫn có lý do phải cải thiện thuốc ức chế miễn dịch dùng trong cấy ghép trong thời gian dài. Sự phá hủy miễn dịch của thận cấy ghép qua trung gian tế bào B có thể tạo ra các kết quả kém trong thời gian dài và nhu cầu về các chất mới nhằm vào việc loại bỏ tế bào B ngày càng được nhận diện được tăng lên đối với nhóm y tế.

Chir12.12 là kháng thể kháng CD40 không chủ vận được làm tương thích với người đầy đủ (IgG1, kapa) mà ngăn cản sự hoạt hóa bạch cầu qua trung gian CD154 (cũng được biết là phối tử CD40; CD40L) và có thể gây ra độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC) của các bạch cầu người và các u lympho tế bào B *in vitro* (xem công bố đơn quốc tế số WO2006/073443). Công bố đơn quốc tế số WO2005/044306 cũng mô tả kháng thể đối kháng kháng CD40, bao gồm Chir12.12 để sử dụng cụ thể là trong điều trị bệnh tự miễn và viêm. Ngoài ra, Chir12.12 có hiệu quả trong việc làm chậm sự thải mảnh ghép cùng loại ở thận khi được dùng làm liệu pháp đơn ở khỉ *Macaca fascicularis* (khỉ *Cynomolgus*) [Li *et al.* (2008) Transplantation; 86 (1):10-15]. Tuy nhiên, Chir12.12 có thể cũng gây ra cạn kiệt tế bào B ngoại vi ở các động vật linh trưởng không phải người (các NHP).

Các mAb kháng CD40 với hoạt tính ADCC được làm cân được dự đoán có profin an toàn được cải thiện tương ứng với kháng thể kháng CD40 gốc, và cụ thể là

có thể thích hợp hơn cho các chỉ định không tạo khối u, như bệnh tự miễn và sử dụng trong việc thiết lập cấy ghép.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế do đó đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng CD40 chứa đoạn Fc câm mà vẫn giữ đặc tính phong bế CD40L không chủ vận của kháng thể kháng CD40 gốc Chir12.12.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập hoặc protein chứa phần liên kết kháng nguyên của kháng thể trực tiếp chống lại polypeptit CD40 đích (SEQ ID NO:28), khác biệt ở chỗ trong đó kháng thể hoặc protein này

- a) liên kết với polypeptit CD40 với K_D bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, và,
- b) chứa vùng Fc IgG câm.

Theo một phương án, kháng thể hoặc protein này ức chế sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L với IC_{50} bằng 50ng/ml hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án khác, kháng thể phân lập hoặc protein theo sáng chế không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp đối với sự truyền tín hiệu CD40.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc protein theo sáng chế chứa vùng Fc IgG câm được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 hoặc SEQ ID NO:19.

Theo một phương án khác, kháng thể phân lập hoặc protein theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nhẹ (V_L) có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc 100 % tương ứng với V_H của Chir12.12 (SEQ ID NO:9) và V_L của kháng thể Chir12.12 (SEQ ID NO:10).

Các ví dụ cụ thể về kháng thể theo sáng chế là mAb1 chứa trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 11 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:12.

Kháng thể phân lập theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc. Cụ thể là, chúng thích hợp để sử dụng trong điều trị rối loạn tự miễn, rối loạn viêm và/hoặc trong phòng hoặc làm giảm nguy cơ thải ghép trong việc cấy ghép.

Kháng thể phân lập theo sáng chế có thể được sử dụng cụ thể là trong điều trị bệnh đa xơ cứng, bệnh luput ban đỏ hệ thống, hội chứng Sjögren, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa kháng thể nêu trên theo sáng chế, kết hợp với ít nhất tá dược chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể còn chứa các hoạt chất khác.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm lỏng chứa kháng thể theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể hoặc protein theo sáng chế và vector tách dòng hoặc biểu hiện tương ứng chứa các axit nucleic SEQ ID NO: 22 và 23.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ chứa một hoặc nhiều vector tách dòng hoặc biểu hiện như nêu trên.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể theo sáng chế, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ như nêu trên, tinh chế và thu hồi kháng thể hoặc protein.

Để hiểu sáng chế rõ ràng hơn, các thuật ngữ nhất định đầu tiên được định nghĩa. Các định nghĩa khác được nêu trong suốt phần mô tả chi tiết sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện việc kết hợp ^3H -thymidin sau 72 giờ nuôi cấy PBMC người được kích thích bằng liều đáp ứng của Chir12.12 (vòng tròn rỗng), mAb1 (vòng tròn đặc), mAb2 (hình vuông đặc), mAb3 (hình tam giác đặc) hoặc CD40L người (hình vuông rỗng).

Fig.2 thể hiện việc kết hợp ^3H -thymidin sau 72 giờ nuôi cấy PBMC người được kích thích bằng liều đáp ứng của Chir12.12 (vòng tròn rỗng), mAb1 (vòng tròn đặc), mAb2 (hình vuông đặc), mAb3 (hình tam giác đặc), CD40L người (hình vuông rỗng), đối chứng isotyp (hình thoi đặc) được đồng kích thích với sự có mặt của $5\mu\text{g/ml}$ kháng IgM F(ab')₂ hoặc $1\mu\text{M}$ CpG2006.

Fig.3 thể hiện việc kết hợp ^3H -thymidin sau 72 giờ nuôi cấy PBMC người được kích thích bằng liều đáp ứng của Chir12.12 (vòng tròn rỗng), mAb1 (vòng tròn đặc), mAb2 (hình vuông đặc), mAb3 (hình tam giác đen), CD40L người (hình vuông rỗng), đối chứng isotyp (hình thoi đặc) được đồng kích thích khi có mặt 75ng/ml IL-4.

Fig.4 thể hiện việc kết hợp ^3H -thymidin sau 72 giờ nuôi cấy PBMC người được kích thích bằng $20\mu\text{g/ml}$ CD40L với liều dùng đáp ứng của Chir12.12 (vòng

tròn rộng), mAb1 (vòng tròn đặc), mAb2 (hình vuông đặc), mAb3 (hình tam giác đen) hoặc CD40L người (hình vuông rộng).

Fig.5 thể hiện sự gắn kết phụ thuộc liều của kháng thể kháng CD40 người với các dòng tế bào BJAB, tương ứng, Chir12.12 (vòng tròn đặc), mAb1 (hình vuông rộng), mAb2 (tam giác rộng), mAb3 (hình tam giác đặc).

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" nghĩa là hoạt động của, ví dụ, các tế bào lympho, các tế bào trình diện kháng nguyên, các tế bào thực bào, bạch cầu hạt, và các đại phân tử hòa tan được tạo ra bởi các tế bào ở trên hoặc gan (bao gồm kháng thể, xytokin, và bổ thể) mà dẫn đến tổn thương chọn lọc, phá hủy, hoặc loại trừ khỏi cơ thể người các tác nhân gây bệnh xâm lấn, các tế bào hoặc các mô nhiễm tác nhân gây bệnh, các tế bào ung thư, hoặc, trong các trường hợp viêm tự miễn hoặc bệnh lý, các tế bào hoặc mô người bình thường.

“Con đường truyền tín hiệu” hoặc “hoạt tính truyền tín hiệu” để chỉ mối liên hệ nhân quả sinh hóa nói chung được khởi đầu bằng tương tác protein-protein như liên kết của yếu tố tăng trưởng với thụ thể, dẫn đến sự truyền tín hiệu từ một phần của tế bào đến một phần khác của tế bào. Nói chung, sự truyền tín hiệu có liên quan đến sự phosphoryl hóa cụ thể của một hoặc nhiều gốc tyrosin, serin, hoặc threonin trên một hoặc nhiều protein trong hàng loạt phản ứng gây ra sự truyền tín hiệu. Quy trình gần cuối thường bao gồm các phản ứng nhân, dẫn đến thay đổi trong biểu hiện gen.

Thuật ngữ CD40 được dùng để chỉ CD40 người, ví dụ như nêu trong SEQ ID NO: 28, trừ khi được mô tả theo cách khác.

Thuật ngữ "kháng thể" được đề cập ở đây bao gồm toàn bộ kháng thể và các đoạn gắn kết với kháng nguyên bất kỳ (nghĩa là, "phần gắn kết với kháng nguyên") hoặc các chuỗi đơn của nó.

"Kháng thể" có nguồn gốc trong tự nhiên là glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (heavy - H) và hai chuỗi nhẹ (light - L) liên kết với nhau bởi liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (viết tắt ở đây là V_H) và vùng cố định chuỗi nặng. Vùng cố định chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (viết tắt ở đây là V_L) và

vùng cố định chuỗi nhẹ. Vùng cố định chuỗi nhẹ bao gồm một vùng, C_L . Các vùng V_H và V_L ngoài ra có thể được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, gọi là vùng quyết định bổ trợ (complementarily determining region - CDR), nằm rải rác với các vùng mà được bảo toàn nhiều hơn, gọi là vùng khung (frame region - FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxyl theo trật tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết mà tương tác với kháng nguyên. Các vùng cố định của kháng thể có thể tạo ra liên kết giữa globulin miễn dịch với các mô chủ hoặc các yếu tố, bao gồm nhiều tế bào của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hoạt động) và bổ thể đầu tiên (Clq) của hệ bổ thể cổ điển.

Thuật ngữ "phần gắn kết với kháng nguyên" của kháng thể (hoặc đơn giản là "phần kháng nguyên"), như được dùng ở đây, nghĩa là đoạn kháng thể toàn vẹn hoặc một hoặc nhiều đoạn kháng thể mà vẫn giữ khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, một phần của CD40). Đã thấy rằng chức năng gắn kết với kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các đoạn của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các ví dụ về các đoạn gắn kết nằm trong thuật ngữ "phần gắn kết với kháng nguyên" của kháng thể bao gồm đoạn Fab, đoạn hóa trị một bao gồm các miền V_L , V_H , C_L và $CH1$; đoạn $F(ab)_2$, đoạn hóa trị hai chứa hai đoạn Fab được liên kết bằng liên kết disulfua ở vùng bản lề; đoạn Fd bao gồm các miền V_H và $CH1$; đoạn Fv bao gồm các miền V_L và V_H của nhánh đơn của kháng thể; đoạn dAb (Ward *et al.*, 1989 Nature 341:544-546), mà bao gồm miền V_H ; và vùng quyết định bổ trợ phân lập (CDR), hoặc protein dung hợp bất kỳ chứa phần gắn kết với kháng nguyên này.

Ngoài ra, mặc dù hai miền của đoạn Fv, V_L và V_H , được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được nối, bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng yếu tố liên kết tổng hợp cho phép chúng được tạo ra dưới dạng protein chuỗi đơn trong đó các vùng V_L và V_H ghép với nhau để tạo thành các phân tử hóa trị một (được biết là Fv chuỗi đơn (scFv); xem tài liệu ví dụ, Bird *et al.*, 1988 Science 242:423-426; và Huston *et al.*, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được dự định nằm trong thuật ngữ "phần gắn kết với kháng nguyên" của kháng thể. Các đoạn kháng thể này được tạo ra bằng cách sử

dùng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và các đoạn được sàng lọc để dùng theo cách giống hệt như là kháng thể nguyên vẹn.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "vùng Fc IgG" được dùng để xác định vùng đầu C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, bao gồm vùng Fc trình tự nguyên thể và vùng Fc biến đổi. Vùng Fc chuỗi nặng của IgG người nói chung được xác định là bao gồm gốc axit amin từ vị trí C226 hoặc từ P230 đến đầu carboxyl của kháng thể IgG. Việc đánh số các gốc trong vùng Fc là cách đánh số theo chỉ số EU của Kabat. Lysin ở đầu C (gốc K447) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình sản xuất hoặc tinh chế kháng thể. Do đó, được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế có thể chứa nhóm kháng thể với tất cả các gốc K447 được loại bỏ, các nhóm kháng thể không loại bỏ gốc K447, và nhóm kháng thể có hỗn hợp kháng thể có gốc K447 và không có gốc K447.

"Kháng thể phân lập", như được dùng ở đây, đề cập đến kháng thể mà hầu như không có kháng thể khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với CD40 hầu như không bao gồm kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác CD40). Kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với CD40, tuy nhiên, có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử CD40 từ các loài khác (không phải người). Ngoài ra, kháng thể phân lập có thể hầu như không có nguyên liệu tế bào và/hoặc chất hóa học khác.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "được phẩm kháng thể đơn dòng" như được dùng ở đây đề cập đến được phẩm chứa phân tử kháng thể ở dạng phân tử đơn. Được phẩm kháng thể đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu và ái lực liên kết đơn đối với một epitop cụ thể.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", như được dùng ở đây, được dự định bao gồm kháng thể mà chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch không phải của người. Hầu như, kháng thể được làm tương thích với người là các globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng siêu biến (cũng được biết như vùng quyết định hỗ trợ hoặc CDR) của kháng thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến của các loài

không phải người (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn. Cụm từ “vùng quyết định hỗ trợ” đề cập đến các trình tự axit amin mà cùng xác định ái lực liên kết và tính đặc hiệu của vùng Fv tự nhiên của vị trí liên kết globulin miễn dịch nguyên thể. Xem tài liệu, ví dụ Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Kabat *et al.* (1991) US Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Cụm từ “vùng cố định” đề cập đến phần phân tử kháng thể mà có chức năng tác động. Theo công trình nghiên cứu trước, hướng vào việc tạo ra kháng thể không gây miễn dịch để sử dụng trong điều trị bệnh ở người, các vùng cố định của chuột nhắt được thế bằng các vùng cố định của người. Các vùng cố định của kháng thể được làm tương thích với người đối tượng có nguồn gốc từ các globulin miễn dịch của người. Việc làm cho có tính người có thể được thực hiện theo phương pháp của Winter và các cộng sự (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239: 1534-1536), bằng cách thay thế các CDR hoặc các trình tự CDR của loài gặm nhấm và loài gặm nhấm đột biến cho các trình tự tương ứng của kháng thể người. Trong một số trường hợp, các gốc nằm trong vùng khung của một hoặc nhiều vùng biến đổi của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải người tương ứng (xem tài liệu, ví dụ, các patent Mỹ số 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; và 6,180,370). Ngoài ra, kháng thể được làm tương thích với người có thể chứa các gốc mà không được tìm thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế sẽ cũng bao gồm ít nhất một phần của vùng cố định globulin miễn dịch (Fc). Thông thường, vùng cố định đó của globulin miễn dịch của người và trong trường hợp này là vùng Fc IgG cam.

Kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*). Cụ thể là, thuật ngữ “kháng thể được làm tương thích với người” bao gồm kháng thể mà chứa biến thể cam của vùng Fc IgG.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người" đề cập đến kháng thể thể hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn mà có các vùng biến đổi trong đó vùng biến đổi được làm tương thích với người từ các trình tự không phải của người.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp", như được dùng ở đây, bao gồm tất cả các kháng thể người hoặc được làm tương thích với người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, như kháng thể phân lập từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) mà được biến đổi gen hoặc biến đổi đối với các gen globulin miễn dịch của người hoặc thể lai được bào chế từ đó, kháng thể phân lập từ tế bào chủ được biến đổi để biểu hiện kháng thể người hoặc được làm tương thích với người, ví dụ, từ tế bào u tủy chuyển nhiễm, kháng thể phân lập từ thư viện kháng thể người tái tổ hợp, tổ hợp, và kháng thể được bào chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc phân lập được bằng các phương pháp khác bất kỳ mà có liên quan đến việc ghép nối tất cả hoặc một phần của gen globulin miễn dịch của người, các trình tự kháng các trình tự ADN khác. Kháng thể người hoặc được làm tương thích với người tái tổ hợp như vậy có các vùng biến đổi trong đó vùng khung và CDR có thể có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, kháng thể người hoặc được làm tương thích với người tái tổ hợp này có thể được gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi sử dụng động vật chuyển gen cho các trình tự Ig người, sự đột biến soma *in vivo*) và do đó các trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi có nguồn gốc và có liên quan đến các trình tự V_H và V_L dòng mầm của người, có thể không tồn tại một cách tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Như được dùng ở đây, "isotyp" đề cập đến nhóm kháng thể (ví dụ, IgM, IgE, IgG như IgG1 hoặc IgG4) mà được tạo ra bởi các gen vùng cố định chuỗi nặng. Các isotyp khác nhau có chức năng tác động khác nhau. Ví dụ, các isotyp IgG1 và IgG3 người kiểu đại gây ra hoạt tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC).

Cụm từ "kháng thể nhận diện kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu kháng nguyên" và "kháng thể trực tiếp chống lại kháng nguyên" ở đây được sử dụng thay đổi cho thuật ngữ "kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên".

Như được dùng ở đây, kháng thể hoặc protein mà "gắn kết đặc hiệu với polypeptit CD40" được dự định đề cập đến kháng thể hoặc protein mà liên kết với polypeptit CD40 người với K_D bằng 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn.

Kháng thể mà "phản ứng chéo với kháng nguyên khác CD40" được dự định đề cập đến kháng thể mà gắn kết với kháng nguyên đó với K_D bằng 1 μ M hoặc nhỏ hơn, 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn. Kháng thể mà "không phản ứng chéo với kháng nguyên cụ thể" được dự định đề cập đến kháng thể mà gắn kết với kháng nguyên đó, với K_D bằng 100nM hoặc lớn hơn, hoặc K_D bằng 1 μ M hoặc lớn hơn, hoặc K_D bằng 10 μ M hoặc lớn hơn. Theo các phương án nhất định, kháng thể này mà không phản ứng chéo với kháng nguyên về cơ bản thể hiện liên kết không thể phát hiện được chống lại các protein này trong thử nghiệm liên kết chuẩn.

Thuật ngữ " $K_{\text{liên kết}}$ " hoặc " K_a ", như được dùng ở đây, được dự định đề cập đến tỷ lệ liên kết của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể, trong khi thuật ngữ " $K_{\text{phân ly}}$ " hoặc " K_d ," như được dùng ở đây, được dự định đề cập đến tốc độ phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ " K_D ", như được dùng ở đây, được dự định đề cập đến hằng số phân ly, mà thu được từ tỷ số của K_d so với K_a (nghĩa là K_d/K_a) và được biểu hiện dưới dạng nồng độ mol (M). Các giá trị K_D của kháng thể có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Phương pháp xác định K_D của kháng thể là bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc bằng cách sử dụng hệ cảm biến sinh học như hệ Biacore®.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "ái lực" đề cập đến mức độ tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên ở các vị trí kháng nguyên đơn. Trong mỗi vị trí kháng nguyên, vùng biến đổi của "nhánh" kháng thể tương tác thông qua lực liên kết không cộng hóa trị yếu với kháng nguyên ở nhiều vị trí; sự tương tác càng nhiều, ái lực càng mạnh.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "ái tính" đề cập đến phương pháp liên quan đến thông tin về độ ổn định hoặc cường độ nói chung của phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Nó được kiểm soát bởi ba yếu tố chính: ái lực epitop kháng thể; hóa

trị của cả kháng nguyên và kháng thể; và sự sắp xếp cấu trúc của các phần tương tác. Cuối cùng các yếu tố này xác định tính đặc hiệu của kháng thể, đó là, khả năng là kháng thể cụ thể liên kết với epitop kháng nguyên chính xác.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ “chất đối kháng CD40” được dự định đề cập đến kháng thể hoặc protein mà ức chế hoạt tính truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40 với sự có mặt của CD40L trong thử nghiệm tế bào người như thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L. Thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ dưới đây. Theo một số phương án, kháng thể hoặc protein theo sáng chế ức chế truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L với trị số IC₅₀ bằng 500ng/ml hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là với trị số IC₅₀ bằng 50ng/ml hoặc nhỏ hơn, ví dụ với trị số IC₅₀ bằng 20ng/ml hoặc nhỏ hơn, như được đo trong thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L.

Như được dùng ở đây, kháng thể “không có hoạt tính chủ vận” được dự định đề cập đến kháng thể mà không làm tăng đáng kể hoạt tính truyền tín hiệu qua trung gian CD40 khi không có mặt CD40L trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào, như thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L. Thử nghiệm này được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ dưới đây.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ hoạt tính “ADCC” hoặc “tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể” đề cập đến hoạt tính làm suy yếu tế bào. Hoạt tính ADCC có thể được đo bằng thử nghiệm ADCC như được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ dưới đây.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ kháng thể “câm” đề cập đến kháng thể mà không thể hiện hoặc thể hiện hoạt tính ADCC thấp như được đo trong thử nghiệm ADCC như được mô tả trong phần Ví dụ.

Theo một phương án, thuật ngữ “không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp” nghĩa là kháng thể câm thể hiện hoạt tính ADCC dưới 50% mức phân giải tế bào đặc hiệu, ví dụ dưới 10% mức phân giải tế bào đặc hiệu khi được đo trong thử nghiệm ADCC như được mô tả trong phần Ví dụ. Không có hoạt tính ADCC nghĩa là kháng thể câm thể hiện hoạt tính ADCC (mức phân giải tế bào đặc hiệu) dưới 1%. Theo một phương án cụ thể, kháng thể câm theo sáng chế không thể hiện hoạt

tính ADCC đáng kể bất kỳ khi được đo trong thử nghiệm ADCC như được mô tả trong phần Ví dụ.

Chức năng tác động cảm có thể có được bằng đột biến ở vùng Fc của kháng thể và đã được mô tả trong lĩnh vực này: LALA và N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); và D265A (Baudino *et al.*, 2008, J. Immunol. 181: 6664-69; Strohl, W., *ở trên*). Các ví dụ về kháng thể Fc IgG1 cảm bao gồm thể đột biến LALA chứa đột biến L234A và L235A trong trình tự axit amin Fc IgG1. Một ví dụ khác của kháng thể IgG1 cảm chứa đột biến D265A. Một kháng thể IgG1 cảm khác chứa đột biến N297A, mà dẫn đến kháng thể được/không được glycosyl hóa.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "chọn lọc" đối với kháng thể hoặc protein theo sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc protein mà gắn kết với polypeptit đích nhất định nhưng không gắn kết với các polypeptit có liên quan mật thiết.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "ái lực cao" đối với kháng thể đề cập đến kháng thể có K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn đối với kháng nguyên đích. Như được dùng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" bao gồm người hoặc động vật không phải người bất kỳ.

Thuật ngữ "động vật không phải người" bao gồm tất cả động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú và không động vật có vú, như động vật linh trưởng không phải người, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, động vật lưỡng cư, loài bò sát, .v.v.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ, "tối ưu hóa" nghĩa là trình tự nucleotit được thay đổi để mã hóa trình tự axit amin bằng cách sử dụng các codon mà được ưu tiên trong tế bào hoặc sinh vật sản xuất, nói chung là tế bào có nhân thực, ví dụ, tế bào của *Pichia*, tế bào của *Trichoderma*, tế bào trứng chuột đồng Trung quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) hoặc tế bào người. Trình tự nucleotit tối ưu được thao tác di truyền để giữ lại hoàn toàn hoặc càng nhiều càng tốt trình tự axit amin được mã hóa ban đầu bởi trình tự nucleotit ban đầu, mà cũng được biết đến là trình tự "gốc". Các trình tự tối ưu ở đây được thao tác di truyền để có các codon mà được ưu tiên trong các tế bào động vật có vú CHO, tuy nhiên biểu hiện tối ưu của các trình tự này trong các tế bào có nhân thực cũng được mô tả ở đây. Các trình tự axit

amin được mã hóa bởi các trình tự nucleotit tối ưu cũng được đề cập đến như được tối ưu hóa.

Như được dùng ở đây, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là chức năng của số vị trí đồng nhất có chung ở các trình tự (nghĩa là, % đồng nhất = số vị trí đồng nhất/tổng số vị trí x 100), tính cả số khoảng trống, và chiều dài của mỗi khoảng trống, mà cần đưa vào để sắp xếp thẳng hàng tối ưu giữa hai trình tự. So sánh các trình tự và xác định phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán toán học, như được mô tả dưới đây.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988) mà được đưa vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), bằng cách sử dụng bảng gốc khối lượng PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống bằng 12 và điểm phạt khoảng trống bằng 4. Theo một cách khác, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) mà được đưa vào chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có sẵn ở <http://www.gcg.com>), bằng cách sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và khối lượng khoảng trống bằng 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và khối lượng độ dài bằng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin nucleotit cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng ví dụ các thuật toán như chương trình BLASTN đối với các trình tự axit nucleic bằng cách sử dụng các giá trị mặc định chiều dài từ (W) bằng 11, giá trị dự tính (E) bằng 10, M=5, N=4, và so sánh của cả hai mạch.

Kháng thể tái tổ hợp

Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể tái tổ hợp được làm tương thích với người mAb1-mAb3, phân lập được và được đặc trưng về mặt cấu trúc bởi các trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ như được mô tả trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Các trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb1-mAb3

Kháng thể	Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng	Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ
mAb1	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
mAb2	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14
mAb3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16

Các vùng biến đổi tương ứng, các trình tự axit amin V_H và V_L của kháng thể phân lập mAb1-mAb3 theo sáng chế đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể Chir12.12 được mô tả trước đây ví dụ trong công bố đơn quốc tế số WO2006/073443 và bao gồm trình tự axit amin V_H nêu trong SEQ ID NO:7 và trình tự axit amin V_L nêu trong SEQ ID NO:8.

Một sự khác biệt quan trọng của kháng thể theo sáng chế so với CHIR12.12 ban đầu là chúng có vùng Fc, bao gồm vùng Fc IgG cân, ví dụ vùng Fc IgG1 cân.

Cụ thể là, Bảng 2 thể hiện gốc cải biến của vùng Fc IgG1 được tiến hành để thu được các kháng thể mAb1-mAb3 so với kháng thể CHIR12.12 ban đầu.

Bảng 2: Cải biến vùng Fc IgG1 để thu được mAb1-mAb3

Kháng thể	Cải biến vùng Fc IgG1	Trình tự axit amin vùng Fc
mAb1	N297A	SEQ ID NO:17
mAb2	D265A	SEQ ID NO:18
mAb3	L234A/L235A	SEQ ID NO:19

Kháng thể khác theo sáng chế bao gồm các kháng thể có các axit amin mà được gây đột biến bằng cách loại bỏ, thêm hoặc thay thế axit amin, mà có ít nhất 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc 100 phần trăm đồng nhất với vùng V_H và V_L của CHIR12.12, SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8 tương ứng và chứa vùng Fc IgG cân, ví dụ vùng Fc IgG1 cân.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là biến thể đột biến của kháng thể bất kỳ trong số mAb1-mAb3, trong đó kháng thể biến thể đột biến này chứa các trình tự axit amin đột biến trong đó không quá 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin

được gây đột biến bằng cách loại bỏ, thêm hoặc thay thế axit amin trong vùng V_H và V_L khi so với các vùng V_H và V_L của CHIR12.12, SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8 tương ứng và giữ lại các vùng cố định tương tự như mAb1, mAb2 hoặc mAb3.

Các trình tự mã hóa nucleotit chuỗi nhẹ và nặng có chiều dài đầy đủ của mAb1-mAb3 được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Các trình tự mã hóa ADN của chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ

Kháng thể	Trình tự mã hóa ADN của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ	Trình tự mã hóa ADN của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ
mAb1	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23
mAb2	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25
mAb3	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27

Các axit nucleic khác mã hóa kháng thể theo sáng chế bao gồm các axit nucleic mà được gây đột biến bằng cách loại bỏ, thêm hoặc thay thế nucleotit, mà có ít nhất 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc 100 phần trăm đồng nhất với vùng lần lượt mã hóa V_H và V_L của CHIR12.12, như được mô tả trong các trình tự được nêu ví dụ trong SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:21 tương ứng và chứa trình tự mã hóa của vùng Fc IgG cam, ví dụ, vùng Fc IgG1 cam.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập các axit nucleic biến thể trong đó không quá 1, 2, 3, 4 hoặc 5 nucleotit được thay đổi bằng cách loại bỏ, thêm hoặc thay thế nucleotit trong vùng mã hóa V_H và V_L với các vùng mã hóa V_H và V_L được mô tả trong các trình tự được nêu ví dụ trong SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:21 tương ứng, và vẫn giữ được các trình tự mã hóa tương tự của các vùng cố định như các trình tự lần lượt mã hóa mAb1, mAb2 hoặc mAb3.

Kháng thể tương đồng

Ngoài kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế, mAb1-mAb3, sáng chế cũng bao gồm kháng thể tương đồng hoặc protein giữ lại các đặc tính chức năng mong muốn của các kháng thể mAb1-mAb3.

Cụ thể là, kháng thể tương đồng này hoặc protein theo sáng chế là kháng thể hoặc protein chứa phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể trực tiếp chống lại

polypeptit CD40 đích (SEQ ID NO:28), khác biệt ở chỗ trong đó kháng thể này hoặc protein

- a) liên kết với Polypeptit CD40 với K_D bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, và,
- b) chứa vùng Fc IgG cân

và trong đó kháng thể tương đồng này hoặc protein vẫn giữ lại được các đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể mAb1-mAb3 ban đầu.

Các đặc tính chức năng mong muốn của các kháng thể mAb1-mAb3 ban đầu có thể được chọn từ một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính dưới đây:

- (i) gắn kết đặc hiệu với CD40, ví dụ, K_D bằng 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 1nM hoặc nhỏ hơn, khi được đo bằng thử nghiệm Biacore;
- (ii) là chất đối kháng CD40, ví dụ, ức chế việc truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L khi được đo bằng thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L;
- (iii) thể hiện không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp, khi được đo bằng thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L;
- (iv) phản ứng chéo với polypeptit CD40 của khỉ Cynomolgus;
- (v) không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp; và,
- (vi) có đặc tính thích hợp cho việc phát triển thuốc.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể tương đồng này hoặc protein theo sáng chế chứa vùng Fc IgG1 cân, ví dụ, vùng Fc IgG1 cân được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 hoặc SEQ ID NO:19.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc protein trong đó có các trình tự nucleotit chuỗi nặng và nhẹ của vùng biến đổi, hoặc các trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ của vùng biến đổi, hoặc tất cả 6 trình tự axit amin CDR hoặc các trình tự mã hóa nucleotit mà tương đồng với các trình tự axit amin hoặc nucleotit tương ứng của các kháng thể mAb1-mAb3 được nêu ở trên, cụ thể là trong Bảng 1, và kháng thể này hoặc protein chứa vùng Fc IgG cân được chọn từ nhóm bao gồm vùng Fc của mAb1 (SEQ ID NO:17), vùng Fc của mAb2 (SEQ ID NO:18) và vùng Fc của mAb3 (SEQ ID NO:19), trong đó kháng thể tương đồng này hoặc protein gắn kết đặc hiệu với CD40, và kháng thể hoặc protein thể

hiện các đặc tính chức năng sau đây: là chất đối kháng CD40, thể hiện không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp, và không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc protein tương đồng với mAb1-mAb3, chứa vùng Fc IgG cam được chọn từ nhóm bao gồm vùng Fc của mAb1 (SEQ ID NO:17), vùng Fc của mAb2 (SEQ ID NO:18) và vùng Fc của mAb3 (SEQ ID NO:19), và chứa các trình tự chuỗi nặng biến đổi (V_H) và chuỗi nhẹ biến đổi (V_L) trong đó các trình tự CDR có chung ít nhất 60, 70, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc 100 phần trăm trình tự đồng nhất với các trình tự CDR tương ứng của mAb1-mAb3, các SEQ ID NO từ 1-6 tương ứng, trong đó kháng thể tương đồng này hoặc protein gắn kết đặc hiệu với CD40, và kháng thể tương đồng hoặc protein thể hiện các đặc tính chức năng sau đây: là chất đối kháng CD40, thể hiện không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp, và không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Theo một phương án cụ thể có liên quan, kháng thể tương đồng hoặc protein

- a) gắn kết với CD40 với K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn;
- b) ức chế truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L với trị số IC_{50} bằng 50ng/ml hoặc nhỏ hơn như được đo bằng thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L được nêu trong phần Ví dụ;
- c) không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp như được đo bằng thử nghiệm sinh học như thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L như được mô tả trong phần Ví dụ; và,
- d) không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc protein tương đồng với mAb1-mAb3, chứa vùng Fc IgG cam được chọn từ nhóm bao gồm vùng Fc của mAb1 (SEQ ID NO:17), vùng Fc của mAb2 (SEQ ID NO:18) và vùng Fc của mAb3 (SEQ ID NO:19), và chứa các trình tự chuỗi nặng biến đổi (V_H) và chuỗi nhẹ biến đổi (V_L) mà có chung ít nhất 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc 100 phần trăm trình tự đồng nhất với các trình tự (V_H) và (V_L) tương ứng của mAb1-mAb3, tương ứng SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8, trong đó kháng thể tương đồng này hoặc protein gắn kết đặc hiệu với CD40, và kháng thể hoặc protein thể hiện các đặc tính chức năng sau đây: là chất đối kháng CD40, thể hiện không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp, và không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Theo một phương án cụ thể có liên quan, kháng thể tương đồng này hoặc protein

- a) gắn kết với CD40 với K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn;
- b) ức chế truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L với IC_{50} bằng 50ng/ml hoặc nhỏ hơn như được đo bằng thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L được nêu trong phần Ví dụ;
- c) không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp như được đo bằng thử nghiệm sinh học như thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L được nêu trong phần Ví dụ; và,
- d) không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Theo một ví dụ khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc protein tương đồng với mAb1-mAb3 chứa vùng Fc IgG cam được chọn từ nhóm bao gồm vùng Fc của mAb1 (SEQ ID NO:17), vùng Fc của mAb2 (SEQ ID NO:18) và vùng Fc của mAb3 (SEQ ID NO:19), và trong đó: các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc 100% đồng nhất với trình tự nucleotit lần lượt mã hóa của các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi của mAb1-mAb3, trong đó kháng thể tương đồng này hoặc protein gắn kết đặc hiệu với CD40, và kháng thể hoặc protein thể hiện các đặc tính chức năng sau đây: là chất đối kháng CD40, thể hiện không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp, và không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Theo một phương án cụ thể có liên quan, kháng thể tương đồng này hoặc protein

- a) gắn kết với CD40 với K_D bằng 1nM hoặc nhỏ hơn;
- b) ức chế việc truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L với trị số IC_{50} bằng 50ng/ml hoặc nhỏ hơn như được đo bằng thử nghiệm tăng sinh qua trung gian CD40L được nêu trong phần Ví dụ;
- c) không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp như được đo bằng thử nghiệm sinh học như thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L được nêu trong phần Ví dụ; và,
- d) không có hoặc có hoạt tính ADCC thấp.

Kháng thể với các trình tự axit amin đột biến có thể thu được bằng cách gây đột biến (ví dụ, gây đột biến trực tiếp vị trí hoặc qua trung gian PCR) của phân tử axit nucleic mã hóa, tiếp theo thử nghiệm kháng thể biến đổi được mã hóa về chức năng được giữ nguyên (nghĩa là, các chức năng được trình bày ở trên) bằng cách sử dụng các thử nghiệm chức năng được nêu trong phần Ví dụ dưới đây.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc protein tương đồng với mAb1-mAb3 như nêu trên có các cải biến trình tự bảo toàn.

Như được dùng ở đây, thuật ngữ "cải biến trình tự bảo toàn" được dự định đề cập đến sự thay thế axit amin trong đó gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin có chuỗi phụ tương tự. Các họ gốc axit amin có các mạch bên tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này bao gồm các axit amin có chuỗi phụ bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các mạch bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên phân cực không điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein, tryptophan), các mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), các mạch bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, một hoặc nhiều gốc axit amin trong các vùng CDR của kháng thể theo sáng chế có thể được thay thế bằng các gốc axit amin khác trong cùng họ mạch bên, và kháng thể biến đổi có thể được thử nghiệm về chức năng được giữ lại bằng cách sử dụng các thử nghiệm chức năng được nêu ở đây.

Các cải biến có thể được đưa vào kháng thể theo sáng chế bằng các kỹ thuật chuẩn đã được biết trong lĩnh vực này, như gây đột biến trực tiếp vị trí và gây đột biến qua trung gian PCR.

Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc protein theo sáng chế

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc protein theo sáng chế như nêu ở trên.

Các ví dụ về các trình tự nucleotit chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể mAb1 đến mAb3 có thể có trong Bảng 3 (thể hiện toàn bộ các trình tự mã hóa nucleotit của các chuỗi nặng và nhẹ của mAb1 đến mAb3).

Các ví dụ khác về các trình tự nucleotit chuỗi nhẹ và nặng theo sáng chế là trình tự bất kỳ mã hóa các trình tự axit amin chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb1, mAb2 hoặc mAb3 như được mô tả trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề cập đến các phân tử axit nucleic mà có nguồn gốc từ các trình tự sau cùng được tối ưu hóa để biểu hiện protein trong các tế bào động vật có vú, ví dụ, các dòng tế bào CHO.

Các axit nucleic có thể có mặt trong các tế bào nguyên vẹn, trong dịch phân giải tế bào, hoặc có thể là các axit nucleic ở dạng được tinh chế một phần hoặc về cơ bản là tinh khiết. Axit nucleic "được phân lập" hoặc "được làm cho gần tinh khiết" khi được tinh chế ra khỏi các thành phần tế bào khác hoặc các tạp chất khác, ví dụ, các axit nucleic hoặc các protein tế bào khác, bằng các kỹ thuật chuẩn, bao gồm việc xử lý bằng kiềm/SDS, dải băng CsCl, sắc ký cột, điện di trên gel agarosa và các phương pháp khác đã được biết đến trong lĩnh vực. Xem tài liệu, F. Ausubel, *et al.*, ed. 1987 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Axit nucleic theo sáng chế có thể là, ví dụ, ADN hoặc ARN và có thể chứa hoặc không chứa các trình tự intron. Theo một phương án, axit nucleic là phân tử cADN. Axit nucleic có thể có mặt trong vector như vector biểu hiện thể thực khuẩn, hoặc trong vector plasmid tái tổ hợp.

Axit nucleic theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. Một khi các đoạn ADN mã hóa, ví dụ, các đoạn V_H và V_L thu được, các đoạn ADN này có thể còn được thao tác bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, ví dụ để chuyển các gen vùng biến đổi vào các gen chuỗi kháng thể có chiều dài đầy đủ, vào các gen của đoạn Fab hoặc vào gen của scFv. Trong các thao tác xử lý này, đoạn ADN mã hóa V_L hoặc V_H được liên kết động với một phân tử ADN khác, hoặc với đoạn mã hóa vùng cố định kháng thể của mAb1-mAb3 chứa vùng Fc như nêu trong SEQ ID NOs:17-19.

Thuật ngữ "liên kết động", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định nghĩa là hai đoạn ADN được nối theo cách chức năng, ví dụ, để cho các trình tự axit amin được mã hóa bởi hai đoạn ADN vẫn giữ ở trong khung, hoặc để cho protein được biểu hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mong muốn.

ADN phân lập mã hóa vùng V_H có thể được chuyển hóa thành gen chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ bằng cách liên kết động ADN mã hóa V_H với một phân tử ADN khác mã hóa các vùng cố định chuỗi nặng (CH1, CH2 và CH3). Các trình tự của gen vùng cố định chuỗi nặng của người đã được biết đến trong lĩnh vực này (xem tài liệu, ví dụ, Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các đoạn ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn. Vùng cố định chuỗi nặng có thể được chọn trong số các isotyp IgG1 chứa vùng Fc như nêu trong các SEQ ID NO:17-19.

ADN phân lập được mã hóa vùng V_L có thể được chuyển thành gen chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ (cũng như thành gen chuỗi nhẹ Fab) bằng cách liên kết động ADN mã hóa V_L với một phân tử ADN khác mã hóa vùng cố định chuỗi nhẹ, CL. Trình tự của các gen vùng cố định chuỗi nhẹ của người là đã biết trong lĩnh vực này (xem tài liệu ví dụ, Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) và các đoạn ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR chuẩn. Vùng cố định chuỗi nhẹ có thể là vùng cố định kapa hoặc lamda.

Tế bào u tủy chuyển nhiễm để sản xuất kháng thể đơn dòng

Kháng thể hoặc các protein theo sáng chế có thể được tạo ra trong tế bào u tủy chuyển nhiễm chủ, ví dụ, bằng cách kết hợp kỹ thuật ADN tái tổ hợp và các phương pháp chuyển nhiễm gen như đã được biết đến trong lĩnh vực này (ví dụ, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Ví dụ, để biểu hiện kháng thể, các ADN mã hóa một phần hoặc toàn bộ chuỗi nhẹ và nặng có thể thu được bằng các kỹ thuật sinh học phân tử hoặc hóa sinh chuẩn (ví dụ, tổng hợp hóa học ADN, khuếch đại PCR hoặc tách dòng cADN bằng cách sử dụng tế bào lai mà biểu diễn kháng thể quan tâm) và các ADN có thể được chèn vào các vector biểu hiện để cho các gen được liên kết động với các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "liên kết động" được dự định nghĩa là gen kháng thể được nối vào vector để cho các trình tự kiểm

soát phiên mã và dịch mã trong vector vận dụng chức năng của chúng để điều hòa sự phiên mã và dịch mã gen kháng thể. Vector biểu hiện và các trình tự kiểm soát sự biểu hiện được chọn là tương thích với tế bào chủ biểu hiện được sử dụng. Gen chuỗi nhẹ kháng thể và gen chuỗi nặng kháng thể có thể được đưa vào vector riêng biệt hoặc, thông thường hơn, cả hai gen được đưa vào cùng một vector biểu hiện.

Các gen kháng thể được đưa vào vector biểu hiện bằng các phương pháp chuẩn (ví dụ, nối các vị trí giới hạn bổ sung trên đoạn gen kháng thể và vector, hoặc nối đầu cùn nếu không có các vị trí giới hạn). Vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể được mô tả ở đây có thể được sử dụng để tạo ra các gen kháng thể có chiều dài đầy đủ bằng cách chèn chúng vào các vector biểu hiện đã mã hóa vùng cố định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của trình tự mong muốn tương ứng với các vùng cố định này của mAb1, mAb2 hoặc mAb3 để cho đoạn V_H liên kết động với (các) đoạn C_H trong vector và đoạn V_L được liên kết động với đoạn C_L trong vector. Ngoài ra hoặc theo cách khác, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc bài tiết chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen của chuỗi kháng thể có thể được tách dòng trong vector để cho peptit tín hiệu được liên kết trong vùng khung với đầu amino của gen của chuỗi kháng thể. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu của globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (nghĩa là, peptit tín hiệu từ protein không phải globulin miễn dịch).

Ngoài các gen của chuỗi kháng thể, các vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế mang các trình tự điều hòa mà kiểm soát sự biểu hiện của các gen của chuỗi kháng thể trong tế bào chủ. Thuật ngữ "trình tự điều hòa" được dự định bao gồm gen khởi đầu, gen tăng cường và các yếu tố đối chứng biểu hiện khác (ví dụ, các tín hiệu polyadenyl hóa) mà kiểm soát quá trình phiên mã hoặc dịch mã của các gen của chuỗi kháng thể. Các trình tự điều hòa này được mô tả, ví dụ, trong tài liệu của Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng việc thiết kế vector biểu hiện, bao gồm việc lựa chọn các trình tự điều hòa, có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn tế bào cần biến nạp, mức biểu hiện của protein mong muốn, v.v.. Các trình tự điều hòa dùng cho việc biểu hiện tế bào chủ của động vật có vú bao gồm các yếu tố virus mà hướng vào mức biểu hiện

protein cao trong các tế bào động vật có vú, như các gen khởi đầu và/hoặc gen tăng cường có nguồn gốc từ cytomegalovirut (CMV), Simian Virut 40 (SV40), adenovirut (ví dụ, trình tự khởi đầu muộn chủ yếu của adenovirut (AdMLP)), và polyoma. Theo một cách khác, các trình tự điều hòa không phải của virut có thể được sử dụng, như gen khởi đầu ubiquitin hoặc gen khởi đầu P-globin. Ngoài ra, các yếu tố điều hòa bao gồm các trình tự từ các nguồn khác nhau, như hệ gen khởi đầu SRa, mà chứa các trình tự từ gen khởi đầu sớm SV40 và gen lặp lại dài ở đầu tận cùng của virut gây bệnh bạch cầu tế bào T người typ 1 (Takebe, Y. *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Ngoài ra, các gen của chuỗi kháng thể và các trình tự điều hòa, vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang các trình tự khác, như các trình tự điều hòa quá trình tái bản của vector trong các tế bào chủ (ví dụ, các điểm khởi đầu tái bản) và các gen đánh dấu chọn lọc. Gen đánh dấu chọn lọc tạo điều kiện thuận lợi cho việc đưa chọn lọc các vector này vào (xem, ví dụ, các patent Mỹ số 4,399,216, 4,634,665 và 5,179,017, tất cả đều của Axel và các đồng tác giả). Ví dụ, thông thường gen đánh dấu chọn lọc có tính kháng thuốc, như G418, hygromycin hoặc methotrexat, trên tế bào chủ mà vector này được đưa vào. Các gen đánh dấu chọn lọc bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) (để sử dụng trong các tế bào chủ dhfr để chọn lọc/khuếch đại methotrexat) và gen mới (để chọn lọc G418).

Để biểu hiện các chuỗi nhẹ và nặng, (các) vector biểu hiện mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ được chuyển nhiễm vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Nhiều dạng khác của thuật ngữ "chuyển tiếp" được dự định bao gồm một khoảng rộng các kỹ thuật thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào chủ chưa có nhân thực hoặc có nhân thực, ví dụ, điện di, kết tủa canxi-phosphat, chuyển nhiễm bằng DEAE-dextran và kỹ thuật tương tự. Về lý thuyết có thể biểu hiện kháng thể theo sáng chế trong các tế bào chủ chưa có nhân thực hoặc có nhân thực. Biểu hiện của kháng thể trong các tế bào có nhân thực, ví dụ các tế bào chủ của động vật có vú, nấm men hoặc nấm dạng sợi, được thảo luận bởi vì các tế bào có nhân thực này, và cụ thể là các tế bào của động vật có vú, là có vẻ thích hợp hơn các tế bào chưa có nhân thực để thu thập và tiết ra kháng thể gấp nếp và có hoạt tính miễn dịch thích hợp.

Theo một phương án cụ thể, vector tách dòng hoặc biểu hiện theo sáng chế chứa ít nhất một trong số các trình tự mã hóa từ (a)-(c) sau đây, liên kết động với các trình tự gen khởi đầu thích hợp:

- (a) SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23 lần lượt mã hóa chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb1;
- (b) SEQ ID NO:24 và SEQ ID NO:25 lần lượt mã hóa chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb2; hoặc,
- (c) SEQ ID NO:26 và SEQ ID NO:27 lần lượt mã hóa chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb3.

Các tế bào chủ của động vật có vú để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung quốc (tế bào CHO) (bao gồm các tế bào dhfr-CHO, được mô tả bởi tài liệu Urlaub và Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 sử dụng chất đánh dấu chọn lọc DH FR, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu R.J. Kaufman và P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), các dòng tế bào CHOK1 dhfr+, các tế bào u tủy NSO, các tế bào COS và các tế bào SP2. Cụ thể là, để sử dụng với các tế bào u tủy NSO, một hệ biểu hiện khác là hệ biểu hiện gen GS được trình bày trong công bố đơn PCT số WO 87/04462, WO 89/01036 và patent châu Âu số EP 0 338 841.

Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa các gen kháng thể được đưa vào các tế bào chủ của động vật có vú, thì kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong một khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong các tế bào chủ hoặc tiết kháng thể vào môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào chủ được phát triển. Kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp tinh chế protein chuẩn (Xem tài liệu ví dụ Abhinav *et al.* 2007, Journal of Chromatography 848: 28-37).

Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ theo sáng chế là tế bào chủ được chuyển nhiễm vector biểu hiện có các trình tự mã hóa được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự (a)-(c) thích hợp để biểu hiện mAb1-mAb3 tương ứng, được liên kết động được với các trình tự gen khởi đầu thích hợp:

- (a) SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23;
- (b) SEQ ID NO:24 và SEQ ID NO:25; và,

(c) SEQ ID NO:26 và SEQ ID NO:27.

Các tế bào chủ sau đó có thể còn được nuôi cấy tiếp trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện và sản xuất kháng thể theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm mAb1-mAb3 tương ứng.

Phân tử đặc hiệu kép

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu bao gồm kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế. Kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được tạo dẫn xuất từ hoặc được liên kết với một phân tử chức năng khác, ví dụ, một peptit hoặc protein khác (ví dụ, một kháng thể hoặc phối tử khác cho thụ thể) để tạo thành phân tử đặc hiệu kép mà gắn kết với ít nhất hai vị trí gắn kết hoặc các phân tử đích khác nhau. Kháng thể theo sáng chế thực tế có thể được tạo dẫn xuất hoặc được liên kết với hơn một phân tử chức năng khác để tạo ra phân tử đa đặc hiệu mà gắn kết với nhiều hơn hai vị trí gắn kết và/hoặc phân tử đích khác nhau; phân tử đa đặc hiệu này cũng dự định được nằm trong thuật ngữ "phân tử đặc hiệu kép" như được dùng ở đây. Để tạo ra phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế, kháng thể hoặc protein theo sáng chế có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng cách ghép đôi hóa học, dung hợp di truyền, liên kết không cộng hóa trị hoặc kiểu liên kết khác) với một hoặc nhiều phân tử liên kết khác, như một kháng thể khác, đoạn kháng thể, peptit hoặc đoạn bất chức gắn kết, để thu được phân tử đặc hiệu kép.

Do đó, sáng chế bao gồm các phân tử đặc hiệu kép có ít nhất một tính đặc hiệu liên kết thứ nhất với CD40, ví dụ, một phần gắn kết với kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số mAb1-mAb3 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai với epitop đích thứ hai. Ví dụ, epitop đích thứ hai là một epitop khác của CD40 khác với epitop đích thứ nhất. Một ví dụ khác là phân tử đặc hiệu kép có ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất với CD40, ví dụ, một phần gắn kết với kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số mAb1-mAb3 và tính đặc hiệu gắn kết thứ hai với epitop trong CD40.

Ngoài ra, đối với sáng chế trong đó phân tử đặc hiệu kép là đa đặc hiệu, thì phân tử có thể còn có tính đặc hiệu gắn kết thứ ba, ngoài tính đặc hiệu với epitop đích thứ nhất và thứ hai.

Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách liên hợp các tính đặc hiệu gắn kết thành phần, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, mỗi tính đặc hiệu gắn kết của phân tử đặc hiệu kép có thể được tạo ra riêng biệt và sau đó liên hợp với nhau. Khi tính đặc hiệu gắn kết là các protein hoặc peptit, nhiều chất ghép đôi hoặc liên kết chéo có thể được sử dụng để liên hợp cộng hóa trị. Các ví dụ về chất liên kết chéo bao gồm protein A, carbodiimite, N-succinimidyl-S-axetyl-thioaxetat (SATA), 5,5'-dithiobis(axit 2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylendimaleimite (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (xem tài liệu ví dụ, Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al.*, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp khác được mô tả trong tài liệu Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan *et al.*, 1985 Science 229:81-83), và Glennie *et al.*, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Các chất liên hợp là SATA và sulfo-SMCC, cả hai có sẵn từ Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Khi tính đặc hiệu gắn kết là với kháng thể, thì chúng có thể được liên hợp bằng liên kết sulfhydryl của các vùng bản lề đầu tận cùng C của hai chuỗi nặng. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề được cải biến để chứa một số lẻ các gốc sulfhydryl, ví dụ một, trước khi liên hợp.

Theo cách khác, cả hai tính đặc hiệu gắn kết có thể được mã hóa trong cùng một vector và được biểu hiện và thu thập trong cùng một tế bào chủ. Phương pháp này là đặc biệt hữu ích khi phân tử đặc hiệu kép là mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ hoặc protein dung hợp phối tử x Fab. Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể là phân tử chuỗi đơn chứa một kháng thể chuỗi đơn và yếu tố quyết định gắn kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa hai quyết định gắn kết. Các phân tử đặc hiệu kép có thể chứa ít nhất hai phân tử chuỗi đơn. Các phương pháp bào chế phân tử đặc hiệu kép được mô tả ví dụ trong patent Mỹ số 5,260,203; patent Mỹ số 5,455,030; Patent Mỹ số 4,881,175; Patent Mỹ số 5,132,405; Patent Mỹ số 5,091,513; Patent Mỹ số 5,476,786; Patent Mỹ số 5,013,653; Patent Mỹ số 5,258,498; và Patent Mỹ số 5,482,858.

Việc gắn kết các phân tử đặc hiệu kép với các đích đặc hiệu của chúng có thể được xác định bằng, ví dụ, thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, sự ức chế tăng trưởng), hoặc thử nghiệm thẩm tách Western. Mỗi thử nghiệm trong số các thử nghiệm này nhìn chung phát hiện sự có mặt của phức protein-kháng thể đang quan tâm cụ thể bằng cách dùng chất đánh dấu (ví dụ, kháng thể) đặc hiệu với phức đang quan tâm.

Kháng thể đa hóa trị

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đa hóa trị chứa ít nhất hai phần gắn kết với kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau của kháng thể theo sáng chế gắn kết với CD40, ví dụ, được chọn từ các phần gắn kết với kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể mAb1-mAb3. Theo một phương án, kháng thể đa hóa trị có ít nhất hai, ba hoặc bốn phần gắn kết với kháng nguyên của kháng thể. Các phần gắn kết với kháng nguyên có thể được liên kết với nhau thông qua dung hợp protein hoặc liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Theo một cách khác, các phương pháp liên kết đã được mô tả đối với các phân tử đặc hiệu kép. Các hợp chất hóa trị bốn có thể thu được ví dụ bằng liên kết chéo các kháng thể trong số các kháng thể theo sáng chế với kháng thể mà liên kết với các vùng cố định của kháng thể theo sáng chế, ví dụ Fc hoặc vùng bản lề.

Phương pháp điều trị bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD40 đối kháng theo sáng chế

Các phương pháp theo sáng chế hướng vào việc sử dụng kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế để điều trị đối tượng (nghĩa là, bệnh nhân) bị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, hoặc có xu hướng phát triển bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, trong đó bệnh và/hoặc viêm được gây ra bởi việc truyền tín hiệu CD40 qua trung gian CD40L trên các tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40.

Các phương pháp phát hiện sự biểu hiện CD40 trên các tế bào đã được biết đến trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các kỹ thuật PCR, hóa mô học miễn dịch, đếm tế bào theo dòng chảy, thử nghiệm thẩm tách Western, ELISA, và phương pháp tương tự.

Các phương pháp theo sáng chế là đặc biệt hữu ích để điều trị bệnh viêm và/hoặc bệnh tự miễn trong đó có liên quan đến sự kích thích CD40 qua trung gian CD40L.

Các bệnh viêm được đặc trưng bởi phản ứng viêm và sự phá hủy mô, hoặc sự kết hợp của hai triệu chứng đó. "Bệnh viêm" bao gồm quá trình gây ra miễn dịch viêm bất kỳ trong đó hiện tượng bắt đầu hoặc đích của đáp ứng miễn dịch có liên quan đến không phải bản thân (các) kháng nguyên, bao gồm, ví dụ, kháng nguyên cùng loài, kháng nguyên khác loài, kháng nguyên virut, kháng nguyên vi khuẩn, kháng nguyên chưa biết, hoặc dị ứng nguyên.

Ngoài ra, đối với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ "(các) bệnh viêm" bao gồm "(các) bệnh tự miễn". Như được dùng ở đây, thuật ngữ "tự miễn" nhìn chung được hiểu là bao gồm các quy trình gây ra miễn dịch viêm có liên quan đến các tự kháng nguyên. Ở các bệnh tự miễn, (các) tự kháng nguyên gây ra các đáp ứng miễn dịch của vật chủ.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến việc điều trị bệnh viêm có liên quan đến sự thải ghép mô. "Sự thải ghép" hoặc "thải mảnh ghép" đề cập đến phản ứng miễn dịch liên quan đến vật chủ bất kỳ chống lại mảnh ghép bao gồm nhưng không giới hạn ở các kháng nguyên HLA, kháng nguyên nhóm máu, và kháng nguyên tương tự.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng để điều trị bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, ví dụ như là có liên quan đến sự cấy ghép tủy xương. Ở bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, tủy xương của người cho bao gồm các tế bào lympho và các tế bào mà trưởng thành thành các tế bào lympho. Các tế bào lympho của người cho nhận ra các kháng nguyên của người nhận như không phải tự kháng nguyên và gây ra phản ứng miễn dịch viêm. Do đó, như được dùng ở đây, "bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ" hoặc "phản ứng mảnh ghép chống lại vật chủ" đề cập đến phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T bất kỳ trong đó các tế bào lympho cho phản ứng với các kháng nguyên của vật chủ.

Kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein được mô tả ở đây, ví dụ mAb1, mAb2 hoặc mAb3, có thể được sử dụng theo các phương pháp theo sáng chế để điều trị các rối loạn tự miễn và/hoặc viêm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh luput ban đỏ dạng đĩa, bệnh viêm thận

luput, bệnh sarcoit, bệnh viêm khớp, kể cả bệnh viêm khớp ở thiếu niên, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp vảy nến, hội chứng Reiter, bệnh viêm cột sống dính khớp, và bệnh viêm khớp gut, sự thải mảnh ghép cơ quan hoặc mô, bệnh thải ghép rất nhạy, cấp hoặc mạn tính và/hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, bệnh đa xơ cứng, hội chứng siêu IgE, viêm đa động mạch nút, bệnh xơ ống mật nguyên phát, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh đường ruột (bệnh ruột nhạy cảm với gluten), hội chứng Sjögren nguyên phát (pSS), bệnh viêm gan tự miễn, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh vảy nến, bệnh xơ cứng bì, chứng nhược cơ năng, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh Grave, viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh phức hợp miễn dịch, bệnh suy nhược mạn tính, hội chứng rối loạn chức năng miễn dịch (CFIDS), viêm đa cơ và viêm da cơ, crioglobulin huyết, tan cục huyết, bệnh cơ tim, bệnh pemphigut thông thường, xơ hóa mô kẽ phổi, đái tháo đường typ I và typ II, sự nhạy cảm kiểu chậm kiểu 1, 2, 3, và 4, dị ứng hoặc rối loạn dị ứng, các phản ứng miễn dịch không mong muốn/không dự định với các protein điều trị (xem tài liệu, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2002/0119151 và Koren, *et al.* (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3: 349-60), hen, hội chứng Churg-Strauss (u hạt dị ứng), bệnh viêm da cơ địa, viêm da dị ứng và tiếp xúc kích thích, chứng mày đay, dị ứng qua trung gian IgE, chứng vữa xơ động mạch, viêm mạch có liên quan đến ANCA, viêm mạch, bệnh viêm cơ tự phát, bệnh tan máu, bệnh Alzheimer, bệnh đa dây thần kinh hủy myelin do viêm mạn tính, và tương tự.

Sự cắt bỏ di truyền hoặc ức chế được lý của con đường CD40-CD154 trước đây đã mô tả lợi ích điều trị trên mô hình lâm sàng hoặc tiền lâm sàng của SLE, pSS, ITP, MS, bệnh Crohn, bệnh pemphigut thông thường, viêm mạch tự miễn và RA (Law CL, Grewal IS. (2009). *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009;647:8-36); nhu cầu trong y học của chúng được nêu chi tiết dưới đây.

Theo các phương án ưu tiên, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế là có ích trong điều trị: (i) luput ban đỏ hệ thống (viêm thận lupus), tốt hơn là trong liệu pháp điều trị không steroid hữu hiệu để tạo ra và duy trì sự thuyên giảm, và phòng ngừa bệnh thận giai đoạn cuối; (ii) hội chứng Sjögren nguyên phát, tốt hơn là để phòng ngừa sự phá hủy tuyến nước bọt và tuyến nước mắt, và tạo ra và

duy trì sự thuyên giảm của biểu hiện ngoài tuyến; (iii) ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn, tốt hơn là điều trị cho bệnh nhân khó chữa bằng phương pháp điều trị chuẩn; (iv) viêm mạch liên quan đến ANCA, tốt hơn là tạo ra và duy trì sự thuyên giảm ở các bệnh nhân khó chữa bằng corticosteroid, và việc điều trị không steroid; (v) bệnh pemphigut thông thường, tốt hơn là trong việc tạo ra và duy trì sự thuyên giảm bệnh ở các bệnh nhân khó chữa bằng corticosteroid, và việc điều trị không steroid; (vi) đa xơ cứng, tốt hơn là trong các liệu pháp điều trị hữu hiệu hơn để phòng tái phát và sự tiến triển bệnh, và đạt được trạng thái không có bệnh; và (vii) bệnh Crohn, tốt hơn là trong các liệu pháp điều trị hữu hiệu hơn để duy trì sự thuyên giảm bệnh, và việc điều trị cho các bệnh nhân khó chữa bằng kháng TNF.

Theo một số phương án khác, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế là có ích trong điều trị viêm phổi bao gồm nhưng không bị giới hạn ở thải mảnh ghép phổi, hen, bệnh sarcoit, bệnh khí thũng, xơ nang, xơ hóa phổi tự phát, viêm phế quản mạn, viêm mũi dị ứng và bệnh dị ứng phổi như viêm thành phế nang quá nhạy cảm, viêm phổi tăng bạch cầu ái toan, viêm tiểu phế quản tắc nghẽn do cấy ghép tủy xương và/hoặc phổi hoặc các nguyên nhân khác, chứng vữa xơ động mạch ghép/xơ cứng tĩnh mạch ghép, cũng như xơ hóa phổi do collagen, mạch, và bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng bì và lupus ban đỏ.

"Điều trị" ở đây được định nghĩa là sự áp dụng hoặc việc dùng kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, cho đối tượng, hoặc sự áp dụng hoặc việc dùng được phẩm chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế này tới mô hoặc dòng tế bào phân lập từ đối tượng, trong đó đối tượng mắc bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, triệu chứng có liên quan đến bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, hoặc tình trạng dễ phát triển bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, trong đó mục đích là để chữa khỏi, làm lành, làm thuyên giảm, làm giảm bớt, thay đổi, chữa khỏi, làm cải thiện, làm cải tiến, hoặc tác động đến bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, các triệu chứng bất kỳ có liên quan đến bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, hoặc tình trạng dễ phát triển bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm.

Thuật ngữ "điều trị" cũng có nghĩa là sự áp dụng hoặc việc dùng được phẩm chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1,

mAb2 hoặc mAb3, cho đối tượng, hoặc sự áp dụng hoặc việc dùng được phẩm chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế này vào mô hoặc dòng tế bào phân lập từ đối tượng, trong đó đối tượng mắc bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, triệu chứng có liên quan đến bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, hoặc tình trạng dễ phát triển của bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, trong đó mục đích là để chữa khỏi, làm lành, làm thuyên giảm, làm giảm bớt, biến đổi, chữa khỏi, làm cải thiện, làm cải tiến, hoặc tác động đến bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, các triệu chứng bất kỳ có liên quan của bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, hoặc tình trạng dễ phát triển bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm.

Thuật ngữ "hoạt tính chống viêm" dự định nghĩa là việc làm giảm hoặc phòng viêm. Việc điều trị bằng ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế tạo ra đáp ứng sinh lý mà có lợi để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm, trong đó bệnh có liên quan đến các tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40. Đã nhận ra rằng các phương pháp theo sáng chế có thể có ích để phòng sự thay đổi kiểu hình ở các tế bào như sự tăng sinh, hoạt hóa, và tương tự.

Theo các phương pháp theo sáng chế, ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế như nêu trên đây được sử dụng để thúc đẩy đáp ứng điều trị dương tính để điều trị hoặc phòng bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch dương tính" đối với bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm nghĩa là sự cải thiện bệnh có liên quan đến hoạt tính chống viêm của các kháng thể hoặc các protein này, và/hoặc sự cải thiện các triệu chứng có liên quan đến bệnh. Đó là, tác dụng chống tăng sinh, phòng sự tăng sinh thêm tế bào biểu hiện CD40, làm giảm đáp ứng viêm bao gồm nhưng không bị giới hạn ở việc giảm tiết xytokin gây viêm, các phân tử kết dính, các proteaza, các globulin miễn dịch (trong các trường hợp trong đó tế bào mang CD40 là tế bào B), hỗn hợp của chúng, và tương tự, tăng sản xuất các protein chống viêm, làm giảm số lượng các tế bào tự phản ứng, tăng mức dung nạp miễn dịch, ức chế sự sống sót của tế bào tự phản ứng, và/hoặc giảm một hoặc nhiều triệu chứng do sự kích thích các tế bào biểu hiện CD40 gây ra có thể được quan sát. Các đáp ứng điều trị dương tính này không bị giới hạn ở đường dùng và có thể bao gồm việc dùng vào người cho, mô cho (ví dụ như truyền cơ quan), vật chủ, hỗn hợp bất kỳ của chúng, và tương tự.

Đáp ứng lâm sàng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc như chụp ảnh cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging - MRI), chụp ảnh bằng tia X, chụp cắt lớp bằng máy tính (computed tomographic - CT), đếm tế bào qua dòng chảy hoặc phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorter - FACS), mô học, bệnh học nói chung, và hóa học máu, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở các thay đổi phát hiện được bằng ELISA, RIA, phép sắc ký, và phương pháp tương tự. Ngoài ra, các đáp ứng điều trị dương tính này, đối tượng trải qua điều trị với kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế có thể tạo ra tác dụng có lợi là cải thiện các triệu chứng liên quan đến bệnh.

Thuật ngữ "liều hoặc lượng hữu hiệu để điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu" nghĩa là lượng kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế mà, khi được dùng đem lại đáp ứng điều trị dương tính để điều trị cho đối tượng mắc bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm.

Theo một số phương án của sáng chế, liều hữu hiệu điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, mAb1, mAb2 hoặc mAb3 nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 40mg/kg, từ 3mg/kg đến 20mg/kg hoặc từ 7mg/kg đến 12mg/kg. Đã nhận ra rằng phương pháp điều trị có thể bao gồm việc dùng duy nhất một liều hữu hiệu để điều trị hoặc dùng nhiều lần liều hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế.

Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế để theo dõi chẩn đoán lượng protein trong mô như một phần của quá trình thử nghiệm lâm sàng, ví dụ, để xác định hiệu quả của phác đồ điều trị cụ thể. Việc phát hiện có thể được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách kết hợp kháng thể với chất phát hiện được. Ví dụ về các chất phát hiện được bao gồm nhiều enzym, các nhóm giả, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất phát quang sinh học, và chất phóng xạ. Ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza của cây củ cải ngựa, phosphataza kiềm, P-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; ví dụ về các phức nhóm giả thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; ví dụ về các chất huỳnh quang thích hợp bao gồm umbeliferon, fluorescein, fluorescein isothiocyanat, rhodamin, diclotriazinylamin fluorescein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ của chất

phát quang bao gồm luminol; ví dụ về chất phát quang sinh học bao gồm luciferaza, luxiferin, và aequorin; và ví dụ về các chất phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , hoặc ^3H .

Kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ, mAb1, mAb2 hoặc mAb3 có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp điều trị bệnh tự miễn và viêm đã biết bất kỳ, bao gồm chất bất kỳ hoặc hỗn hợp của các chất mà đã được biết là có ích, hoặc chất được sử dụng hoặc hiện được sử dụng, để điều trị bệnh tự miễn và viêm. Các liệu pháp điều trị này và các chất điều trị bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phẫu thuật hoặc quy trình phẫu thuật (ví dụ thủ thuật cắt bỏ lá lách, thủ thuật cắt bỏ hạch bạch huyết, thủ thuật cắt bỏ tuyến giáp, tách huyết tương, tách bạch cầu khỏi máu, tế bào, mô, hoặc cấy ghép cơ quan, phẫu thuật làm giảm tắc nghẽn ruột, truyền qua cơ quan, và thủ thuật tương tự), liệu pháp phóng xạ, liệu pháp điều trị như liệu pháp dùng steroid và liệu pháp điều trị không dùng steroid, liệu pháp dùng hormone, liệu pháp dùng xytokin, liệu pháp dùng thuốc ngoài da (ví dụ, thuốc tại chỗ được sử dụng để điều trị các bệnh về da như dị ứng, viêm da tiếp xúc, và bệnh vẩy nến), liệu pháp ức chế miễn dịch, và liệu pháp dùng kháng thể đơn dòng chống viêm khác, và liệu pháp tương tự. Theo cách này, kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein được nêu ở đây được dùng kết hợp với ít nhất một liệu pháp điều trị khác, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phẫu thuật, truyền qua cơ quan, liệu pháp phóng xạ, liệu pháp dùng steroid, liệu pháp không dùng steroid, liệu pháp dùng kháng sinh, liệu pháp chống nấm, liệu pháp dùng hormone, liệu pháp dùng xytokin, liệu pháp dùng thuốc ngoài da (ví dụ, thuốc dùng tại chỗ được sử dụng để điều trị bệnh về da như dị ứng, viêm da tiếp xúc, và bệnh vẩy nến), liệu pháp ức chế miễn dịch, liệu pháp dùng kháng thể đơn dòng chống viêm khác, hỗn hợp của nó, và tương tự.

Do đó, khi liệu pháp điều trị kết hợp bao gồm việc dùng kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế như kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, kết hợp với việc dùng một chất điều trị khác, như với các steroid là một ví dụ, các phương pháp theo sáng chế bao gồm việc dùng đồng thời, bằng cách sử dụng các dược phẩm riêng biệt hoặc dược phẩm duy nhất, và việc dùng liên tiếp theo một trong hai thứ tự. Khi các phương pháp theo sáng chế bao gồm các phác đồ điều trị kết hợp,

các liệu pháp điều trị này có thể được dùng đồng thời, nghĩa là, kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế được dùng đồng thời hoặc trong cùng khung thời gian như liệu pháp điều trị khác (nghĩa là, các liệu pháp điều trị sẽ diễn ra đồng thời, nhưng kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế không được dùng chính xác ở cùng một thời điểm như liệu pháp điều trị khác). Theo cách khác, kháng thể kháng CD40 theo sáng chế hoặc protein theo sáng chế có thể cũng được dùng trước hoặc tiếp theo liệu pháp điều trị khác. Việc dùng liên tiếp các liệu pháp điều trị khác nhau có thể được thực hiện bất kể là liệu đối tượng được điều trị phản ứng với đợt điều trị đầu tiên có làm giảm khả năng thuyên giảm hoặc tái phát không.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, được dùng kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch hoặc thuốc chống viêm, trong đó kháng thể hoặc protein và (các) chất điều trị có thể được dùng liên tiếp, theo một trong hai thứ tự, hoặc đồng thời (nghĩa là, đồng thời hoặc trong cùng khung thời gian). Các ví dụ về thuốc ức chế miễn dịch thích hợp mà có thể được dùng kết hợp với kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, methotrexat, xyclophosphamit, mizoribin, clorambuxil, xyclosporin, như, ví dụ, xyclosporin được tạo sol khí (xem, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2002/0006901), tacrolimus (FK506; ProGrafrM), mycophenolat mofetil, và azathioprin (6-mercaptopurin), sirolimus (rapamycin), deoxyspergualin, leflunomit và chất tương tự malononitriloamit của nó; và các protein ức chế miễn dịch, bao gồm, ví dụ, kháng thể kháng CTLA4 và các thể dung hợp Ig, kháng thể kích thích kháng tế bào lympho B (ví dụ, LYMPHOSTAT-BTM) và các thể dung hợp Ig (BLyS-Ig), kháng thể kháng CD80 và etanercept (Enbrel (RTM)), cũng như kháng thể kháng tế bào T như kháng CD3 (OKT3), kháng CD4, và kháng thể tương tự. Các ví dụ về chất chống viêm thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, corticosteroid như, ví dụ, clobetasol, halobetasol, hydrocortison, triamcinolon, betamethason, fluocinol, fluocinonit, prednison, prednisolon, metylprednisolon; thuốc chống viêm không steroid (các NSAID) như, ví dụ, sulfasalazin, các thuốc chứa mesalamin (cũng được biết là chất 5-ASA), celecoxib, diclofenac, etodolac, fenpropfen, flurbiprofen, ibuprofen,

ketoprofen, meclofamat, meloxicam, nabumeton, naproxen, oxaprozin, piroxicam, rofecoxib, salixylat, sulindac, và tolmetin; chất ức chế phosphodiesteraza-4, kháng thể chống viêm như adalimumab (HUMERA (RTM), chất đối kháng TNF- α) và infliximab (Remicade, chất đối kháng TNF- α), và tương tự. Cũng được bao gồm là các chất điều hòa miễn dịch được sử dụng hiện nay hoặc có tiềm năng sử dụng để điều trị bệnh tự miễn, như thalidomit hoặc chất tương tự nó như lenalidomit.

Sự thải ghép và bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ có thể là siêu cấp tính (thể dịch), cấp tính (qua trung gian tế bào T), hoặc mạn tính (bệnh học chưa biết), hoặc hỗn hợp của chúng. Do đó, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, được sử dụng trong một số phương án để phòng và/hoặc làm thuyên giảm sự thải và/hoặc các triệu chứng có liên quan đến sự thải ghép siêu cấp tính, cấp tính, và/hoặc mạn tính của mô bất kỳ, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, gan, thận, tụy, các tế bào đảo tụy, ruột non, phổi, tim, giác mạc, da, mạch máu, xương, tủy xương khác loại hoặc cùng loại, và tương tự. Các mô ghép có thể thu được từ người cho bất kỳ và được cấy ghép vào vật chủ nhận bất kỳ, và do đó quá trình cấy ghép có thể bao gồm việc cấy mô động vật vào người (ví dụ ghép ngoại lai), cấy ghép mô từ một người vào một người khác (ví dụ ghép cùng loại), và/hoặc cấy ghép mô từ một phần cơ thể của người vào một phần khác (ví dụ tự ghép).

Việc điều trị bằng kháng thể hoặc các protein theo sáng chế có thể cũng làm giảm di chứng do cấy ghép như sốt, chứng biếng ăn, các bất thường về huyết động học, chứng giảm bạch cầu, thâm nhiễm tế bào bạch cầu qua mô/cơ quan cấy ghép, cũng như nhiễm trùng cơ hội.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch để điều trị và/hoặc phòng sự thải ghép như sự thải siêu cấp tính, cấp tính, và/hoặc mạn tính và/hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ.

Do đó, theo một số phương án khi kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế được sử dụng để điều trị thải mảnh ghép, kháng thể, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, có thể được sử dụng kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch

thích hợp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, methotrexat; xyclophosphamit; mizoribin; clorambuxil; xyclosporin, như, ví dụ, xyclosporin được tạo sol khí (xem, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20020006901), tacrolimus (FK506; ProGrafm), mycophenolat mofetil, và azathioprin (6-mercaptopurin), sirolimus (rapamycin), deoxyspergualin, leflunomit và chất tương tự malononitriloamit; chất điều biến miễn dịch, bao gồm ví dụ thalidomit và chất tương tự của nó; và các protein ức chế miễn dịch, bao gồm, ví dụ, kháng thể kháng CTLA và các thể dung hợp Ig, kháng thể kích thích kháng tế bào lympho B (ví dụ, LYMPHOSTAT-BTM) và các thể dung hợp Ig (BLyS-Ig), kháng thể kháng CD80 và etanercept (Enbrel (RTM)), cũng như kháng thể kháng tế bào T như kháng CD3 (OKT3), kháng CD4, và kháng thể tương tự.

Vì thế, sáng chế đặc biệt đề cập đến được phẩm và các phương pháp theo sáng chế được sử dụng kết hợp với các thuốc khác để cải thiện thêm các triệu chứng và hậu quả ở người nhận cấy ghép, như người nhận ghép phổi hoặc thận. Do đó, theo một số phương án, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, được sử dụng để điều trị sự thải ghép (như, ví dụ sự thải siêu cấp tính, cấp tính, và/hoặc mạn tính hoặc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ ở người nhận ghép phổi hoặc thận) một mình hoặc kết hợp với xyclosporin dùng ngoài đường tiêu hóa và/hoặc không dùng ngoài đường tiêu hóa, bao gồm ví dụ xyclosporin dùng qua đường miệng, xyclosporin tiêm, xyclosporin được tạo sol khí (ví dụ xông), và hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án khi ít nhất một thành phần của liệu pháp điều trị là xyclosporin được tạo sol khí, thì xyclosporin được phân phối vào phổi của người nhận bằng cách xông xyclosporin trong dạng phun sol khí bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị phân phối được tạo áp hoặc ống phun. Xyclosporin có thể được dùng ở dạng bột khô hoặc dạng ướt. Xyclosporin có thể được dùng với liều dùng dưới liều điều trị.

Theo một số phương án khác, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch để điều trị và/hoặc phòng viêm khớp dạng thấp. Do đó theo một số phương án khi kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế; ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, được sử dụng để điều trị

bệnh viêm khớp dạng thấp, kháng thể này hoặc các protein có thể được sử dụng kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch thích hợp, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, methotrexat, xyclophosphamit, mizoribin, clorambuxil, xyclosporin, tacrolimus (FK506; PROGRAFTM), mycophenolat mofetil, và azathioprin (6-mercaptopurin), sirolimus (rapamycin), deoxyspergualin, leflunomit và chất tương tự malononitriloamit của nó; và các protein ức chế miễn dịch, bao gồm, ví dụ, kháng thể kháng CTLA và các thể dung hợp Ig, kháng thể kích thích kháng tế bào lympho B (ví dụ, LYMPHOSTAT-BTM) và các thể dung hợp Ig (BLyS-Ig), kháng thể kháng CD20 (ví dụ RITUXAN (g)); kháng thể người đầy đủ HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/1-131, tositumomab (Bexxar (D), ibritumomab tituxetan (Zcvalin (RTM)); kháng thể kháng CD80, và etanercept (ENBREL), cũng như kháng thể kháng tế bào T như kháng CD3 (OKT3), kháng CD4, và kháng thể tương tự. Như được bàn luận ở trên, hiệu quả điều trị có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các biện pháp bất kỳ và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, hiệu quả như được đánh giá bằng các đáp ứng lâm sàng được xác định bằng tiêu chí của American College of Rheumatology, tiêu chí của European League of Rheumatism, hoặc tiêu chí khác bất kỳ. Xem tài liệu ví dụ, Felson *et al.* (1995) *Arthritis. Rheum.* 38 : 727-35 và van Gestel *et al.* (1996) *Arthritis Rheum.* 39: 34-40.

Theo các phương án khác nữa, kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch để điều trị và/hoặc phòng bệnh đa xơ cứng. Do đó, theo một số phương án khi kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, được sử dụng để điều trị đa xơ cứng, kháng thể có thể được sử dụng kết hợp với thuốc ức chế miễn dịch thích hợp, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, methotrexat, xyclophosphamit, mizoribin, clorambuxil, xyclosporin, tacrolimus (FK506; PROGRAFTM), mycophenolat mofetil, và azathioprin (6-mercaptopurin), sirolimus (rapamycin), deoxyspergualin, leflunomit và chất tương tự malononitriloamit của nó; và các protein ức chế miễn dịch, bao gồm, ví dụ, kháng thể kháng CTLA và các thể dung hợp Ig, kháng thể kích thích kháng tế bào lympho B (ví dụ, LYMPHOSTAT-BTM)

và các thể dung hợp Ig (BLyS-Ig), kháng thể kháng CD20 (ví dụ, RITUXAN (D); kháng thể người có chiều dài đầy đủ HuMax-CD20, R-1594, IMMIJ-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/1-131, tositumomab (Bexxar (RTM)), ibritumomab tituxetan (Zevalin (RTM)); kháng thể kháng CD80, và etanercept (ENBREL), cũng như kháng thể kháng tế bào T như kháng CD3 (OKT3), kháng CD4, các chất có liên quan đến sự điều biến thụ thể S1P, bao gồm ví dụ fingolimod; và chất tương tự.

Dược phẩm và cách dùng

Kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế được dùng ở nồng độ mà hữu hiệu điều trị để phòng hoặc điều trị các bệnh tự miễn và/hoặc các bệnh viêm và/hoặc để phòng hoặc làm giảm các nguy cơ có liên quan đến thải mảnh ghép trong việc cấy ghép.

Để thực hiện mục đích này, kháng thể có thể được bào chế bằng cách sử dụng nhiều tá dược chấp nhận được đã biết trong lĩnh vực này. Thông thường, kháng thể hoặc các protein được dùng bằng cách tiêm, ví dụ, qua tĩnh mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Các phương pháp để thực hiện việc dùng này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cũng có thể bào chế được phẩm mà có thể dùng tại chỗ hoặc qua đường miệng, hoặc có khả năng chuyển qua màng niêm mạc.

Việc dùng qua đường tĩnh mạch tốt hơn là thực hiện bằng cách truyền trong một khoảng thời gian từ 1 đến 10 giờ, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 đến 8 giờ, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng từ 2 đến 7 giờ, vẫn tốt hơn nữa là trong khoảng 4 đến 6 giờ, tùy theo kháng thể kháng CD40 hoặc protein đang được sử dụng. Lần truyền dược phẩm đầu tiên có thể được thực hiện trong khoảng thời gian từ 4 đến 6 giờ với các lần truyền tiếp theo được phân phối nhanh hơn. Các lần truyền tiếp theo có thể được dùng trong khoảng thời gian từ 1 đến 6 giờ, bao gồm, ví dụ, khoảng từ 1 đến 4 giờ, khoảng từ 1 đến 3 giờ, hoặc khoảng từ 1 đến 2 giờ.

Dược phẩm theo sáng chế được bào chế tương thích với đường dùng dự định của nó. Ví dụ về các đường dùng có thể bao gồm ngoài đường tiêu hóa, (ví dụ, trong tĩnh mạch (IV), trong cơ (IM), trong da, dưới da (SC), hoặc truyền), dùng qua đường miệng và phổi (ví dụ, xông), qua mũi, qua da (tại chỗ), qua niêm mạc, và qua trực tràng. Các dung dịch hoặc hỗn dịch được sử dụng để dùng ngoài đường tiêu

hóa, trong da, hoặc dưới da có thể bao gồm các thành phần sau đây: dung dịch pha loãng vô trùng như nước pha tiêm, dung dịch nước muối, dầu không bay hơi, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi tổng hợp khác; chất kháng khuẩn như rượu benzylic hoặc metyl paraben; chất chống oxi hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; chất tạo chelat như axit etylenđiamintetraaxetic; dung dịch đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat và chất điều chỉnh tính trương như natri clorua hoặc dextroza. Độ pH có thể được điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ, như axit clohydric hoặc natri hydroxit. Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được đóng vào ống tiêm, bơm tiêm 1 lần, hoặc lọ thủy tinh hoặc lọ nhựa chứa nhiều liều.

Kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế thông thường được tạo ra bằng kỹ thuật chuẩn trong dung dịch đệm được dụng, ví dụ, dung dịch nước muối vô trùng, nước đệm vô trùng, propylen glycol, hỗn hợp của chúng, v.v.. Các phương pháp bào chế chất có thể dùng được ngoài đường tiêu hóa được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990). Cũng xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 98/56418, mà mô tả được phẩm chứa kháng thể ổn định thích hợp để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế.

Lượng của ít nhất một kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein theo sáng chế được dùng để dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các yếu tố ảnh hưởng đến đường dùng và lượng tương ứng của ít nhất một kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh cụ thể trải qua liệu pháp điều trị, mức độ nặng của bệnh, tiền sử bệnh, và độ tuổi, chiều cao, cân nặng, sức khỏe, và tình trạng sinh lý của bệnh nhân trải qua liệu pháp điều trị. Tương tự, lượng kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein được dùng sẽ tùy thuộc vào đường dùng và việc đối tượng sẽ dùng liều đơn hoặc nhiều liều của chất này. Nói chung, liều dùng kháng thể kháng CD40 hoặc protein cao hơn là được ưu tiên với cân nặng của bệnh nhân tăng lên trải qua điều trị. Liều kháng thể kháng CD40 hoặc protein được dùng nằm trong khoảng từ 0,003mg/kg đến 50mg/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 40mg/kg.

Do đó, ví dụ, liều có thể là 0,01mg/kg, 0,03mg/kg, 0,1mg/kg, 0,3mg/kg, 0,5mg/kg, 1mg/kg, 1,5mg/kg, 2mg/kg, 2,5mg/kg, 3mg/kg, 5mg/kg, 7mg/kg,

10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 35mg/kg, 40mg/kg, 45mg/kg, hoặc 50mg/kg.

Theo một phương án khác của sáng chế, phương pháp bao gồm việc dùng nhiều liều kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc đoạn của nó. Phương pháp có thể bao gồm việc dùng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, hoặc nhiều hơn 40 liều hữu hiệu điều trị của dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc đoạn của nó. Tần xuất và khoảng cách dùng của nhiều liều dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein có thể dễ dàng được quyết định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, việc điều trị đối tượng bằng một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể hoặc protein có thể bao gồm một chất điều trị duy nhất hoặc, tốt hơn là, có thể bao gồm một loạt chất điều trị. Trong một ví dụ ưu tiên, đối tượng được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20mg/kg khối lượng cơ thể, mỗi lần một tuần trong khoảng thời gian từ 1 đến 10 tuần, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 8 tuần, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7 tuần, và thậm chí tốt hơn là trong khoảng 4, 5, hoặc 6 tuần. Việc điều trị có thể thực hiện hàng năm để phòng sự tái phát hoặc khi có dấu hiệu tái phát. Cũng cần hiểu đúng rằng liều dùng hữu hiệu của kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó được sử dụng để điều trị có thể tăng hoặc giảm trong đợt điều trị cụ thể. Các thay đổi trong liều dùng có thể do và trở nên rõ ràng từ các kết quả của thử nghiệm chẩn đoán như được nêu ở đây.

Do đó, theo một phương án, phác đồ dùng liều bao gồm việc dùng liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế vào các ngày 1, 7, 14, và 21 của đợt điều trị. Theo một phương án khác, phác đồ dùng liều bao gồm việc dùng liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế vào các ngày 1, 2, 3, 4, 5, 6, và 7 của một tuần trong đợt điều trị. Ngoài ra, các phương án bao gồm phác đồ dùng có việc dùng liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế vào các ngày 1, 3, 5, và 7 của một tuần trong đợt điều trị; phác đồ dùng bao gồm việc dùng liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế vào các ngày 1 và 3 của một tuần trong đợt

điều trị; và phác đồ dùng ưu tiên bao gồm việc dùng liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của ít nhất một kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế vào ngày 1 của một tuần trong đợt điều trị. Đợt điều trị có thể bao gồm 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, hoặc 1 năm. Các đợt điều trị có thể liên tiếp hoặc được cách nhau một ngày, 1 tuần, 2 tuần, 1 tháng, 3 tháng, 6 tháng, hoặc 1 năm. Liều nằm trong khoảng từ 0,003mg/kg đến 50mg/kg, từ 0,01mg/kg đến 40mg/kg, từ 0,01mg/kg đến 30mg/kg, từ 0,1mg/kg đến 30mg/kg, từ 0,5mg/kg đến 30mg/kg, từ 1mg/kg đến 30mg/kg, từ 3mg/kg đến 30mg/kg, từ 3mg/kg đến 25mg/kg, từ 3mg/kg đến 20mg/kg, từ 5mg/kg đến 15mg/kg, hoặc từ 7mg/kg đến 12mg/kg. Do đó, ví dụ, liều của một kháng thể kháng CD40 đối kháng bất kỳ hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, ví dụ liều kháng thể kháng CD40 đơn dòng hoặc protein theo sáng chế, có thể là 0,003mg/kg, 0,01mg/kg, 0,03mg/kg, 0,1mg/kg, 0,3mg/kg, 0,5mg/kg, 1mg/kg, 1,5mg/kg, 2mg/kg, 2,5mg/kg, 3mg/kg, 5mg/kg, 7mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 35mg/kg, 40mg/kg, 45mg/kg, 50mg/kg, hoặc các liều khác như vậy nằm trong khoảng từ 0,003mg/kg đến 50mg/kg. Liều hữu hiệu điều trị tương tự của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế có thể được sử dụng trong mỗi tuần dùng kháng thể.

Theo một cách khác, các liều hữu hiệu điều trị khác của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế có thể được sử dụng trong quá trình điều trị.

Theo một số phương án, liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được xác định khác ở đây có thể nằm trong khoảng liều dùng thấp hơn (nghĩa là, từ 0,003mg/kg đến 20mg/kg) với các liều tiếp theo nằm trong khoảng liều dùng cao hơn (nghĩa là, từ 20mg/kg đến 50mg/kg).

Theo các phương án khác, liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó như được xác định khác ở đây có thể nằm trong khoảng liều dùng cao hơn (nghĩa là, từ 20mg/kg đến 50mg/kg) với các liều tiếp theo nằm trong khoảng liều dùng thấp hơn (nghĩa là, từ 0,003mg/kg đến 20mg/kg). Do đó, theo một phương án, liều hữu hiệu điều trị đầu tiên của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của

nó là nằm trong khoảng từ 20mg/kg đến 35mg/kg, bao gồm khoảng 20mg/kg, khoảng 25mg/kg, khoảng 30mg/kg, và khoảng 35mg/kg, và các liều hữu hiệu điều trị tiếp theo của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế là nằm trong khoảng từ 5mg/kg đến 15mg/kg, bao gồm khoảng 5mg/kg, 8mg/kg, 10mg/kg, 12mg/kg, và khoảng 15mg/kg.

Theo một số phương án của sáng chế, liệu pháp điều trị kháng CD40 được bắt đầu bằng việc dùng "liều tải" của kháng thể hoặc protein theo sáng chế cho đối tượng có nhu cầu điều trị bằng kháng CD40. Thuật ngữ "liều tải" nghĩa là liều ban đầu của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế mà được dùng cho đối tượng, trong đó liều của kháng thể hoặc protein theo sáng chế được dùng nằm trong khoảng liều dùng cao hơn (nghĩa là, từ khoảng 20mg/kg đến 50mg/kg). "Liều tải" có thể được dùng dưới dạng dùng một lần, ví dụ, truyền một lần trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó được dùng đường tĩnh mạch, hoặc như việc dùng nhiều lần, ví dụ, truyền nhiều lần trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó được dùng trong tĩnh mạch, miễn là toàn bộ "liều tải" được dùng trong khoảng thời gian 24 giờ. Sau khi dùng "liều tải", đối tượng được dùng một hoặc nhiều liều hữu hiệu điều trị khác của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế. Các liều hữu hiệu điều trị tiếp theo có thể được dùng, ví dụ, theo phác đồ dùng hàng tuần, hoặc mỗi hai tuần một lần, mỗi ba tuần một lần, hoặc mỗi bốn tuần một lần. Theo các phương án này, các liều hữu hiệu điều trị tiếp theo nói chung nằm trong khoảng liều thấp hơn (nghĩa là từ 0,003mg/kg đến 20mg/kg).

Theo cách khác, theo một số phương án, sau khi dùng "liều tải", các liều hữu hiệu điều trị tiếp theo của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế được dùng theo "phác đồ duy trì", trong đó liều hữu hiệu điều trị của kháng thể hoặc protein theo sáng chế được dùng mỗi lần 1 tháng, mỗi 6 tuần một lần, mỗi hai tháng một lần, mỗi 10 tuần một lần, mỗi ba tháng một lần, mỗi 14 tuần một lần, mỗi bốn tháng một lần, mỗi 18 tuần một lần, mỗi 5 tháng một lần, mỗi 22 tuần một lần, mỗi 6 tháng một lần, mỗi 7 tháng một lần, mỗi 8 tháng một lần, mỗi 9 tháng một lần, mỗi 10 tháng một lần, mỗi 11 tháng một lần, hoặc mỗi 12 tháng một lần. Theo các phương án này, các liều hữu hiệu điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế nằm trong khoảng liều thấp hơn (nghĩa là, từ 0,003mg/kg đến

20mg/kg), cụ thể là khi các liều tiếp theo được dùng ở các khoảng cách thường xuyên hơn, ví dụ, mỗi hai tuần một lần đến mỗi tháng một lần, hoặc trong khoảng liều cao hơn (nghĩa là, từ 20mg/kg đến 50mg/kg), cụ thể là khi các liều tiếp theo được dùng ở các khoảng cách thường xuyên nhỏ hơn, ví dụ, khi các liều tiếp theo được dùng cách nhau một tháng đến 12 tháng.

Dược phẩm bất kỳ chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế có đặc tính chức năng mong muốn được nêu ở đây như làm hoạt chất điều trị có thể được sử dụng trong các phương pháp của sáng chế. Do đó, dược phẩm lỏng, được đông khô, hoặc sấy phun chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, có thể được bào chế dưới dạng dung dịch hoặc hỗn dịch chứa nước hoặc không chứa nước để dùng tiếp theo cho đối tượng theo các phương pháp của sáng chế.

Mỗi dược phẩm trong số các dược phẩm này sẽ chứa ít nhất một kháng thể trong số các kháng thể kháng CD40 hoặc các protein theo sáng chế làm hoạt chất điều trị hoặc phòng bệnh.

Thuật ngữ "hoạt chất điều trị hoặc phòng bệnh" nghĩa là kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế được đưa cụ thể vào dược phẩm để gây ra đáp ứng điều trị hoặc phòng bệnh mong muốn để điều trị, phòng, hoặc chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng bệnh trong đó đối tượng được dùng dược phẩm. Tốt hơn là, dược phẩm chứa chất ổn định thích hợp, chất đệm, hoặc cả hai để hạn chế tối thiểu các vấn đề có liên quan đến việc mất ổn định protein và hoạt tính sinh học trong quá trình bào chế và bảo quản.

Các thành phần có thể được thêm vào dược phẩm bao gồm kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế. Các thành phần này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu, polyme, vitamin, carbohydrat, axit amin, muối, dung dịch đệm, albumin, chất hoạt động bề mặt, hoặc chất đệm. Tốt hơn là, các carbohydrat bao gồm đường hoặc rượu đường như mono-, di-, hoặc polysacarit, hoặc các glucan hòa tan trong nước. Sacarit hoặc glucan có thể bao gồm fructoza, glucoza, mannoza, sorboza, xyloza, maltoza, sucroza, dextran, pululan, dextrin, α và β xyclodextrin, tinh bột hòa tan, hydroxyetyl tinh bột, và carboxymetylxenluloza, hoặc hỗn hợp của chúng.

"Rượu đường" được định nghĩa là hydrocacbon C_4 đến C_8 có nhóm hydroxyl và bao gồm galactitol, inositol, manitol, xylitol, sorbitol, glyxerol, và arabitol. Các đường hoặc rượu đường này có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp. Nồng độ đường hoặc rượu đường có thể nằm trong khoảng từ 1,0% đến 7% khối lượng/thể tích, tốt hơn nữa là từ 2,0% đến 6,0% khối lượng/thể tích. Ví dụ, các axit amin bao gồm dạng quay trái (L) của carnitin, arginin, và betain; tuy nhiên, có thể thêm các axit amin khác. Các polyme ưu tiên bao gồm polyvinylpyrrolidon (PVP) có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 2.000 đến 3.000, hoặc polyetylen glycol (PEG) có khối lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 3.000 đến 5.000. Chất hoạt động bề mặt có thể được thêm vào dược phẩm đã được trình bày trong các patent châu Âu số EP 270,799 và 268,110.

Ngoài ra, kháng thể có thể được biến đổi hóa học ví dụ bằng cách liên kết cộng hóa trị với polyme để làm tăng thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn của chúng. Các polyme ưu tiên, và các phương pháp gắn chúng vào các peptit, đã được trình bày trong các patent Mỹ số 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; và 4,609,546. Các polyme ưu tiên là các polyol được polyoxyetyl hóa và polyetylen glycol (PEG). PEG tan được trong nước ở nhiệt độ trong phòng và có công thức chung: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ trong đó R có thể là hydro, hoặc nhóm bảo vệ như nhóm alkyl hoặc alkanol. Tốt hơn là, nhóm bảo vệ có từ 1 đến 8 cacbon, tốt hơn nữa là metyl. Ký hiệu n là số nguyên dương, tốt hơn là từ 1 đến 1.000, tốt hơn nữa là từ 2 đến 500. PEG có khối lượng phân tử trung bình ưu tiên nằm trong khoảng từ 1.000 đến 40.000, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2.000 đến 20.000, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3.000 đến 12.000. Tốt hơn là, PEG có ít nhất một nhóm hydroxy, tốt hơn nữa là nhóm hydroxy tận cùng. Nhóm hydroxy này tốt hơn là được kích hoạt để phản ứng với nhóm amino tự do trên chất ức chế. Tuy nhiên, sẽ được hiểu rằng kiểu và lượng nhóm phản ứng có thể thay đổi để thu được PEG/kháng thể liên kết cộng hóa trị theo sáng chế.

Các polyol được polyoxyetyl hóa tan được trong nước là cũng có ích trong sáng chế.

Các polyol này bao gồm sorbitol được polyoxyetyl hóa, glucoza được polyoxyetyl hóa, glyxerol được polyoxyetyl hóa (POG), và polyol tương tự. POG

được ưu tiên. Một trong số các lý do là bởi vì khung glyxerol của glyxerol được polyoxyetyl hóa có cùng khung có trong tự nhiên ở, ví dụ, động vật và người ở các mono-, di-, triglyxerit. Do đó, việc phân nhánh này sẽ không cần được trình bày như chất lạ trong cơ thể. POG có khối lượng phân tử ưu tiên nằm trong cùng khoảng giống như PEG. Cấu trúc của POG được trình bày trong bài báo Knauf *et al.* (1988, J. Bio. Chem. 263: 15064-15070) và sự mô tả các thể tiếp hợp POG/IL-2 được tìm thấy trong patent Mỹ số 4,766, 106.

Một hệ phân phối thuốc khác để làm tăng thời gian bán thải trong hệ tuần hoàn là liposom.

Các phương pháp bào chế hệ phân phối liposom được thảo luận trong bài báo Gabizon *et al.* (1982) Cancer Research 42: 4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649: 129; và Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9: 467. Các hệ phân phối thuốc khác đã được biết đến trong lĩnh vực này và được nêu trong, ví dụ, bài báo Poznansky *et al.* (1980) Drug Delivery Systems (R. L. Juliano, ed., Oxford, N. Y.) pp. 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36: 277.

Thành phần bào chế được thêm vào dược phẩm nên tạo ra sự ổn định cho kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế. Tức là, kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế vẫn giữ được độ ổn định vật lý và/hoặc hóa học của nó và có đặc tính chức năng mong muốn, nghĩa là, một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính chức năng mong muốn như được nêu ở trên đây.

Các phương pháp kiểm tra độ ổn định protein đã được biết đến trong lĩnh vực này. Xem tài liệu, ví dụ, Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90; Lee, ed. (1991) Peptide and Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., New York, New York); và các thử nghiệm độ ổn định được mô tả dưới đây. Nói chung, độ ổn định protein được đo ở nhiệt độ được lựa chọn trong khoảng thời gian cụ thể. Theo các phương án được ưu tiên, dược phẩm chứa kháng thể ổn định tạo ra độ ổn định cho kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế khi được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C) trong ít nhất 1 tháng, ít nhất 3 tháng, hoặc ít nhất 6 tháng, và/hoặc ổn định ở khoảng 2-8°C trong ít nhất 6 tháng, ít nhất 9 tháng, ít nhất 12 tháng, ít nhất 18 tháng, ít nhất 24 tháng.

Protein như kháng thể, khi được bào chế trong dược phẩm, được coi là vẫn có độ ổn định vật lý ở thời điểm xác định nếu không thấy các dấu hiệu cảm quan (nghĩa là, biến màu hoặc mất độ trong) hoặc các dấu hiệu đo được (ví dụ, bằng cách sử dụng phép sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) hoặc sự tán xạ ánh sáng UV) của sự kết tủa, kết tụ và/hoặc biến chất trong dược phẩm đó. Đối với độ ổn định hóa học, protein như kháng thể, khi được bào chế trong dược phẩm, được coi như duy trì độ ổn định hóa học của nó ở thời điểm xác định nếu các số đo của độ ổn định hóa học chỉ ra rằng protein (nghĩa là, kháng thể) vẫn giữ hoạt tính sinh học quan tâm trong dược phẩm đó. Các phương pháp để kiểm tra các thay đổi về độ ổn định hóa học đã được biết đến trong lĩnh vực và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các phương pháp phát hiện các dạng biến đổi hóa học của protein như là do cắt, bằng cách sử dụng, ví dụ, SDS-PAGE, SEC, và/hoặc phép đo phổ khối ion hóa hấp thụ lade hỗ trợ khuôn/thời gian bay; và sự thoái biến có liên quan đến các thay đổi điện tích phân tử (ví dụ, có liên quan đến sự khử amit), bằng cách sử dụng, ví dụ, phép sắc ký trao đổi ion. Xem, ví dụ, các phương pháp được nêu dưới đây.

Kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, khi được bào chế trong dược phẩm, được coi là vẫn có hoạt tính sinh học mong muốn ở thời điểm xác định nếu hoạt tính sinh học mong muốn ở thời điểm đó là khoảng 30%, tốt hơn là khoảng 20% hoạt tính sinh học mong muốn được thể hiện ở thời điểm dược phẩm được bào chế như được xác định trong thử nghiệm thích hợp về hoạt tính sinh học mong muốn. Các thử nghiệm đo hoạt tính sinh học mong muốn của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein được mô tả ở đây, có thể được thực hiện như được mô tả trong phần Ví dụ ở đây. Cũng xem các thử nghiệm được nêu trong bài báo Schutze *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8200-8204; Denton *et al.* (1998) *Pediatr Transplant.* 2: 6-15; Evans *et al.* (2000) *J : Immunol.* 164: 688-697 ; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49: 17-22; Lederman *et al.* (1996) *Curr Opin. Hematol.* 3: 77-86; Coligan *et al.* (1991) *Current Protocols in Immunology* 13: 12; Kwekkeboom *et al.* (1993) *Immunology* 79: 439-444; và các patent Mỹ số 5,674, 492 và 5,847, 082.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể kháng CD40, ví dụ, được chọn trong số các kháng thể tái tổ hợp mAb1-mAb3, được bào chế ở dạng dược

phẩm lỏng. Kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được mô tả trên đây. Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, ví dụ, được chọn trong số các kháng thể mAb1-mAb3, được tổng hợp tái tổ hợp trong dòng tế bào CHO.

Sau khi bào chế và tinh chế, kháng thể kháng CD40 có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm lỏng theo cách được trình bày ở đây. Khi kháng thể kháng CD40 đối kháng được bảo quản trước khi bào chế, thì nó có thể được đông lạnh, ví dụ, ở -20°C , và sau đó được rã đông ở nhiệt độ trong phòng để bào chế tiếp.

Dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3. Lượng kháng thể có trong dược phẩm được xem xét dựa vào đường dùng và thể tích liều dùng mong muốn.

Theo cách này, dược phẩm lỏng chứa kháng thể kháng CD40, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mg/ml đến 300,0mg/ml, từ 1,0mg/ml đến 200mg/ml, từ 5,0mg/ml đến 100,0mg/ml, từ 7,5mg/ml đến 50mg/ml, hoặc từ 15,0mg/ml đến 25,0mg/ml.

Dược phẩm lỏng chứa kháng thể kháng CD40, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3 và dung dịch đệm mà duy trì độ pH của dược phẩm nằm trong khoảng từ độ pH 5,0 đến pH 7,0.

Dung dịch đệm thích hợp bất kỳ mà duy trì độ pH của dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 dạng lỏng nằm trong khoảng từ độ pH 5,0 đến pH 7,0 có thể được sử dụng trong dược phẩm, miễn là độ ổn định hóa lý và hoạt tính sinh học mong muốn của kháng thể được giữ lại như nêu trên đây. Các dung dịch đệm thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, axit thông thường và các muối của nó, trong đó ion đối có thể là, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi, hoặc magie. Ví dụ về các axit thông thường và các muối của nó mà có thể được sử dụng để đệm cho dược phẩm lỏng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các dung dịch đệm axit succinic hoặc succinat, histidin hoặc histidin hydroclorua, axit xitric hoặc xitrat, axit axetic hoặc axetat, axit tartric hoặc tartrat, axit phosphoric hoặc phosphat, axit gluconic hoặc gluconat, axit glutamic hoặc glutamat, axit aspartic hoặc aspartat, axit maleic

hoặc maleat, và axit malic hoặc malat. Nồng độ của dung dịch đệm trong dược phẩm có thể nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM, kể cả khoảng 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, hoặc các giá trị khác nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM.

Theo một số phương án của sáng chế, dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, và dung dịch đệm succinat hoặc dung dịch đệm xitrat hoặc dung dịch đệm histidin hoặc dung dịch đệm histidin hydroclorua ở nồng độ mà giữ độ pH của dược phẩm nằm trong khoảng từ độ pH 5,0 đến pH 7,0. Thuật ngữ "dung dịch đệm succinat" hoặc "dung dịch đệm xitrat" nghĩa là dung dịch đệm chứa muối của axit succinic hoặc muối của axit xitric tương ứng. Thuật ngữ "dung dịch đệm histidin" nghĩa là dung dịch đệm chứa muối của axit amin histidin.

Theo một phương án ưu tiên, dung dịch đệm là dung dịch đệm histidin, ví dụ, histidin hydroclorua. Như lưu ý ở trên, nồng độ dung dịch đệm histidin trong dược phẩm có thể nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM, kể cả khoảng 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, hoặc giá trị khác nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM.

Theo một phương án ưu tiên, ion đối succinat hoặc xitrat là cation natri, và do đó dung dịch đệm tương ứng là natri succinat hoặc natri xitrat. Tuy nhiên, cation bất kỳ cũng được cho là có hiệu quả. Các cation succinat hoặc xitrat có thể khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kali, amoni, canxi, và magie. Như lưu ý ở trên, nồng độ dung dịch đệm succinat hoặc xitrat trong dược phẩm có thể nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM, kể cả khoảng 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, hoặc các giá trị khác nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM.

Theo các phương án khác, dược phẩm lỏng chứa kháng thể kháng CD40 đối kháng, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 mg/ml đến 300,0 mg/ml, hoặc 1,0 mg/ml đến 200 mg/ml, 5,0 mg/ml đến 100,0 mg/ml, 7,5 mg/ml đến 50 mg/ml, hoặc 15,0 mg/ml đến 25,0 mg/ml, và dung dịch đệm histidin hoặc succinat hoặc xitrat, ví dụ, dung dịch đệm natri succinat hoặc

natri xitrat hoặc histidin hydroclorua, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM, 5 mM đến 40 mM, 10mM đến 35mM, tốt hơn là khoảng 30 mM.

Nếu mong muốn được phẩm lỏng gần đẳng trương, thì được phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, và dung dịch đệm để duy trì độ pH của được phẩm nằm trong khoảng từ 5,0 đến pH 7,0 có thể chứa thêm một lượng chất tạo đẳng trương đủ để tạo ra được phẩm gần đẳng trương. Thuật ngữ "gần đẳng trương" nghĩa là được phẩm chứa nước có nồng độ mol nằm trong khoảng từ 240 mmol/kg đến 800 mmol/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 240 đến 600 mmol/kg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 240 đến 440 mmol/kg, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 250 đến 330 mmol/kg, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 260 đến 320 mmol/kg, vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 270 đến 310 mmol/kg.

Các phương pháp xác định tính đẳng trương của dung dịch là đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem tài liệu, ví dụ, Setnikar *et al.* (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này quen với nhiều chất tan được dụng có ích trong việc tạo ra tính đẳng trương ở được phẩm. Chất tạo tính đẳng trương có thể là chất bất kỳ có khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu của được phẩm lỏng theo sáng chế đến giá trị gần bằng giá trị của dịch cơ thể. Có thể mong muốn sử dụng chất tạo tính đẳng trương chấp nhận được về mặt sinh lý.

Do đó, được phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 đối kháng, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3 và dung dịch đệm để duy trì độ pH của được phẩm nằm trong khoảng từ độ pH 5,0 đến pH 7,0, ngoài ra có thể chứa các thành phần mà có thể được sử dụng để tạo ra tính đẳng trương, ví dụ, natri clorua; các axit amin như alanin, valin, và glyxin; đường và rượu đường (các polyol), bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, glucoza, dextroza, fructoza, sucroza, maltoza, manitol, trehaloza, glyxerol, sorbitol, và xylitol; axit axetic, axit hữu cơ khác hoặc các muối của chúng, và các lượng tương đối nhỏ của xitrat hoặc phosphat. Người có hiểu biết trung bình sẽ biết về các chất khác mà thích hợp để tạo ra tính trương tối ưu cho được phẩm lỏng.

Theo một số phương án ưu tiên khác, dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, và dung dịch đệm để duy trì độ pH của dược phẩm nằm trong khoảng từ độ pH 5,0 đến pH 7,0, ngoài ra chứa natri clorua làm chất tạo tính đẳng trương.

Nồng độ của natri clorua trong dược phẩm sẽ tùy thuộc vào mức đóng góp vào tính trương của các thành phần khác. Theo một số phương án, nồng độ của natri clorua nằm trong khoảng từ 50 mM đến 300 mM. Theo một phương án này, nồng độ của natri clorua là khoảng 150 mM. Theo các phương án khác này, nồng độ của natri clorua là khoảng 150 mM, dung dịch đệm là dung dịch đệm natri succinat hoặc natri xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5mM đến 15mM, dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, và dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

Theo các phương án khác, dược phẩm lỏng chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 mg/ml đến 50,0 mg/ml hoặc 5,0 mg/ml đến 25,0 mg/ml, khoảng 150 mM natri clorua, và khoảng 10 mM, 20mM 30 mM, 40 mM hoặc 50mM natri succinat hoặc natri xitrat, ở độ pH bằng khoảng pH 5,5.

Sự thoái biến protein do sự rã đông hoặc cắt cơ học trong quá trình xử lý dược phẩm lỏng theo sáng chế có thể được ức chế bằng cách đưa các chất hoạt động bề mặt vào dược phẩm để làm giảm sức căng bề mặt ở bề mặt chung dung dịch – không khí. Do đó, theo một số phương án, dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, dung dịch đệm để duy trì độ pH của dược phẩm nằm trong khoảng từ pH 5,0 đến pH 7,0, và còn chứa chất hoạt động bề mặt. Theo các phương án khác, dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, dung dịch đệm để duy trì độ pH của dược phẩm nằm trong khoảng từ pH 5,0 đến pH 7,0, chất tạo tính đẳng trương như natri clorua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 300 mM, và còn chứa chất hoạt động bề mặt.

Chất hoạt động bề mặt thông thường được dùng là chất hoạt động bề mặt không ion, bao gồm este polyoxyetylen sorbitol như polysorbat 80 (Tween 80) và polysorbat 20 (Tween 20); este polyoxypropylen-polyoxyetylen như Pluronic F68; rượu polyoxyetylen như Brij 35; simeticon; polyetylen glycol như PEG400; lysophosphatidylcholin; và polyoxyetylen-p-t-octylphenol như Triton X-100.

Việc làm ổn định theo cách cổ điển các dược phẩm bằng chất hoạt động bề mặt hoặc chất nhũ hóa được mô tả, ví dụ, trong bài báo Levine *et al.* (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45 (3): 160-165, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Chất hoạt động bề mặt ưu tiên được dùng để thực hành sáng chế là polysorbat 80. Nếu chất hoạt động bề mặt được bao gồm thì chất hoạt động bề mặt này thường được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1,0% (khối lượng/thể tích).

Do đó, theo một số phương án, dược phẩm lỏng chứa một lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, dung dịch đệm là dung dịch đệm natri succinat hoặc natri xitrat hoặc histidin hoặc dung dịch đệm histidin hydroclorua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 mM đến 50 mM, 3 mM đến 40 mM, hoặc 5 mM đến 35 mM; hoặc 7,5 mM đến 30mM; dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ pH 5,0 đến pH 7,0; và dược phẩm còn chứa chất hoạt động bề mặt, ví dụ, polysorbat 80, với lượng nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1,0% hoặc 0,001% đến 0,5%. Các dược phẩm này có thể tùy ý chứa chất tạo tính đẳng trương, như natri clorua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 300 mM, 50 mM đến 200 mM, hoặc 50 mM đến 150 mM.

Theo các phương án khác, dược phẩm lỏng chứa kháng thể kháng CD40 hoặc protein theo sáng chế, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 mg/ml đến 200,0 mg/ml hoặc 1 mg/ml đến 100,0 mg/ml hoặc 2 mg/ml đến 50,0 mg/ml hoặc 5,0 mg/ml đến 25,0 mg/ml, kể cả khoảng 20,0 mg/ml; natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 50 mM đến 200 mM, kể cả khoảng 150 mM natri clorua; natri succinat hoặc natri xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 20 mM, kể cả khoảng 10 mM natri succinat hoặc natri xitrat; natri clorua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 50 mM đến 200 mM, kể cả khoảng 150 mM; histidin hoặc histidin clorua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 mM đến 50

mM, kể cả khoảng 30 mM histidin hoặc histidin clorua; và tùy ý chất hoạt động bề mặt, ví dụ, polysorbat 80, với lượng nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1,0%, kể cả khoảng 0,001% đến 0,5%; nếu dược phẩm lỏng có độ pH nằm trong khoảng độ pH từ 5,0 đến 7,0.

Dược phẩm lỏng về cơ bản có thể không có chất bảo quản bất kỳ và các chất mang, tá dược, hoặc chất ổn định khác như được nêu trên đây. Theo cách khác, dược phẩm có thể chứa một hoặc nhiều chất bảo quản, ví dụ, chất kháng khuẩn, chất mang, tá dược, hoặc chất ổn định được dụng được nêu ở trên đây miễn là chúng không làm ảnh hưởng bất lợi đến sự ổn định hóa lý của kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó. Các ví dụ về chất mang, tá dược, và chất ổn định được dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất đệm khác, đồng dung môi, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxi hóa bao gồm axit ascorbic và methionin, chất tạo chelat như EDTA, phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein), và polyme dễ thoái biến sinh học như polyeste. Sự thảo luận kỹ lưỡng về dược phẩm và việc chọn chất mang được dụng, chất ổn định, và chất tạo sự đẳng thẩm thấu có thể được tìm thấy trong bài báo Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

Sau khi dược phẩm lỏng hoặc dược phẩm khác nêu ở đây được bào chế, thì nó có thể được đông lạnh để phòng thoái biến. Các phương pháp đông lạnh dược phẩm lỏng là đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Chỉ trước khi sử dụng, dược phẩm có thể được hoàn nguyên bằng dung dịch pha loãng vô trùng (dung dịch Ringer, nước cất, hoặc dung dịch nước muối vô trùng, chẳng hạn) mà có thể bao gồm các thành phần khác.

Sau khi hoàn nguyên, dược phẩm tốt hơn là được dùng cho các đối tượng bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Sử dụng kháng thể kháng CD40 đối kháng để sản xuất thuốc

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein theo sáng chế dùng để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm ở đối tượng, trong đó thuốc được phối hợp với ít nhất một liệu pháp điều trị khác trong quá trình điều trị.

Thuật ngữ "được phối hợp" nghĩa là thuốc được sử dụng trước, trong, hoặc sau khi điều trị đối tượng bằng ít nhất một liệu pháp điều trị khác. Các ví dụ về các liệu pháp điều trị khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các liệu pháp được nêu ở trên đây, nghĩa là, phẫu thuật hoặc quá trình phẫu thuật (ví dụ thủ thuật cắt bỏ lá lách, thủ thuật cắt bỏ hạch bạch huyết, thủ thuật cắt bỏ tuyến giáp, tách huyết tương, tách bạch cầu khỏi máu, tế bào, mô, hoặc cấy ghép cơ quan, truyền cơ quan, các thủ thuật ở ruột, và thủ thuật tương tự), liệu pháp phóng xạ, liệu pháp điều trị như liệu pháp điều trị dùng steroid và liệu pháp điều trị không dùng steroid, liệu pháp điều trị dùng hormon, liệu pháp điều trị dùng xytokin, liệu pháp điều trị bằng thuốc dùng cho da (ví dụ, thuốc tại chỗ được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh da như dị ứng, viêm da tiếp xúc, và bệnh vẩy nến), liệu pháp ức chế miễn dịch, và liệu pháp điều trị dùng kháng thể đơn dòng kháng viêm khác, và liệu pháp tương tự, trong đó việc điều trị với liệu pháp điều trị khác, hoặc các liệu pháp điều trị khác, xảy ra trước, trong, hoặc sau khi để điều trị đối tượng bằng thuốc chứa kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc các protein theo sáng chế như được lưu ý ở trên đây.

Theo một phương án này, sáng chế đề cập đến kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3 dùng để sử dụng trong điều trị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm ở đối tượng, trong đó thuốc được phối hợp với việc điều trị bằng ít nhất một liệu pháp điều trị khác như được nêu trên đây.

Theo một số phương án, thuốc chứa kháng thể kháng CD40 đối kháng, ví dụ, kháng thể đơn dòng mAb1, mAb2 hoặc mAb3 được mô tả ở đây, hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó được phối hợp với việc điều trị bằng hai liệu pháp điều trị khác.

Nếu thuốc chứa kháng thể kháng CD40 đối kháng được phối hợp với hai liệu pháp điều trị khác, thì việc sử dụng thuốc có thể là trước, trong, hoặc sau khi điều trị đối tượng bằng một hoặc cả hai liệu pháp điều trị khác.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, ví dụ, kháng thể mAb1, mAb2 hoặc mAb3 được nêu ở đây, sử dụng để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm ở đối tượng, trong đó thuốc được sử dụng cho đối tượng mà đã được điều trị trước đó bằng ít nhất một liệu pháp điều trị khác.

Thuật ngữ "đã được điều trị" hoặc "điều trị trước đó" nghĩa là đối tượng đã được điều trị bằng một hoặc nhiều liệu pháp điều trị khác trước khi dùng thuốc chứa kháng thể kháng CD40 đối kháng hoặc protein theo sáng chế.

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa và không làm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu

1. Kháng thể đơn dòng

Chir12.12 (1,9 mg/ml), mAb1 (0,88 mg/ml), mAb2 (1,9 mg/ml), và mAb3 (1,9 mg/ml) được cung cấp trong 50 mM xitrat pH 7,0, 140 mM NaCl. Isotyp IgG đối chứng cũng được sử dụng cho các thử nghiệm được lựa chọn (Sigma, St. Louis, Mỹ).

2. Tác nhân kích thích hoạt hóa tế bào B

Đoạn F(ab')₂ AfiniPure IgM thô kháng người thu được từ viện nghiên cứu Jackson Immuno Research (Suffolk, UK), và CpG2006 thu được từ Microsynth (Balgach, Thụy sĩ). CD40L người tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Dịch nổi chứa IL-4 người được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

3. Các chất dùng trong nuôi cấy mô *in vitro*

Môi trường nuôi cấy PBMC: RPMI-1640, 10% FBS, 1% Penixilin/Streptomycin, 1% axit amin không thiết yếu, 1% Natri pyruvat, 5 mM β -mercaptoetanol (tất cả thu từ Invitrogen, San Diego, Mỹ).

Phương pháp

1. Thử nghiệm tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L

1.1 Tinh chế tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC)

Các PBMC ban đầu được tinh chế từ lớp váng máu sau ly tâm từ máu toàn phần thu được từ người tình nguyện khỏe mạnh (Blutspendezentrum, Basel). Lớp váng máu sau ly tâm được pha loãng theo tỷ lệ 1:4 bằng PBS không có Ca^{2+} và Mg^{2+} chứa 5mM EDTA và 25ml được chia phân ước vào các ống Falcon 50ml. Lớp váng máu sau ly tâm đã pha loãng được nằm dưới với 14ml Ficoll-Plaque Plus (GE

Healthcare) mỗi ống Falcon và được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút ở tốc độ 2250 vòng/phút (không kìm hãm). Sau khi ly tâm, lớp giữa hai pha được chuyển vào ống Falcon đơn 50ml. Các lớp giữa hai pha từ nhiều ống (từ người cho duy nhất) được thu gom lên đến thể tích 30ml. Thêm PBS được bổ sung 5mM EDTA vào và các tế bào được quay ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút ở tốc độ 2250 vòng/phút. Dịch nổi được loại bỏ trước khi thêm 15ml dung dịch đệm phân giải tế bào hồng cầu (red blood cell - RBC) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Sau đó thêm 20ml PBS/5mM EDTA vào và các tế bào lại được quay (nhiệt độ trong phòng/5 phút ở tốc độ 2250 vòng/phút). Các tế bào được rửa 2 lần trong PBS/5mM EDTA (với các bước ly tâm xen kẽ) và được tái huyền phù trong 35ml môi trường PBMC trước khi xác định số lượng tế bào sống sót bằng cách sử dụng phương pháp loại trừ bằng nhuộm xanh Trypan. Các tế bào không được sử dụng để kích thích *in vitro* ngay được bảo quản lạnh.

1.2 Thử nghiệm kích thích PBMC *in vitro*

Dãy pha loãng hai lần 7 điểm của mỗi mAb kháng CD40 hoặc đối chứng isotyp được tiến hành ba lần trong đĩa Costar 96 lỗ có hoặc không có liều cố định 5µg/ml kháng IgM F(ab')₂, 1µM CpG2006, dịch nổi chứa IL-4 người (75 ng/ml), hoặc 40µg/ml huCD40L tái tổ hợp (các nồng độ cuối cùng được chỉ ra). Các nồng độ ban đầu của mỗi mAb kháng CD40 nằm trong khoảng từ 20µg/ml đến 100µg/ml tùy theo thử nghiệm. CD40L được sử dụng trong liều đáp ứng làm đối chứng dương cho tất cả các thử nghiệm. Các liều của kháng IgM, CpG2006, IL-4 và CD40L được chọn dựa vào các thử nghiệm trước trong đó khả năng của các chất phản ứng này (đơn lẻ hoặc kết hợp) gây ra sự tăng sinh PBMC hoặc tế bào B được đánh giá ở liều đáp ứng (số liệu không được trình bày). Các PBMC (mật độ cuối cùng là 8×10^4 trong một lỗ) sau đó được thêm vào mỗi lỗ trước khi ủ trong 3 ngày ở 37°C/5% CO₂. Thêm ³H-thymidin (1 µCi/50µl/lỗ) vào mỗi lỗ trong 6 giờ nuôi cấy cuối cùng trước khi thu hoạch và xác định lượng thymidin đưa vào bằng cách sử dụng máy đếm nhấp nháy MicroBetaTrilux. Lưu ý rằng các tế bào cộng môi trường và các tế bào cộng môi trường cộng dịch nuôi cấy kháng IgM, IL-4, CpG2006 hoặc đối chứng CD40L (không có các mAb kháng CD40) được bao gồm trong mỗi thử nghiệm.

Số liệu đếm nhấp nháy được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Excel và GraphPad Prism. Các kết quả được trình bày dưới dạng số đếm trung bình trong một phút (cpm) (+/- sai số chuẩn của số trung bình) so với log nồng độ mAb kháng CD40 biến đổi. Các mẫu đối chứng dương tính và các mức cơ bản của tế bào cộng môi trường được chỉ ra trên mỗi đồ thị. Giá trị IC50 hoặc EC50 được tính tùy theo khớp đường cong thành công số liệu bởi Prism.

Các PBMC được kích thích như được chỉ ra ở trên với 20µg/ml CD40L có hoặc không có liều đáp ứng của mAb kháng CD40 thử nghiệm trong 3 ngày. Sự tăng sinh được đánh giá bằng việc kết hợp ³H-thymidin sau 72 giờ nuôi cấy. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của ba lần nuôi cấy với SEM và đại diện của 4 người cho (các thử nghiệm độc lập). Giá trị IC50 của sự ức chế qua trung gian mAb kháng CD40 được lập thành bảng theo µg/ml.

2. Thử nghiệm chủ vận PBMC *in vitro*

Các PBMC người được kích thích như được chỉ ra trong đoạn 1.2 ở trên với liều đáp ứng của Chir12.12, mAb1, mAb2 hoặc mAb3 trong 3 ngày mà không có sự đồng kích thích của hoặc có mặt của 5µg/ml kháng IgM F(ab')₂ hoặc 1µM CpG2006. Sự tăng sinh được đánh giá bằng việc kết hợp ³H-thymidin vào sau 72 giờ nuôi cấy. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của ba lần nuôi cấy với SEM và đại diện của 4 người cho (các thử nghiệm độc lập).

3. Thử nghiệm ADCC

Thêm 50µl hỗn dịch PBMC (10×10^6 tế bào/mL) vào các lỗ đáy tròn (Corning Incorporated - Costar #3790), 50µl tế bào Raji được nhuộm calcein ở nồng độ (2×10^5 tế bào/mL) và thêm 100µl dung dịch pha loãng kháng thể hoặc mẫu đối chứng vào. Mức phân giải tối đa được xác định trong 2% Triton 100.

Các tế bào được thu gom ở đáy đĩa (3 phút ở 250g) và ủ ở 37°C trong môi trường CO₂ được làm ẩm (5%) trong 1 giờ. Các tế bào được tách ra khỏi môi trường bằng cách ly tâm (3 phút ở 750g) và 100µl dịch nổi được chuyển vào đĩa đen đáy trong (Corning Incorporated - Costar #3904) để đo.

Huỳnh quang được xác định ở bước sóng 535nm sau khi kích thích ở bước sóng 485nm với quang phổ kế SpectraMax Gemini (Molecular Devices). Mức phân giải tế bào cụ thể được tính bằng công thức dưới đây:

(mức độ giải phóng thử nghiệm – mức độ giải phóng tự phát)/(mức độ giải phóng tối đa – mức độ giải phóng tự phát) x 100.

4. Liên kết của biến thể kháng thể kháng CD40 của người với dòng tế bào BJAB người

Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng, để so sánh mức gắn kết của các biến thể Fc kháng thể kháng CD40 khác nhau với các tế bào BJAB người. Do đó, 2×10^5 tế bào được nuôi cấy mỗi lỗ trên đĩa đáy chữ V có 96-lỗ. Rửa các đĩa hai lần với 200 μ L dung dịch đệm FACS (PBS, 5% FCS, 2mM EDTA) trong 2 phút ở 4°C ở 1350xg. Các dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được tái huyền phù trong 100mL dung dịch đệm FACS chứa 8% huyết thanh người (InVitromex, Cat. No. S4190) và ủ trong 10 phút. Sau khi rửa biến thể Fc kháng CD40 người hai lần thêm 50 μ L dung dịch đệm FACS với 1% huyết thanh người bắt đầu ở nồng độ 10 μ g/mL với tỷ lệ pha loãng 1:2. Các tế bào được ủ trong 30 phút trên đá tiếp theo tiến hành hai bước rửa. 50 μ L FITC thử kháng IgG người đa dòng, F(ab')₂ (DAKO, Cat. No. F 0315) được thêm vào mỗi lỗ và ủ trong 30 phút trên đá. Ở cuối thời kỳ ủ, các tế bào được rửa hai lần, tái huyền phù trong 100 μ L dung dịch đệm FACS và thu được trên FACS CantoII.

Sau khi thu được cường độ huỳnh quang trung bình của kênh FITC được thu trên FloJo.Graphing và khớp đường cong được thực hiện với phần mềm GraphPad Prism 5.0. Do thay đổi các cường độ giữa các thử nghiệm riêng biệt, nên các giá trị được chuẩn hóa. Do đó, giá trị cao nhất của mỗi dãy thử nghiệm kháng thể là 100%. Các lần khớp đường cong không tuyến tính được thực hiện với các giá trị phần trăm.

5. Thử nghiệm sản sinh xytokin qua trung gian CD40L ở các tế bào đuôi gai có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân (các MoDC)

5.1 Bào chế tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân người

Các PBMC người được chuẩn bị từ lớp váng máu sau ly tâm người thu được từ tổ chức chữ thập đỏ Thụy sĩ. Lớp váng máu sau ly tâm được pha loãng với tỷ lệ 1:5 trong PBS (Invitrogen, Cat. No. 20012019) và được phân phối trong các phân ước 35 mL vào ống falcon 50mL. Sau đó, 13mL Ficoll (GE Healthcare, Cat. No. 17 1440-02) được lót trong mỗi ống. Các tế bào được ly tâm ở tốc độ 1680xg ở nhiệt

độ trong phòng trong 20 phút mà không dừng lại. Lớp chứa PBMC được thu gom và rửa hai lần trong thể tích lớn PBS trong 5 phút ở tốc độ 1000 x g. Cuối cùng các tế bào được tái huyền phù trong 10mL PBS và được đếm.

Các bạch cầu đơn nhân người được phân lập bị động từ 100×10^7 PBMC bằng cách sử dụng kit phân lập bạch cầu đơn nhân người II từ Miltenyi (Miltenyi, Đức, Cat. No. 130-091-153) trên thiết bị AutoMACS theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Sau khi các tế bào phân lập được rửa hai lần trong 5 phút ở tốc độ 1000xg ở 4°C trong môi trường nuôi cấy (RPMI1640 (Invitrogen, Cat. No. 61870010), 10% FCS (Invitrogen, Cat. No.16000044, nguồn gốc Mỹ), 1mM natri pyruvat (Invitrogen, Cat. No. 11360039), 1 x NEAA (Invitrogen, Cat.No. 11140035) 1 x Penixillin/Streptomycin (Invitrogen, Cat. No. 15140122)). Đếm các bạch cầu đơn nhân phân lập, đặt vào các đĩa có 6 lỗ ở mật độ $0,4 \times 10^6$ /mL và nuôi cấy trong 7 ngày ở 37°C, 5% CO₂. Để phân biệt các bạch cầu đơn nhân với tế bào đuôi gai tái tổ hợp, IL-4 người [80 ng/mL] và GM-CSF người [100 ng/mL] (cả hai được sản xuất nội bộ) được thêm vào môi trường nuôi cấy ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

5.2 Kích thích tế bào đuôi gai (các DC) để giải phóng xytokin

Các DC chưa trưởng thành được thu hoạch sau 7 ngày nuôi cấy bằng cách rửa các đĩa có 6 lỗ, thu gom các tế bào và rửa chúng hai lần trong 5 phút ở tốc độ 1400xg trong môi trường nuôi cấy. Sau đó, 2×10^5 iDC được nuôi cấy trong các đĩa đáy bằng có 96-lỗ (Becton Dickinson, Cat. No. 353072) trong 100µL. Đối với các tế bào đối chứng dương tính được kích thích bằng MegaCD40L (Alexis, Cat. No. ALX-522-110-C010) ở nồng độ 1µg/mL, mẫu đối chứng âm tính bao gồm chỉ các iDC trong môi trường. Trong thử nghiệm đối kháng, các biến thể Fc của kháng thể kháng CD40 người được thêm vào với nồng độ 10µg/mL với tỷ lệ pha loãng 1:2 cùng với 1µg/mL MegaCD40L đối với liều đáp ứng. Các dịch nổi của các tế bào được kích thích được thu gom 24 giờ sau đó để đo lượng TNFα. Trong thử nghiệm chủ vận, các biến thể Fc của kháng thể kháng CD40 người được thêm vào với nồng độ 10µg/mL với tỷ lệ pha loãng 1:2 và các dịch nổi được thu sau 48 giờ để đo lượng TNFα. Các tế bào được nuôi cấy và được kích thích ba lần trong tất cả các thử nghiệm.

5.3 Đo lượng TNF alpha bằng ELISA

Để đo lượng TNF α trong các dịch nổi, ELISA được thực hiện như sau. Kháng thể bắt giữ kháng TNF α (BD Pharmingen, Cat. No. 551220) được bao trên các đĩa ELISA (Greiner, Nunc F96 Maxisorp, Cat. No. 442404) ở nồng độ 5 μ g/mL trong 50 μ L mỗi lỗ qua đêm ở 4°C. Đối với mỗi bước rửa, các đĩa được rửa 3 lần với 250 μ L trong máy rửa đĩa BioTek ELx 405. Sau lần rửa đầu tiên, 200 μ L Superblock TBS (Thermo Scientific, Pierce, Cat. No. 37535) được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Tiếp theo, TNF α chuẩn (TNF α người tái tổ hợp, R&D Systems, Cat. No. 210-TA) hoặc mẫu được thêm vào 25 μ L. TNF α chuẩn được bắt đầu ở nồng độ cuối cùng là 20ng/mL trong một dãy pha loãng với tỷ lệ 1:2. Ngoài ra, 25 μ L kháng thể phát hiện (biotin kháng TNF α người, BD Pharmingen, Cat. No. 554511) được thêm vào với tỷ lệ pha loãng 1:500. Các đĩa được ủ qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa, thể tiếp hợp Avidin-POD (ExtrAV phosphatase kiềm, Sigma, Cat. No. E-2636) được pha loãng với tỷ lệ 1:5000 trong Superblock TBS, được thêm vào 50 μ L và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa và 50 μ L cơ chất p-Nitrophenylphosphat (Sigma, Cat. No. C-3041) được thêm vào để phát hiện trong 15 phút. Các đĩa ELISA được đọc ở 450nm với phần mềm SoftMax Pro trên máy SpectraMax M5 (thiết bị phân tử).

6. Nghiên cứu độc tính

Mục đích chính ban đầu của nghiên cứu độc tính là để nghiên cứu độc tính tiềm tàng của mAb1 liều cao (100mg/kg) so với Chir12.12.

30 con khỉ cynomolgus có nguồn gốc ở Mauritius được sử dụng cho nghiên cứu này. Tại thời điểm bắt đầu dùng liều, tuổi của các con khỉ này là khoảng 4 đến 5 tuổi và có khối lượng từ 4,5 đến 6,6 kg đối với con đực và 3,1 đến 4,3 kg đối với con cái.

mAb1 (50 mg/mL) được dùng qua đường tĩnh mạch cho một nhóm khỉ cynomolgus (5 đực/5 cái; nhóm 2) với mức liều 100mg/kg và thể tích liều 2mL/kg mỗi lần một tuần trong 5 tuần (việc dùng kháng thể thử nghiệm vào các ngày 1, 8, 15, 22, 29, và 36). Một nhóm khỉ cynomolgus khác (5 đực/5 cái; nhóm 3) dùng kháng thể gốc Chir12.12 qua đường tĩnh mạch bằng cách truyền một liều lớn chậm với mức liều 100mg/kg và thể tích liều 5mL/kg giả được. mAb1 với thể tích liều

2mL/kg được dùng cho một nhóm khỉ cynomolgus khác mà được dùng làm đối chứng (5 đực/5 cái; nhóm 1). Tất cả các con khỉ được mổ tử thi sau một hoặc hai ngày dùng liều cuối cùng.

Đã quyết định kết hợp tạo miễn dịch bằng Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) để đánh giá hiệu quả của cả hai Ab kháng CD40. Vào ngày thứ 2, các con được tạo miễn dịch với 1mg KLH trong phen sau đó tiêm nhắc lại liều 0,5 mg KLH trong phen vào ngày thứ 23. Huyết thanh được lấy mẫu trước khi tạo miễn dịch/tiêm nhắc lại cũng như tương ứng vào ngày 7 và 14 sau khi tạo miễn dịch và tiêm nhắc lại. Hiệu giá IgM/IgG đặc hiệu KLH được xác định bằng phương pháp ELISA bằng cách sử dụng huyết thanh đối chứng chứa IgM/IgG kháng KLH của khỉ cynomolgus làm mẫu chuẩn. Máu được lấy mẫu 3 lần trước khi dùng liều và vào các ngày 15, 29 và vào lúc mổ tử thi (ngày 37/38) để xác định kiểu hình miễn dịch của các tế bào B chưa từng thí nghiệm (CD20+CD21+CD27-). Tổng số tế bào CD20 B chưa từng thí nghiệm tuyệt đối được tính từ tổng số tế bào lympho trong mẫu máu và tổng số tế bào CD20 B chưa từng thí nghiệm tương đối bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy.

Bảng 4: Tổng kết nghiên cứu độc tính

Số nhóm	Mô tả nhóm	Mức liều (mg/kg/liều)	Thể tích liều * (mL/kg)	số con/nhóm		Mổ tử thi sau 5 tuần
				Đực	Cái	
1	Đối chứng	0	2	5	5	5 M / 5 F
2	mAb1	100	2	5	5	5 M / 5 F
3	Chir12.12	100	5	5	5	5 M / 5 F

* Dựa vào khối lượng cơ thể của cá nhân gần đây nhất

Đánh giá độc tính dựa trên sự quan sát về lâm sàng, tỷ lệ tử vong (các dấu hiệu lâm sàng bao gồm quan sát sau khi dùng kháng thể, đánh giá phân, kiểm tra lông, và sự tiêu thụ thức ăn), khối lượng cơ thể, các kiểm tra về mắt, kiểm tra tim mạch, bệnh lý lâm sàng (bao gồm sự đông máu, kiểm tra sự hoạt hóa tiểu cầu bên ngoài, huyết học, hóa học lâm sàng và phân tích nước tiểu), khối lượng cơ quan, và các kết quả mổ tử thi vĩ mô và vi mô. Kiểu hình miễn dịch ở máu được thực hiện ba lần trước khi dùng kháng thể, vào các ngày 15 và 29 của pha dùng kháng thể cũng

như vào ngày mổ tử thi. Ngoài ra, kiểu hình miễn dịch của mô lá lách và hạch bạch cầu thoát nước của vị trí tiêm Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) được thực hiện khi mổ tử thi. Ngoài ra, đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T (TDAR) với KLH được kiểm tra để so sánh trực tiếp về mức độ ảnh hưởng của Chir12.12 có khả năng gây ra ADCC hoàn toàn với mAb1. Máu được thu từ tất cả các con để đánh giá động học độc tính và đánh giá kháng thể kháng thuốc có thể có (anti-drug antibody - ADA).

7. Tạo profin *in vitro* khác của mAb1

7.1 Tinh chế PBMC

Các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi người được chuẩn bị như được nêu ở trên trong phần 1.1.

7.2 Tinh chế tế bào B ở amidan người

Nang amidan và mô liên kết được lấy ra và nguyên liệu amidan sau đó được cắt thành các miếng to ~ 5mm trước khi được nghiền qua bộ lọc tế bào kim loại với việc rửa thông thường với môi trường tế bào B. Các tế bào amidan sau đó được lọc hai lần qua bộ lọc tế bào 70 μ M để loại bỏ mảnh vỡ tế bào. Các tế bào B được phân lập từ các PBMC mới bằng cách sử dụng kit làm giàu tế bào B của người chọn lọc âm tính EasySep (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Các tế bào B được tinh chế bằng cách sử dụng kit làm giàu tế bào B của người chọn lọc âm tính EasySep theo các hướng dẫn của nhà sản xuất (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada).

7.3 Đánh giá giá trị EC50 liên kết với CD40 bằng cách sử dụng các PBMC hoặc tế bào B của người và của động vật linh trưởng không phải người

Các PBMC (khỉ zerut, khỉ cynomolgus hoặc người) hoặc các tế bào B amidan (chỉ của người) được ủ ở 4°C trong 30 phút với mAb1 tinh khiết được đánh dấu hoặc kháng thể đối chứng isotyp ở liều đáp ứng (nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 2,5 μ g/ml đến 0,00125 μ g/ml). Các tế bào sau đó được rửa trước khi được ủ với kháng thể kháng IgG người (phản ứng chéo của động vật linh trưởng không phải người) và kháng thể kháng IgG người được biotinyll hóa với phản ứng chéo tối thiểu với các NHP (R10; lưu ý rằng có thể phân biệt các tế bào B của người biểu hiện IgG màng bằng cách nhuộm kháng IgM hoặc thông qua mức độ nhuộm

FACS khác nhau). Các tế bào lại được ủ ở 4°C trong 30 phút trước khi được rửa và trải qua việc nhuộm cuối cùng với streptavidin-FITC trong 20 phút ở 4°C. Các tế bào sau đó được rửa và đánh giá sự biểu hiện CD40 trên các tế bào CD20+ tế bào được thực hiện bằng máy đo tế bào theo dòng chảy.

7.4 Đánh giá sự ức chế tăng sinh PBMC hoặc tế bào B của người và động vật linh trưởng không phải người được cảm ứng bởi CD154

Dãy pha loãng hai lần 7 điểm của mỗi mAb kháng CD40 hoặc đối chứng isotyp được tiến hành ba lần trong các đĩa 96 lỗ khi có mặt các nồng độ EC80 của CD154 và IL-4 người tái tổ hợp. Các nồng độ ban đầu của mỗi mAb kháng CD40 nằm trong khoảng từ 20 µg/ml đến 100 µg/ml tùy theo thử nghiệm. Các tế bào và các mẫu đối chứng môi trường được sử dụng làm các đối chứng âm tính cho tất cả các thử nghiệm. Các PBMC (khỉ zerut, khỉ cynomolgus hoặc người) hoặc các tế bào B amidan (chỉ người) sau đó được thêm vào mỗi lỗ trước khi ủ trong 3 ngày ở 37°C/5% CO₂. Thêm ³H-thymidin (1µCi/50µl/lỗ) vào mỗi lỗ trong 6 giờ nuôi cấy cuối cùng trước khi thu hoạch và xác định mức kết hợp thymidin bằng cách sử dụng máy đếm nhấp nháy.

8. Hiệu quả của mAb1 kết hợp với cyclosporin A ở mô hình cấy ghép cùng loại thận trên khỉ cynomolgus

8.1 Động vật

Tất cả các con khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) được sử dụng là khỉ đực tuổi từ 7,5-9 (#5529/ #5533, #5523/#5524 và #5536/#5538), được nuôi nhốt, khối lượng từ 7,7±0,9 kg và có nguồn gốc từ Philipin (Siconbrec, Makati City, Philipin). Ở thời điểm cấy ghép, các con có huyết học bình thường, hóa học huyết thanh/nước tiểu và âm tính với vi khuẩn lao, Salmonella/Shigella, với kháng thể chống lại tác nhân virus (HerpesB, virus gây bệnh bạch cầu tế bào T ở khỉ, virus gây thiếu hụt miễn dịch ở khỉ, retrovirus typ D ở khỉ, viêm gan B) và với vật ký sinh trong/ngoài thích hợp. Tuy nhiên, tất cả các động vật có kháng thể chống lại cytomegalovirus và virus viêm gan A (HAV) (được thử nghiệm vào năm 2010; động vật #5536 là âm tính với HAV). Nghiên cứu từ động vật #5523 được thử nghiệm dương tính với *Balantidium coli* vào tháng 12 năm 2010.

Trong tuần đầu tiên sau khi phẫu thuật, các con khỉ được nhốt trong các chuồng cho phép nhìn thấy nhau. Phần thời gian còn lại, các con khỉ #5536/#5538 được nhốt cùng nhau và 4 con khỉ còn lại được nhốt riêng biệt trong toàn bộ thử nghiệm (các con không phù hợp). Tất cả các con được nhốt dưới nhiệt độ duy trì (20-24°C), độ ẩm ít nhất là 40% và chu kỳ ánh sáng tự nhiên. Tất cả được cho ăn ít nhất hai lần một ngày với các hỗn hợp hoa quả và rau. Nước và viên Kliba Nafag 3446 (Kaiseraugst, Đức) được cung cấp *tùy ý*.

Tất cả thử nghiệm được thực hiện theo Quy định bảo vệ động vật của Thụy Sĩ và dưới giấy phép BS1555.

Bảng 5: Các đặc điểm của động vật

Loài	Chủng	Loại	Người bán	Giới tính	Khối lượng	Tuổi
Khỉ <i>Cynomolgus</i> (<i>Macaca fascicularis</i>)	Chủng bất kỳ	Không được chỉ rõ	BioPRIM	M/F	7,7±0,9	7,5-9

8.2 Điều kiện thử nghiệm

8.2.1 Cấy ghép thận và sự theo dõi sau phẫu thuật

Các cặp động vật cho/nhận được chọn theo tiêu chí ghép ABO, ghép nhằm DRB exon2 (Blancher A, Tisseyre P, Dutaur M, *et al.* (2006) Immunogenetics; 58(4):269-82) và các đáp ứng trong phản ứng tế bào lympho hỗn hợp một chiều (Mixed lymphocyte reaction - MLR), có các chỉ số kích thích MLR (các MLR-SI) >7 và <47 (Bigaud M, Maurer C, Vedrine, *et al.* (2004) J. Pharmacol. Toxicol. Methods; 50(2):153-9). Các kết quả của việc lựa chọn này được trình bày trong Bảng 6 và được bao gồm trong hai lần cấy ghép (cấy ghép hoán đổi giữa 2 động vật cho). Mỗi con nhận được cấy bằng đầu dò đo từ xa (Data Sciences Inc, Mỹ) để theo dõi huyết áp động mạch, nhịp tim và hoạt động vận động.

Đối với phẫu thuật, việc gây mê chung được tiến hành bằng ketamin; 10mg/kg, trong cơ, (i.m.) kết hợp với atropin (0,05mg/kg tiêm bắp) và được duy trì bằng cách thông khí N₂O/O₂ (50:50) và propofol qua đường tĩnh mạch (i.v.) (4-10mg/kg/giờ; được bổ sung liều lớn 5-10mg bất cứ khi nào cần). Các thận của con

cho được thu, rửa sạch với dung dịch lạnh của đại học Wisconsin (4°C) (thời gian bảo quản lạnh ≤ 4 giờ) và được cấy ghép khác kiểu, bằng cách sử dụng các kỹ thuật vi mạch máu chuẩn để tạo ra đường nối tận nối bên giữa tĩnh mạch thận ghép và tĩnh mạch chủ của con nhận và giữa động mạch thận ghép và động mạch chủ xa của con nhận (thời gian nối mạch ≤ 40 phút). Thủ thuật mở lỗ thông niệu quản – bàng quang được thực hiện nhờ vào sự xuất hiện nước tiểu từ mảnh ghép. Các thận nguyên thể được loại bỏ. Thuốc giảm đau sau phẫu thuật được dùng là buprenorphin, 0,01-0,02mg/kg, trong cơ, ba lần hàng ngày); kháng sinh (cefotaxime, 25mg/kg, trong cơ, hai lần hàng ngày hoặc ceftriaxon, 50mg/kg, trong cơ trong lidocain 1%, bốn lần hàng ngày). Thuốc giảm đau và kháng sinh được dùng trong 5 ngày. Bất cứ khi nào tổng số tiểu cầu thể hiện tăng lên hoặc giảm đi rõ rệt, thì aspirin được dùng với liều 5mg/kg trong cơ hàng ngày (Aspegic, Sanofi-Aventis, Meyrin, Thụy điển).

Các con nhận được theo dõi sự thay đổi về các tình trạng bệnh lâm sàng và tình trạng bệnh tim mạch, khối lượng cơ thể, khả năng tiếp nhận thức ăn và nước (được bổ sung đến liều tối đa 100-150 ml/kg/ngày), lượng nước tiểu sản xuất ra, huyết học (bằng cách sử dụng thiết bị Beckmann Coulter ACT5Diff), hóa học huyết thanh và nước tiểu (bằng cách sử dụng máy phân tích Vetscan để xác định SCrea/SUrê/SAmylaza hàng ngày và máy phân tích Beckmann Synchron CX5 để xác nhận cuối cùng của các mẫu huyết thanh và nước tiểu). Creatinin huyết thanh (SCrea) và các mức urê (SUrê) được sử dụng như các chỉ số đánh dấu chức năng ghép. Các mẫu sinh thiết được điều khiển bằng siêu âm qua da được thực hiện với kim tiêm 16G, như được mô tả trước đó (Gaschen L, Kunkler A, Menninger K, *et al.* (2001) Vet. Radiol. Ultrasound; 42(3):259-64), được gây mê chung vào ngày 30 (chỉ các động vật #5529 và #5533). Ngoài ra, khả năng đông máu và sự kết tụ tiểu cầu được theo dõi đặc biệt ở các con #5529/#5533 và #5523/#5524 vào lúc trước và sau khi cấy ghép.

Các con nhận cuối cùng được gây chết trong trường hợp (i) suy mảnh ghép nặng (ví dụ SCrea $>500 \mu\text{mol/l}$ hoặc Surê $>20\text{mmol/l}$) có liên quan hoặc không liên quan đến điểm số siêu âm tăng; hoặc (ii) các vấn đề về sức khỏe nói chung và/hoặc các dấu hiệu kiệt sức trên lâm sàng rõ rệt. Lúc mổ tử thi, các mảnh ghép cùng loại

thận được thu thập (kể cả niệu quản và đường nối mạch), cùng với tất cả các cơ quan chính khác, và được xử lý để phân tích mô tiếp theo.

Bảng 6: Thông tin chung về sự kết hợp con cho/nhận và các phác đồ điều trị được sử dụng

Con nhận	Khối lượng cơ thể (kg)	Con cho	ABO	MLR-SI (một chiều)	mAb1/CsA (mg/kg, tiêm tĩnh mạch/dùng qua miệng)	Ngày cấy ghép
5529 ♂	7,35	5533 ♂	B/B	16	30 / 20	21.09.10
5533 ♂	6,1	5529 ♂	B/B	9	30 / 20	21.09.10
5523 ♂	8,2	5524 ♂	B/B	7	30 / 20	18.01.11
5524 ♂	8,3	5523 ♂	B/B	18	30 / 20	18.01.11
5536 ♂	8	5538 ♂	B/B	47	30 / 20	07.06.11
5538 ♂	8,45	5536 ♂	B/B	11	30 / 20	07.06.11

8.2.2 Điều trị bằng mAb1 và cyclosporin A (CsA)

mAb1 được cung cấp ở dạng lỏng mới được rã đông vào ngày truyền từ -80°C. Thực hiện việc dùng 30mg/kg/trong tĩnh mạch một lần một tuần, ngoại trừ với ba liều đầu tiên vào ngày -1, 0 và 1 (trước và sau khi cấy ghép). CsA dùng qua đường miệng (p.o.) là vi nhũ tương trước khi cô (dung dịch uống Sandimmun Neoral (RTM), 100mg/ml, Novartis Pharma AG). CsA được dùng ở liều hàng ngày (bắt đầu vào ngày -1) là 20mg/kg/dùng qua đường miệng, kết hợp với mAb1 (xem Bảng 6).

8.2.3 Theo dõi các thông số dược động học mAb1 (Pharmacokinetic - PK), tính tạo miễn dịch (kháng thể của động vật linh trưởng kháng người) và các thông số dược lực học (PD)

Các mẫu máu (500 μ l huyết thanh) được thu thập (trước khi dùng kháng thể trong tĩnh mạch) để xác định mức phơi nhiễm mAb1 ở ngày -1, 3, 7 (ban đầu và 15 phút), 14, 28, 42, 56, 70, 84 và 100. Để xác định CsA, các mẫu máu được thu gom trước khi dùng qua đường miệng hoặc CsA (C0/C24) và 2 giờ sau khi dùng (C2). C2 tương ứng với các mức hấp thu CsA đỉnh. Tất cả nguyên liệu được bảo quản ở -80°C cho đến khi xử lý thêm (kit phát hiện CsA, hỗn hợp Hot Star Taq Master, Qiagen Minnesota, Mỹ). Các mẫu tạo miễn dịch mAb1 được thu gom (50 μ l huyết thanh) vào ngày -1, 7, 14, 28, 42, 56, 70, 84 và 100 trong điều kiện giữ đông lạnh ở -80°C. Nói tóm lại, các đĩa vi chuẩn độ 96 lỗ được phủ CD40 người tái tổ hợp. Các đĩa này được bảo quản ở 4°C qua đêm. Sau khi phong bế, các chất chuẩn của bộ lấy chuẩn (Calibrator standards - Cs), các mẫu kiểm tra chất lượng (Quality Control - QC) và các mẫu xét nghiệm chứa mAb1 được thêm vào đĩa. Đĩa được ủ ở +25°C trong 120 phút cùng với khuấy. Sau khi rửa đĩa, thêm kháng thể chuỗi nhẹ kapa kháng người của chuột nhất sau đó thêm tiếp tiếp hợp kháng chuột nhất (H+L) của dê HRP vào đĩa để phát hiện mAb1 bất kỳ gắn kết với CD40 tái tổ hợp. Sự gắn kết này được nhìn thấy bằng mắt thường bằng cách thêm cơ chất sinh màu (TMB) và cường độ màu được tạo ra (hấp thu) tỷ lệ trực tiếp với nồng độ mAb1 có mặt. Nồng độ của mAb1 trong các mẫu sau đó được tính lại từ đường cong hiệu chỉnh. Các mẫu PD được thu vào thời điểm 2-3 ngày trước khi cấy ghép làm các mẫu ban đầu (0,5ml trong heparin). Sau đó, việc thu thập được tiến hành theo sơ đồ tương tự như với các mẫu PK. Các tế bào CD20+ và CD3+ được đếm bằng các ống TruCount (Becton Dickinson, cat# 340334) được sử dụng theo các hướng dẫn của nhà sản xuất với mAb kháng CD40-APC người (Dòng 5C3, Becton Dickinson, cat# 555591), kháng CD3-PerCP người (Dòng SP34-2, Becton Dickinson, cat# 552851) và của mAb kháng CD20-FITC người (Dòng LT20, Immunotools, cat# 21279203X2). Số liệu được thu thập trên máy đếm tế bào theo dòng chảy LSRII (Becton Dickinson Biosciences) bằng cách sử dụng phần mềm DIVA (phiên bản

6.1.1). Các tế bào lympho và các hạt được qua cổng trong vết chấm FSC/SSC theo kích cỡ và tỷ lệ hạt và còn được phân tích về mức biểu hiện của CD20 và CD3.

8.2.4 Mô học

Tất cả các mô thu thập (các sinh thiết mảnh ghép hoặc lúc mổ tử thi) được kiểm tra vĩ mô và cố định trong dung dịch formalin đậm 4%. Sau khi khử nước, chúng được nhúng vào sáp parafin. Các phần dày cỡ 3µm được cắt từ các khối parafin và nhuộm với hematoxylin và eozin (HE). Ba lần nhuộm khác (phản ứng schiff với axit periodic, trichrome, và Verhoeff) được thực hiện trên các phần thận. Các mẫu sinh thiết và mẫu lấy lúc mổ tử thi được kiểm tra bởi nhà nghiên cứu bệnh học có kinh nghiệm và cho điểm theo phân loại Banff 07 về bệnh lý ghép cùng loại thận (Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al (2008) *Am. J. Transplant*; 8(4):753-60). Việc xem lại tương đương cũng được thực hiện bởi các chuyên gia bên ngoài.

Ngoài ra, hóa học mô miễn dịch của protein bổ thể C4d được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng C4d đa hóa trị thích hợp để nhuộm các phần parafin (Regele H, Exner M, Watschinger B, et al. 2001, *Nephrol. Dial. Transplant*; 16: 2058-2066). C4b được coi như chất đánh dấu ổn định và tin cậy của chứng thải ghép cấp dạng dịch thể (acute humoral rejection - AHR). Sau khi cố định và nhúng vào sáp parafin, các phiến kính (SuperFrostPlus, RTM, Menzel-Glaeser, Đức) với các phần dày 3µm được chuẩn bị và được làm khô qua đêm trong lò ở 37°C để làm kết dính tối ưu với các lá kính. Các phần thận người bị thải được thêm vào làm đối chứng dương tính.

Trước khi sử dụng các lá kính được loại parafin trong Xylen (10 phút), được tạo lại độ ẩm qua etanol đã phân loại và được đặt vào nước cất. Sự thu hồi kháng nguyên được thực hiện bằng nồi nấu áp suất trong 10 phút ở áp suất 1 bar trong dung dịch đệm xitrat (pH 6,0) như được mô tả trước đây (Seegerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D. *Kidney Int.* 1999; 56: 52–64). Để nhuộm miễn dịch, quy trình sau đây được sử dụng: (i) làm bất hoạt peroxidaza nội sinh bằng H₂O₂ 0,5% trong metanol tuyệt đối trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng; (ii) rửa các lá kính trong PBS 0,01M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Đức); (iii) ủ các lá kính với sữa bột không chất béo 4% “Rapolait” trong PBS, (Migros Genossenschaftsbund, Thụy Điển) trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng; khóa vôi,

không rửa; (iv) ủ một lá kính với pAb thổ kháng C4d người (Biomedica Medizinprodukte, Vienna, Áo) với tỷ lệ 1:40 trong PBS chứa 1% NGtS qua đêm ở +4°C. Lá kính thứ hai dùng làm mẫu đối chứng âm tính bằng cách dùng mẫu đối chứng isotyp thổ (Zymed Laboratories Inc, Mỹ) thay cho kháng thể ban đầu; (v) rửa các lá kính trong PBS 0,01M, pH 7,4; (vi) ủ tất cả các lá kính với IgG dê kháng thổ được biotinyl hóa (Vector Laboratories, Inc. Mỹ) với tỷ lệ 1:200 trong PBS chứa NGtS 1% trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng; (vii) rửa các lá kính trong PBS 0,01M, pH 7,4; (viii) ủ với Streptavidin/HRP (Vector Laboratories, Inc. Mỹ) trong PBS trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, (ix) phát hiện hoạt tính HRP bằng AEC+ (DakoCytomation Corp., Carpinteria, Mỹ) trong 8-10 phút, theo dõi mức độ nhuộm bằng kính hiển vi, rửa trong nước cất, (x) nhuộm tương phản với Dako (RTM) Automation Hematoxylin (DakoCytomation Corp., Carpinteria, Mỹ) trong 2 phút và xanh trong nước máy đang chảy trong 5 phút; (xi) gắn vào môi trường đỡ chứa nước (Medite Medizintechnik AG, Thụy Điển).

Ví dụ 1: Đánh giá hoạt tính chủ vận của mAb1, mAb2 và mAb3

Số liệu thử nghiệm được dựa vào việc sử dụng các PBMC người ban đầu phân lập chưa được phân đoạn. Toàn bộ các chế phẩm PBMC (thay vì các tế bào B hoặc các bạch cầu đơn nhân phân lập được) bắt chước nhiều hơn với trường hợp *in vivo* trong đó mAb kháng CD40 có thể có nhiều tác dụng trực tiếp hoặc gián tiếp lên các loại tế bào bạch cầu khác nhau. Bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh PBMC này đã xác định được rằng các mAb kháng CD40 không được glycosyl hóa mAb1 (N297A) và mAb2 (D265A) vẫn giữ được trình tự axit amin của đoạn gắn kết với kháng nguyên không thay đổi từ kháng thể Chir12.12 gốc, vẫn giữ được các đặc tính phong bế CD40L không chủ vận của mAb Chir12.12 gốc. Kháng thể mAb3 (biến thể LALA) có tính chủ vận yếu khi có mặt IL-4.

Cụ thể là, các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng không có mAb nào trong số các mAb kháng CD40 cam Fc nào có khả năng kích thích phân chia tế bào bởi các PBMC người ($n = 4$ con cho), kết quả tương tự với kết quả quan sát được ở mAb Chir12.12 gốc (xem Fig.1). Các PBMC tăng sinh khi đáp ứng với CD40L. Cả mAb1 cũng như mAb2 đều không thể thúc đẩy tăng sinh các PBMC được cảm ứng bởi CpG2006 hoặc kháng IgM F(ab')₂ (Fig.2). Ngoài ra, Chir12.12 không thúc đẩy

sự tăng sinh các PBMC được cảm ứng bởi kháng IgM F(ab')₂, tuy nhiên không giống như mAb1 và mAb2 kháng thể gốc này ức chế hoàn toàn sự tăng sinh PBMC được cảm ứng bởi CpG.

Khi có mặt IL-4, mAb3 (đột biến LALA) được quan sát là gây ra lượng kết hợp thymidin nhưng có thể lặp lại được (n=4 con cho), mức mà được cảm ứng bởi một mình IL-4, trong khi đó mAb1, mAb2 và Chir12.12 không đạt được mức này (Fig.3). Nói chung các kết quả này chỉ ra rằng ngoại trừ mAb3 (khi có mặt IL-4), không một mAb kháng CD40 nào có hoạt tính chủ vận.

Các kết quả ở trên cũng chỉ rõ rằng mAb1 và mAb2 không có hoạt tính chủ vận khi có mặt các tín hiệu đồng kích thích. Đây là phát hiện quan trọng vì có thể là các bạch cầu ở bệnh nhân mắc bệnh tự miễn mạn tính có thể có kiểu hình đã hoạt hóa hoặc đã hoạt hóa một phần và do đó dễ truyền tín hiệu thông qua CD40 hoặc các tác nhân kích thích khác. Lưu ý rằng Chir12.12 (nhưng không phải mAb cầm Fc hoặc CD40L) ức chế hoàn toàn sự tăng sinh PBMC được cảm ứng bởi CpG2006. CpG2006 là phối tử tổng hợp đối với thụ thể giống Toll 9 (TLR9), thụ thể đã biểu hiện gắn kết với tác nhân gây bệnh và ssADN thu được từ vật chủ. Ở người, TLR9 được biểu hiện bởi các tế bào B và (với mức độ ít hơn) các bạch cầu đơn nhân trong máu ngoại vi. Nếu CpG chứa các ODN đã được thể hiện trước đây là thúc đẩy ADCC (Moga, *et al.* 2008), có thể được nghiên cứu rằng CpG2006 có khả năng thúc đẩy ADCC qua trung gian Fc IgG1 dòng mầm của mAb Chir12.12 gốc.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng của các mAb kháng CD40 cầm Fc trong việc phong bế sự tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L

Số liệu trước đây chỉ ra rằng Chir12.12 có thể phong bế sự tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L của các tế bào B người ban đầu và các dòng tế bào u lympho tế bào B người. Các tác giả sáng chế đã đánh giá sự ức chế tăng sinh của các PBMC qua trung gian CD40L bởi Chir12.12 và ba kháng thể theo sáng chế mAb1, mAb2, mAb3. Bảng 7 dưới đây thể hiện các trị số IC₅₀ của việc ức chế này được trình bày thành bảng theo đơn vị mg/ml (các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của ba lần nuôi cấy với SEM và đại diện của 4 con cho, các thử nghiệm độc lập). Các kết quả chỉ ra rằng Chir12.12 cũng có thể ức chế sự tăng sinh các PBMC qua trung gian CD40L. Ngoài ra, mAb1, mAb2 và mAb3 cũng phong bế hoàn toàn

sự phân chia PBMC qua trung gian CD40L với hiệu lực tương tự với Chir12.12. Không một mAb nào trong số các mAb kháng CD40 phong bế sự tăng sinh PBMC được cảm ứng bởi kháng IgM + IL-2 (số liệu không được trình bày) gợi ý rằng hoạt tính phong bế của các mAb kháng CD40 là phụ thuộc đích (và không liên quan đến chức năng Fc).

Bảng 7: Trị số IC₅₀ của sự ức chế tăng sinh PBMC qua trung gian CD40L bởi mAb kháng CD40 (µg/ml).

Kháng thể	IC ₅₀
Chir12.12 (wt Fc)	0,176
mAb1 (N297A)	0,058
mAb2 (D265A)	0,146
mAb3 (LALA)	0,118

Ví dụ 3: Gắn kết của biến thể kháng thể kháng CD40 người với dòng tế bào BJAB người

Để loại trừ các thay đổi có thể có trong việc gắn kết đặc hiệu với CD40, sự gắn kết của ba biến thể mAb1, mAb2 và mAb3 được thử nghiệm so với Chir12.12 gốc trên dòng tế bào B, BJAB, mà chủ yếu biểu hiện CD40. Sự gắn kết được thử nghiệm với liều chuẩn độ ban đầu là 10µg/mL với tỷ lệ pha loãng 1:2.

Để so sánh các đường cong của các thử nghiệm khác nhau, thì cường độ huỳnh quang trung bình cao nhất của mỗi liều chuẩn độ riêng biệt được đặt là 100% liên kết và khớp đường cong không tuyến tính được áp dụng. Trong hai thử nghiệm riêng biệt, tất cả bốn biến thể kháng thể Chir12.12, mAb1, mAb2 và mAb3 đều cho thấy các đường cong gắn kết tương đương trên các tế bào BJAB (Fig.5). Không quan sát thấy có sự thay đổi khả năng gắn kết của các biến thể với các đột biến khác nhau của vùng liên kết Fc của Chir12.12.

Do đó, các kết quả ở trên đã cho thấy rằng sự đột biến vị trí gắn kết Fc đã không làm ảnh hưởng đến vị trí gắn kết với CD40 của các vùng biến đổi của Chir12.12 gốc. mAb1, mAb2 và mAb3 vẫn giữ lại khả năng gắn kết tương đương của CD40 trên các tế bào BJAB.

Ví dụ 4: Sự kích thích/ức chế giải phóng TNF alpha từ các tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân của người bằng các biến thể Fc kháng CD40

Sự kích thích giải phóng TNF alpha từ các MoDC người bằng các biến thể Fc kháng CD40

Một số kháng thể kháng CD40 của người đã được thể hiện là có tác dụng chủ vận trên nhóm tế bào khác (Gruber 1989). Để loại trừ rằng các biến thể Fc mAb1, mAb2, mAb3 và Chir12.12 dẫn đến hoạt hóa các MoDC, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu liệu bản thân kháng thể có gây ra sự giải phóng TNF α khi được ủ trong 48 giờ với các tế bào hay không. Ngược lại với thử nghiệm đối kháng, các MoDC người 7 ngày tuổi được nuôi cấy trong 48 giờ chỉ khi có mặt tất cả bốn biến thể kháng CD40 trên đường cong đáp ứng liều bắt đầu với liều 10 μ g/mL. Sau đó, các dịch nổi được đo lượng TNF α bằng ELISA. Tất cả các biến thể kháng CD40 mAb1, mAb2, mAb3 và Chir12.12 không làm giải phóng TNF α từ các MoDC so với sự kích thích bằng CD40L là mẫu đối chứng dương tính (số liệu không được trình bày). Không quan sát thấy sự phụ thuộc liều ở cả bốn biến thể kháng thể. Lượng TNF α không làm tăng đáng kể trên mức MoDC không bị kích thích (số liệu không được trình bày). Do đó, hoạt tính chủ vận của bốn kháng thể này có thể được loại trừ.

Sự ức chế giải phóng TNF alpha từ các MoDC người bằng các biến thể Fc kháng CD40

Kháng thể Chir12.12 gốc phong bế sự tương tác của CD40-CD40L và do đó cũng sẽ phong bế sự hoạt hóa tế bào. Sự kích thích CD40 trên tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân người với các trimer CD40L dẫn đến giải phóng cytokin tiền viêm giống TNF α chẳng hạn (Ma 2009). Hơn nữa, sự thay đổi ở vùng Fc sẽ không làm ảnh hưởng đến chức năng phong bế của các biến thể so với Chir12.12. Tất cả bốn kháng thể đều ức chế giải phóng TNF α qua trung gian CD40L từ các MoDC người với trị số IC₅₀ tương đương.

Do đó, các MoDC người 7 ngày tuổi được kích thích trong 24 giờ bằng MegaCD40L, cấu trúc tái tổ hợp trimer kép với sự có mặt của cả bốn biến thể kháng CD40 phong bế. Sau đó, các dịch nổi được đo lượng TNF α bằng ELISA. Tất cả các biến thể đột biến Fc mAb1, mAb2 và mAb3 đều cho thấy sự ức chế đáp ứng theo

liều tương tự giống Chir12.12 trong ba thử nghiệm riêng biệt (số liệu không được trình bày). Các kết quả sơ bộ cũng cho thấy sự ức chế giải phóng IL-23 tương tự từ các MoDC người (số liệu không được trình bày).

Khớp đường cong không tuyến tính được áp dụng để ước tính trị số IC_{50} của tất cả bốn kháng thể và trị số IC_{50} trung bình từ các thử nghiệm được tính toán. Trị số IC_{50} trung bình của bốn biến thể của sự giải phóng $TNF\alpha$ từ các MoDC người nằm trong khoảng từ 32ng/mL đến 40ng/mL (Bảng 8). Nói tóm lại, các đột biến trong vùng Fc không làm ảnh hưởng đến tác dụng đối kháng của các biến thể kháng thể.

Bảng 8: IC_{50} của các biến thể Fc khác nhau của sự ức chế TNF alpha

	#1	#2	#3	Trung bình	SEM
Chir12.12	không được tính	41	30	36	4
mAb1	23	44	58	40	10
mAb2	41	12	42	33	10
mAb3	39	8	47	32	12

IC_{50} tính theo ng/mL của các biến thể Fc kháng CD40 người khác từ ba thử nghiệm độc lập. Khớp đường cong không tuyến tính ở #1 đối với Chir12.12 không cho phép ước tính giá trị của IC_{50} (n. c. = không được tính).

Do đó đã được thể hiện bằng các kết quả ở trên rằng tất cả bốn biến thể không hoạt hóa để gây ra sự giải phóng $TNF\alpha$ từ các MoDC. Quan trọng hơn, tất cả các biến thể mAb1, mAb2 và mAb3 đều ức chế sự tổng hợp xytokin qua trung gian CD40L bởi các MoDC người với hiệu quả *in vitro* tương tự so với Chir12.12.

Ví dụ 5: Tóm tắt số liệu

Bảng 9 dưới đây thể hiện tóm tắt một số đặc tính quan trọng của các kháng thể mAb1, mAb2 và mAb3 theo sáng chế so với kháng thể Chir12.12 gốc.

Bảng 9: Số liệu so sánh

Tiêu chí lựa chọn	Chir 12.12	mAb1	mAb2	mAb3
Gắn kết các Ab kháng CD40 với CD40 người (Biacore, Kd nM)	0,55	0,69	0,49	0,33

Hoạt tính ADCC (sự phân giải đặc hiệu được chuẩn hóa)	100%	<1%	<1%	40%
Hoạt tính chủ vận trên các huPBMC (EC50, ng/ml)	>10000	>10000	>10000	>10000
Sự ức chế CD40L – các huPBMC (IC50, ng/ml)	13	15	17	15
T _{1/2} (ngày) – PK chuột (10mg/kg)	9,3+/-0,90	8,8+/-0,49	11,6+/-2,3	không xác định

Ví dụ 6: Mô tả vắn tắt các trình tự axit amin và nucleotit hữu ích để thực hiện sáng chế

SEQ ID NO:	Mô tả trình tự
1	trình tự axit amin HCDR1 của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
2	trình tự axit amin HCDR2 của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
3	trình tự axit amin HCDR3 của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
4	trình tự axit amin LCDR1 của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
5	trình tự axit amin LCDR2 của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
6	trình tự axit amin LCDR3 của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
7	trình tự axit amin VH của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
8	trình tự axit amin VL của CHIR-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
9	Trình tự axit amin của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của CHIR-12.12
10	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ toàn vẹn của CHIR-12.12
11	Trình tự axit amin của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của mAb1
12	Trình tự axit amin toàn vẹn của chuỗi nhẹ của mAb1
13	Trình tự axit amin của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của mAb2
14	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb2
15	Trình tự axit amin của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của mAb3
16	Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb3
17	Trình tự axit amin của vùng Fc của mAb1
18	Trình tự axit amin của vùng Fc của mAb2
19	Trình tự axit amin của vùng Fc của mAb3
20	ADN mã hóa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của CHIR-12.12
21	ADN mã hóa chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của CHIR-12.12
22	ADN mã hóa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của mAb1
23	ADN mã hóa chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb1
24	ADN mã hóa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của mAb2
25	ADN mã hóa chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb2
26	ADN mã hóa chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của mAb3
27	ADN mã hóa chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ của mAb3
28	Trình tự axit amin của CD40 người

Ví dụ 7: Các trình tự axit amin và nucleotit hữu ích để thực hiện sáng chế

SEQ ID NO:	Các trình tự axit amin hoặc nucleotit chi tiết
1	SYGMH
2	VISYEESNRYHADSVKG
3	DGGIAAPGPDY
4	RSSQSLLYSNGYNYLD
5	LGSNRAS
6	MQARQTPFT
7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRT EDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS
8	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKP GQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR
9	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRT EDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
10	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKP GQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVDIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQDSKDSTY

	SLSSTLTLSKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYEESNRYH ADSVKGRFTI SRDNSKITLY LQMNSLRTE TAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
12	DIVMTQSPLS LTVTPGEPAS ISCRSSQSLL YSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLISLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVD IRRVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVADNLQ SGNSQESVTE QDSKDYSL SSTLTLSKAD YEHKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGC
13	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYEESNRYH ADSVKGRFTI SRDNSKITLY LQMNSLRTE TAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

14	DIVMTQSPLS LTVTPGEPAS ISCRSSQSLL YSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLISLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVD IRR TVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVADNLQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
15	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYEESNRYH ADSVKGRFTI SRDNSKITLY LQMNSLRTE TAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGLTTLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
16	DIVMTQSPLS LTVTPGEPAS ISCRSSQSLL YSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLISLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVD IRR TVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVADNLQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
17	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
18	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK

	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
19	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCT GGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT TCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGAGGAAAGTA ATAGATAACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGATCACGCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTCAGAACTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAG ATGGGGGTATAGCAGCACCTGGGCCTGACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCAAGTACCAAGGGCCCAT CCGTCTTCCCCCTGGCGCCCGCTAGCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGG AGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCT GGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGG CAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCCCCCC ACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCT CTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCAGGCCCCTGCA CACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCAT ATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGG

	CCAAACCTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCC AGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAAGCC AGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCC TAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTG ACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGG CCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCACCCTCTGCCCTGAG AGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
21	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGACCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCCAGTCAGAGCC TCCTGTATAGTAATGGATACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCA GAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGGTCCTGATCTCTTTGGGTCT AATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGA TCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCGACAACT

	CCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAGACGA ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
22	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCT GGCCGGTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCA AGGGACTGGAATGGGTGGCCGTGATCTCCTACGAGGAATCCA ACAGATACCACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCT CCCGGGACAACTCCAAGATCACCTGTACCTGCAGATGAACT CCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGG ACGGAGGAATCGCCGCTCCTGGACCTGATTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCT CCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGG CACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACT CCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACAC CAAGGTGGACAAGCGGGTGAACCCAAGTCCTGCGACAAGA CCCACACCTGTCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGG ACCTTCCGTGTTCTGTTCCTGTTCCTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG GACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAACAGTACGCCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGAC

	CGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCACAGGTGTA CACACTGCCCCCAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCC TGTA CTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCTACTACCCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG
23	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGACCGTGACAC CTGGCGAGCCTGCCTCTATCTCCTGCAGATCCTCCCAGTCCCT GCTGTACTCCAACGGCTACA ACTACCTGGACTGGTATCTGCAG AAGCCCGGCCAGTCCCCACAGGTGCTGATCTCCCTGGGCTCC AACAGAGCCTCTGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCT CTGGCACCGACTTCACACTGAAGATCTCACGGGTGGAAGCCG AGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCCGGCAGACCC CCTTCACCTTCGGCCCTGGCACCAAGGTGGACATCCGGCGTAC GGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGA GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCT GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGC
24	CAGGTGCAGCTGGTGG AATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCT GGCCGGTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCA AGGGACTGGAATGGGTGGCCGTGATCTCCTACGAGGAATCCA ACAGATAACCACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCT

	CCCCGGGACAACCTCCAAGATCACCCCTGTACCTGCAGATGAACT CCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGG ACGGAGGAATCGCCGCTCCTGGACCTGATTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTGACAGTGTCTCCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCCT CCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGG CACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACT CCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACAC CAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGA CCCACACCTGTCCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGG ACCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCTAAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCC GTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG GACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCACAGGTGTA CACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAACAACCTAC AAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCC TGTA CTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG
25	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGACCGTGACAC CTGGCGAGCCTGCCTCTATCTCCTGCAGATCCTCCCAGTCCCT GCTGTACTCCAACGGCTACAACCTACCTGGACTGGTATCTGCAG AAGCCCGGCCAGTCCCCACAGGTGCTGATCTCCCTGGGCTCC

	AACAGAGCCTCTGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCT CTGGCACCGACTTCACACTGAAGATCTCACGGGTGGAAGCCG AGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCCGGCAGACCC CCTTCACCTTCGGCCCTGGCACCAAGGTGGACATCCGGCGTAC GGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGA GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCT GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
26	CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCT GGCCGGTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGCA AGGGACTGGAATGGGTGGCCGTGATCTCCTACGAGGAATCCA ACAGATAACCACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCT CCCGGGACAACCTCCAAGATCACCCCTGTACCTGCAGATGAACT CCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGG ACGGAGGAATCGCCGCTCCTGGACCTGATTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCT CCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGG CACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAG CCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCG TGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCCTCCGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACC AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACC CACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCC CTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT

	GTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGG AACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACAA TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTGTACA CCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGC CGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAA GACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTG TACTCCAAACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGC AACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG
27	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGACCGTGACAC CTGGCGAGCCTGCCTCTATCTCCTGCAGATCCTCCCAGTCCCT GCTGTACTCCAACGGCTACAACCTACCTGGACTGGTATCTGCAG AAGCCCGGCCAGTCCCCACAGGTGCTGATCTCCCTGGGCTCC AACAGAGCCTCTGGCGTGCCCGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCT CTGGCACCGACTTCACACTGAAGATCTCACGGGTGGAAGCCG AGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCCGGCAGACCC CCTTCACCTTCGGCCCTGGCACCAAGGTGGACATCCGGCGTAC GGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAC AACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGA GCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCT GACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA GAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
28	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPG QKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDT

WNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTS EACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSD TICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDV VCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILL VLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETL HGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

Ví dụ 8: Các kết quả độc tính

Mục đích chính của nghiên cứu độc tính là để xác định độc tính của mAb1, sau khi dùng trong tĩnh mạch mỗi lần một tuần cho khỉ cynomolgus trong 5 tuần (6 lần dùng kháng thể thử nghiệm). Phiên bản không cam (ADCC) của kháng thể này (Chir12.12) cũng được sử dụng để so sánh các tác dụng của kháng thể hoạt hóa ADCC với phiên bản cam ADCC (mAb1).

Ngoài ra, các con khỉ được tạo miễn dịch với KLH để đánh giá hiệu quả của cả hai Ab kháng CD40.

Không thấy có trường hợp nào chết hoặc thay đổi khối lượng cơ thể, các dấu hiệu lâm sàng, và mức tiêu thụ thức ăn ước tính có thể do điều trị với mAb1 hoặc Chir12.12. Các phản ứng cục bộ ở vị trí tiêm KLH có thể tương đương nhau ở tất cả các nhóm.

Ngoài ra, không có phát hiện nào liên quan đến kháng thể thử nghiệm trong các nghiên cứu ở mắt và tim mạch.

Về huyết học quan sát thấy có sự giảm nhẹ nhưng có ý nghĩa thống kê về phần trăm và số lượng bạch cầu ái kiềm tuyệt đối ở các con được điều trị bằng mAb1 và Chir12.12: mối liên quan với việc điều trị bằng kháng thể thử nghiệm không thể loại trừ. Phân tích nước tiểu đã phát hiện thấy các keton trong nước tiểu của 1/5 số con khỉ cái được điều trị bằng mAb1 và 2/5 số con khỉ cái được điều trị bằng Chir12.12 với mối liên quan không rõ ràng với việc dùng kháng thể. Trong hóa học lâm sàng, quan sát thấy nồng độ lipaza có xu hướng tăng nhẹ đối với các con khỉ đực được điều trị bằng Chir12.12 cũng như một con khỉ cái được điều trị bằng Chir12.12, tuy nhiên điều này có thể xem như là có liên quan đến độc tính hạn chế.

Sự đông máu không bị ảnh hưởng bởi việc điều trị bằng mAb1 hoặc Chir12.12 như được đánh giá bằng thời gian tạo prothrombin, thời gian prothrombin được hoạt hóa một phần, và fibrinogen. Tổng số lượng tiểu cầu nằm trong khoảng bình thường. Nồng độ P-selectin hoặc sCD40L trong huyết tương không chỉ ra sự hoạt hóa tiểu cầu.

Ở các con được điều trị bằng Chir12.12, kiểu hình miễn dịch máu đã cho thấy sự giảm đáng kể lượng tế bào B $CD20^+$, mà là hoạt động được lý mong đợi của kháng thể này. Đặc biệt là, các tế bào B $CD20^{thấp}CD21^+$ B (mà được cho là $CD40^{cao}$) được làm suy yếu bằng Chir12.12. Tuy nhiên, các tế bào B $CD20^{cao}CD21^-$ cũng được giảm đáng kể đặc biệt về cuối nghiên cứu. Tốt hơn là, các tế bào B chưa từng thử nghiệm $CD20^+CD21^+CD27^-$ được làm suy yếu bằng kháng thể hoạt hóa ADCC Chir12.12, trong khi các tế bào B nhớ $CD20^+CD21^+CD27^+$ hiếm khi bị ảnh hưởng. Số lượng tuyệt đối của các tế bào NK $CD16^+$ cũng giảm khoảng 50% ở các động vật được điều trị bằng Chir12.12. Như mong muốn, sau khi điều trị bằng mAb1 (mà là ADCC-câm), không quan sát thấy sự giảm đáng kể tế bào B $CD20^+$ cũng như không có sự giảm bất kỳ nào về số tế bào NK $CD16^+$ tuyệt đối. Duy chỉ các tế bào B cho thấy sự giảm vừa phải trong suốt quá trình dùng kháng thể là tế bào B $CD20^{cao}CD21^-$. Các tế bào này đã được biết là đặc hiệu ở khí và có nguồn gốc từ tủy xương, do đó phát hiện này không được xem là có liên quan đến sự biến đổi sang người.

Việc tạo kiểu hình miễn dịch của lá lách và các hạch bạch huyết rút hết KLH lúc mổ tử thi cho thấy trường hợp tương tự. Số lượng tương đối của tế bào B $CD20^+$ giảm ở các con được điều trị bằng Chir12.12, tuy nhiên không quan sát thấy sự giảm thích hợp tế bào B $CD20^+$ ở các con được điều trị bằng mAb1 với sự giảm nhẹ đến vừa phải các tế bào B $CD21^-$ (các hạch bạch huyết của khí ở cả hai giới, với lách chỉ ở khí đực). Không có sự khác biệt về các kết quả tạo kiểu hình miễn dịch đối với vị trí tiêm hạch bạch huyết phải và trái rút KLH.

Phản ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T (T-cell dependent antibody reaction - TDAR) đã cho thấy rằng, so với nhóm đối chứng, không quan sát thấy đáp ứng IgG và IgM với KLH ở các con được điều trị bằng mAb1 hoặc Chir12.12. Vì việc phong bế sự hoạt hóa tế bào B bằng cách ức chế tương tác của phối tử $CD40 - CD40$ là

hoạt động được lý dự định của mAb1, và vì Chir12.12 được dự định làm suy yếu tế bào B, nên phát hiện này cũng được xem như không liên quan về độc tính.

Đánh giá động học độc tính cho thấy rằng các nồng độ ở vùng lõm tăng lên trong quá trình nghiên cứu chứng tỏ sự tích lũy mAb1 và Chir12.12. Các nồng độ ở vùng lõm trung bình sau liều thứ tư và thứ năm là tương tự nhau, chứng tỏ tình trạng bệnh đạt tới trạng thái gần ổn định sau liều thứ năm đối với mAb1 và Chir12.12. Mức phơi nhiễm trung bình (ở cả hai giới) qua khoảng thời gian dùng kháng thể (AUC_T) sau liều thứ tư và thứ năm là 906 và 990 h.mg/mL, tương ứng đối với mAb1, và 757 và 751 h.mg/mL, tương ứng đối với Chir12.12. Các trị số AUC_T cũng chỉ ra các tình trạng bệnh đạt tới trạng thái gần ổn định sau khi dùng liều thứ năm.

Các kiểm tra vĩ mô đã không cho thấy bất kỳ bằng chứng nào về độc tính trên cơ quan đích, và khối lượng các cơ quan cũng nằm trong khoảng bình thường ở loài này.

Về mặt vi mô, các phát hiện có liên quan đến kháng thể thử nghiệm của cả hai kháng thể đã cho thấy ở tất cả các cơ quan bạch huyết (lá lách và hạch bạch huyết (mạch treo ruột, hàm dưới, nách, và bẹn)), ở đó mAb1 và Chir12.12 ức chế hoàn toàn sự phát triển tâm mầm ở vùng tế bào B vỏ não. Việc nhuộm miễn dịch CD20 của lá lách và mô hạch bạch huyết đối bên rút hết KLH đã cho thấy kích cỡ của nang lymphô trong lá lách cũng như việc làm cạn kiệt tế bào B trong lá lách và hạch bạch huyết, một tác dụng mà được báo cáo nhiều hơn ở các con được điều trị bằng Chir12.12 so với điều trị bằng mAb1. Các phát hiện tâm mầm ở các con được điều trị bằng mAb1 phù hợp với việc giảm tế bào B CD21⁺ được nhận thấy trong nghiên cứu xác định kiểu hình. Việc nhuộm miễn dịch CD40 đã cho thấy sự giảm đáng kể việc nhuộm CD40 trong hạch bạch huyết và lá lách sau khi điều trị bằng mAb1 hoặc Chir12.12.

Kết luận, dựa vào các kết quả của nghiên cứu này, việc dùng mAb1 hoặc Chir12.12 trong tĩnh mạch mỗi lần một tuần trong 5 tuần (6 lần dùng) với nồng độ 100mg/kg cho các con khỉ cynomolgus đực và cái được dung nạp tốt. Việc tạo kiểu hình miễn dịch đã cho thấy sự cạn kiệt tế bào B ở các con được điều trị bằng Chir12.12 nhưng không được điều trị bằng mAb1 ngoại trừ tế bào B CD21⁺, tuy

nhiên TDAR đã cho thấy sự không có mặt phản ứng IgG và IgM sau khi tạo miễn dịch bằng KLH ở cả con được điều trị bằng mAb1 và Chir12.12. Mô bệnh học đã cho thấy thiếu các tâm mầm ở lá lách và hạch bạch huyết từ các con được điều trị bằng mAb1 và Chir12.12. Các tác dụng trên tế bào B là hoạt động được lý mong muốn và do đó không được xem là có hại. Mức tác dụng có hại không quan sát được (no-observable-adverse-effect level - NOAEL) được coi như là ở liều 100mg/kg đối với cả mAb1 và Chir12.12 trong các điều kiện của nghiên cứu này.

Ví dụ 9: Xác định profin *in vitro* khác của mAb1

Sự gắn kết và phản ứng chéo chức năng của mAb1 được xác định giữa các bạch cầu người, khỉ zerut và khỉ cynomolgus. Bảng 10 thể hiện sự so sánh trực tiếp của các trị số EC50 gắn kết đối với mAb1 ở cả ba loài.

Bảng 10: Tính phản ứng chéo của mAb1 ở người và NHP.

Thử nghiệm	Người	Khỉ zerut	Cynomolgus
Sự gắn kết với CD40 (các tế bào B CD20+ – FACS) (EC50, µg/ml)	0,26, 0,28	0,22+/-0,033 (n=6)	0,3, 0,24
Sự ức chế CD154 (tế bào B người & các PBMC) (IC50, µg/ml)	0,058, 0,075 (các tế bào B amidan người)	0,03+/-0,017 (n = 6) (các PBMC)	0,015, 0,02 (các PBMC)

mAb1 liên kết với các tế bào CD20+ (các tế bào B) của tất cả ba loài với EC50 tương đương. Ngoài ra, mAb1 có thể ức chế sự tăng sinh các tế bào B amidan người cũng như các PBMC từ khỉ Cynomolgus và khỉ zerut được cảm ứng bởi CD154+IL-4. Nói chung, các kết quả này chỉ ra rằng khả năng mAb1 liên kết với CD40 và ức chế sự tăng sinh các tế bào B người hoặc các PBMC động vật linh trưởng không phải người được cảm ứng bởi CD154 là rất giống nhau. Số liệu mức

chiếm giữ thụ thể (receptor occupancy - RO) *in vitro* và ức chế chức năng đã cho phép có mối liên hệ giữa hai biến số này được xác định cho mỗi loài (Bảng 11).

Bảng 11: Mối liên hệ giữa RO và sự ức chế chức năng của mAb1

	IC ₅₀ trong thử nghiệm ức chế chức năng ^a (µg/mL)	RO ^{b,c} <i>in vivo</i> tương ứng (%)
Khỉ zerut	0,02551	22,9
Người	0,067	43,8

^a Sự tăng sinh các PBMC ở khỉ zerut và tế bào B amidan ở người được cảm ứng bởi CD154 + IL4 hòa tan.

^b KD *in vivo* giả định ở khỉ zerut và ở người là giống nhau như KD được tính toán trong nghiên cứu PK/PD ở khỉ cyno.

^c mAb1 giả định là cao hơn [đích] khi áp dụng phương trình Hill-Langmuir.

Các kết quả chỉ ra rằng các PBMC khỉ zerut có RO bởi mAb1 nhỏ hơn khoảng 2 lần so với các tế bào B người để ức chế 50% sự tăng sinh PBMC. Ở người, sự ức chế hoàn toàn có thể thu được với RO xấp xỉ 75% (được dự đoán *in vivo*).

Ví dụ 10: Nghiên cứu cấy ghép

Sự tồn tại của mảnh ghép

Điều trị kết hợp mAb1 (30mg/kg trong tĩnh mạch) và cyclosporin A, 20mg/kg dùng qua đường miệng trong quá trình cấy ghép thận cùng loại dẫn đến kéo dài đáng kể sự tồn tại của 6 con tham gia trong nghiên cứu. Các mảnh ghép hoạt động trong suốt >91*, 31, >92*, >92*, >98* và >98* ngày (trung bình: >83,6 ngày) ở các con #5529, #5533, #5523, #5524, #5536 và #5538, tương ứng (* kết thúc quy trình thử nghiệm). Sự tồn tại ở các con không được điều trị (hoặc được điều trị với các liều IS dưới mức điều trị) nằm trong khoảng từ 7-10 ngày (số liệu bệnh sử).

Con #5533 được gây chết sau 31 ngày cấy ghép, do suy thận cấp tính và tiểu khó. Nguyên nhân gây bệnh này xuất hiện sau thời gian bị tăng huyết áp kéo dài và gây mê để lấy sinh thiết.

Theo dõi sau cấy ghép

(a) Nồng độ creatinin (SCrea) và urê (SUrê) trong huyết thanh

SCrea là thông số chính được sử dụng để đánh giá chức năng thận. Ở tất cả 6 con, các mức SCrea tăng trên mức ban đầu sau khi cấy ghép một ngày (từ $81,8 \pm 14,6$ đến $221,5 \pm 37,1$ $\mu\text{mol/l}$). SCrea tăng lên như vậy là một đặc điểm phổ biến ở tuần đầu tiên sau khi cấy ghép (Bảng 12).

Bảng 12: Sự thay đổi lượng SCrea được quan sát ở các con khi nhận cấy ghép cùng loại thận NHP được điều trị bằng liệu pháp kết hợp mAb1 và CsA với liều tương ứng 30 và 20mg/kg

Ngày sau khi cấy ghép	Lượng sCrea ($\mu\text{mol/l}$)					
	#5536	#5538	#5523	#5524	#5529	#5533
-4	101	109	85	73	81	86
-1	106	89	80	71	95	76
0	95	105	74	72	76	69
1	234	238	213	198	277	169
3	190	261	148	155	243	191
7	112	189	136	141	110	110
10	111	172	193	206	102	139
14	101	166	209	165	103	156
17	113	181	277	157	94	175
21	114	162	192	117	111	206
24	112	156	155	124	111	191
28	95	133	119	111	100	170
31	95	139	119	106	122	629
35	103	135	110	100	104	
38	104	128	111	109	108	
42	107	113	110	101	114	
45	95	124	108	115	113	
49	103	118	104	106	101	
52	107	129	105	111	102	
56	122	103	112	95	101	

59	112	105	94	97	99	
63	110	120	115	115	99	
66	103	132	110	104	107	
70	101	116	91	100	105	
73	103	124	105	120	109	
77	103	109	98	121	105	
80	103	101	102	113	109	
84	101	104	120	126	110	
87	107	103	111	112	108	
91	100	112	119	112	105	
94	117	133				

Trong suốt tuần đầu tiên, các nồng độ SURê tăng nhanh chóng trên mức ban đầu được đo vào ngày 0 ($4,5 \pm 1,3$ mmol/l) (Bảng 13). Ở các con #5529/#5533 và #5536/#5538, lượng SURê là 16-20 mmol/l (ngày 3-5), trong khi ở các con #5523 và #5524 tương ứng là 9 hoặc 8 mmol/l (ngày 7).

Bảng 13: Sự thay đổi SURê được quan sát ở khi nhận mảnh ghép cùng loại thận NHP được điều trị bằng liệu pháp kết hợp mAb1 và CsA với liều tương ứng 30 và 20mg/kg,

Ngày sau khi cấy ghép	Lượng sURê (mmol/l)					
	#5536	#5538	#5523	#5524	#5529	#5533
-4	7	5	4	4	8	5
-1	7	6	5	6	9	5
0	6	4	3	4	6	5
1	14	12	7	8	13	9
3	20	17	5	6	16	15
7	9	14	9	8	9	11
10	5	10	17	14	6	11
14	6	8	18	13	5	18

17	7	10	16	8	5	15
21	7	10	14	7	4	19
24	6	9	8	6	4	17
28	8	10	11	8	4	12
31	6	9	11	8	4	18
35	7	10	8	7	6	
38	7	8	6	5	6	
42	7	9	10	7	6	
45	7	9	10	8	6	
49	9	9	8	6	8	
52	6	8	6	6	7	
56	8	9	9	9	6	
59	4	8	9	10	8	
63	6	9	8	7	7	
66	7	11	7	7	7	
70	6	9	10	9	7	
73	7	9	9	10	5	
77	11	14	8	10	7	
80	6	7	7	8	7	
84	6	7	9	9	6	
87	6	8	8	8	6	
91	7	8	10	10	5	
94	7	8				

Một tuần sau khi cấy ghép, chức năng thận có xu hướng bình thường và SCrea/Surê trở nên gần với mức ban đầu. Tuy nhiên, các con #5533, #5523 và #5524 (nhưng không phải #5529, #5536 và #5538) đã cho thấy SCrea/SUre tăng thêm ở thời điểm từ ngày 7 đến ngày 19-25 sau khi cấy ghép, chứng tỏ suy thận. Trong suốt thời kỳ này các dấu hiệu như chứng khát nhiều/chứng tiểu nhiều (#5523 và #5524), canxi huyết được duy trì ở mức cao (SCa) (#5533) hoặc tăng thể tích mảnh ghép (#5523 và #5524).

Sau ngày 20-25, các con #5529, #5523, #5524, #5536 và #5538 được cải thiện và cho thấy chức năng thận tuyệt vời cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Tuy nhiên, ở ngày 31, con #5533 thể hiện các mức SCrea/SURê tăng rõ rệt, khẳng định suy thận cấp tính (SCrea; 629 $\mu\text{mol/l}$ và SURê; 18 mmol/l). Bệnh lý này xảy ra sau thời gian tăng huyết áp duy trì và quy trình lấy sinh thiết một ngày trước khi gây chết. Trong suốt thời kỳ này, các đỉnh tăng huyết áp (~ 170 mmHg tâm thu) và giai đoạn giảm huyết áp (~ 40 mmHg tâm thu) được ghi lại.

(b) Nồng độ amylaza, lipaza trong huyết thanh, khối lượng cơ thể và tổng số tiểu cầu

Nồng độ amylaza huyết thanh tăng nhẹ khoảng gấp 1,3 lần ở tất cả các con ở các ngày 1-7 sau khi cấy ghép (311 ± 53 U/L ở ngày 0 và $418 \pm 66,8$ U/L ở ngày 7 sau khi cấy ghép) (Bảng 14). Con #5533 đã quan sát thấy có nồng độ amylaza cao nhất trong nghiên cứu ở ngày 1 sau khi cấy ghép (1050 U/L). Trước khi cấy ghép, không quan sát thấy sự khác nhau giữa lượng amylaza trước khi dùng liều mAb1 đầu tiên và sau 24 giờ (ngày -1 và ngày 0).

Bảng 14: Nồng độ amylaza trong huyết thanh (U/L) ở các con được ghép thận được điều trị bằng hỗn hợp của mAb1 với liều 30mg/kg trong tĩnh mạch và CsA với liều 20mg/kg qua đường miệng

Thời gian sau khi cấy ghép	Lượng amylaza trung bình (U/L)	STDEV	Lần tăng
Ngày 0	311	52,95	
Ngày 7	418,2	66,8	1,34
Ngày 14	459,2	71,5	1,48
Ngày 56	526,6	121,5	1,69
Ngày 84	460,4	66,8	1,48

Nồng độ lipaza trung bình trong huyết thanh thay đổi ít trước và sau khi cấy ghép (Bảng 15). Chỉ duy nhất ở cuối của quy trình thử nghiệm, có thể thấy sự tăng ít (ngày 84; gấp 2,18 lần). Con #5533 thể hiện nồng độ lipaza cao nhất đo được ở ngày 1 (284,4 U/L). Số liệu lipaza từ con #5536 và #5538 không có sẵn. Mức thay

đổi nồng độ amylaza và lipaza là tương tự với các mức được tìm thấy trong các thử nghiệm cấy ghép khác bằng cách sử dụng các kháng thể khác hoặc các hợp chất có khối lượng phân tử thấp (số liệu không được trình bày).

Bảng 15: Nồng độ lipaza trong huyết thanh (U/L) ở bốn con khi ghép thận được điều trị bằng hỗn hợp của mAb1 với liều 30mg/kg trong tĩnh mạch và CsA với liều 20mg/kg qua đường miệng

Thời gian sau khi cấy ghép	Lượng lipaza trung bình (U/L)	STDEV	Lần tăng
Ngày 0	12	1,3	
Ngày 7	13,05	2,26	1,09
Ngày 14	12,9	1,25	1,08
Ngày 56	16,6	3,41	1,38
Ngày 84	26,2	21,06	2,18

Mức giảm khối lượng cơ thể nhanh và rõ rệt phần lớn có thể quan sát thấy ở các con #5529, #5533 và #5536. Trong tất cả 6 con được cấy ghép, mức giảm khối lượng cơ thể nằm trong khoảng từ -4 đến -18% trong suốt 21 ngày đầu tiên sau khi cấy ghép. Tuy nhiên, sự giảm khối lượng cơ thể có hướng hồi phục sau thời điểm đó và về cuối nghiên cứu.

Tổng số tiểu cầu là bình thường (300-400 tế bào x $10^3/\mu\text{l}$) hoặc tăng lên trong suốt thời kỳ sau khi cấy ghép 600-800 tế bào x $10^3/\mu\text{l}$. Con #5529 được điều trị bằng aspirin trong 3 ngày (ngày 7-9) do tổng số tiểu cầu tăng nhanh. Con #5533 đã cho thấy tăng tiểu cầu kéo dài (>1000 tế bào x $10^3/\mu\text{l}$) và được điều trị aspirin giữa các ngày 7-26.

(c) Lượng mAb1 trong máu và tổng số tế bào B

Nghiên cứu PK/PD tham chiếu và phân tích được thực hiện trước đây trong đó khỉ cynomolgus được cho dùng một liều kháng thể duy nhất trong tĩnh mạch với liều 10mg/kg (số liệu không được trình bày). Trong nghiên cứu này, các profin nồng độ theo thời gian đã thể hiện việc sử dụng qua trung gian đích rõ ràng (target mediated disposition - TMD), với một con có biểu hiện độ thanh thải nhanh hơn so với con còn lại, do mức biểu hiện đích có thể cao hơn, đặc biệt là vai trò của mức

biểu hiện đích trong việc điều chỉnh PK. Từ nghiên cứu này, cũng đã khẳng định rằng khi nồng độ mAb1 trong huyết thanh cao hơn khoảng 5 microg/mL, mức chiếm giữ thụ thể CD40 hầu như là 100%.

Việc thiết kế nghiên cứu cấy ghép (hàng tuần và mức liều mAb1 cao - 30mg/kg, và không có pha phục hồi/rửa sạch thuốc) không cho phép mức phân tích và việc lập mô hình giống như nghiên cứu PK/PD được thực hiện trước đó. Tuy nhiên, các quan sát sau đó được thực hiện (tóm tắt trong Bảng 16); i) mAb1 không được phát hiện trong các mẫu thu thập trước khi dùng liều đầu tiên, ii) mAb1 được phát hiện suốt giai đoạn dùng liều và, iii) trong tất cả các mẫu thu thập và các nồng độ giảm giữa các cá nhân là khác nhau (1200 - 2500 microg/mL đối với khỉ cynomolgus 5524, 1000 - 2000 microg/mL đối với khỉ cynomolgus 5523 và 850 - 2400 microg/mL đối với khỉ cynomolgus 5529). Tất cả các giá trị phơi nhiễm đều là trên (170 đến 500 lần) nồng độ cần thiết để thu được mức chiếm giữ thụ thể hoàn toàn ở khỉ cynomolgus.

Bảng 16: Nồng độ mAb1 trong huyết thanh ở khỉ cynomolgus #5533, #5529, #5523 và #5524

Thời gian (ngày)	mAb1 (microg/mL)			
	Cyno_5533	Cyno_5529	Cyno_5523	Cyno_5524
-1	0	0	0	0
3	591	618	1315	1384
7	682	1003	1033	1135
7,01	1557	1553	2452	2669
14	925	1037	1463	1744
28	654	896	1672	1965
42		851	1770	1259
56		1896	1991	1283
70		2385	1641	2534
84		2191	1266	2402
91		2069	1066	2071

Thử nghiệm tạo miễn dịch (kháng thể kháng mAb1 của khi) cũng được đánh giá trong nghiên cứu này. Tất cả các mẫu đều cho kết quả âm tính, nhưng lượng mAb1 cao trong các mẫu này, có thể phòng ngừa một cách tiềm năng việc phát hiện chúng do sự can thiệp thuốc.

Sự cạn kiệt một phần các tế bào CD20+ có thể được quan sát theo thời gian ở tất cả các con được điều trị. Các quan sát tương tự đã được thấy trong nghiên cứu PK/PD được thực hiện trước đó (số liệu không được trình bày).

Kết quả mô học

Đánh giá mô bệnh học của các mảnh ghép cùng loại thận đã cho thấy không có sự thải loại cấp tính và mạn tính ở các mảnh ghép #5523, #5524, #5529 và #5538, và ranh giới thay đổi ở mảnh ghép #5536 mà đạt được ở cuối của thử nghiệm, nghĩa là (các kết quả được tổng kết trong Bảng 17). Sự thâm quanh mạch tối thiểu và sự thâm qua kẽ ở các con #5523 #5524 và #5538, và sự tăng sinh tế bào cầu thận tối thiểu ở con #5529 được quan sát.

Bảng 17: Kết quả mô học

Con số	Mẫu	Ngày sau khi cấy ghép	Crea/Urê	Chẩn đoán
#5529	sinh thiết	30	100/4	Banff: không thải loại
10-0001	mổ tử thi	91	105/5	Banff: không thải loại (tăng sinh tế bào cầu thận tối thiểu, xơ hóa nội mạc tối thiểu)
				Khác: Thiếu sự hình thành GC ở các cơ quan bạch huyết thứ cấp. Viêm ruột kết manh tràng (B. coli). Không có các thay đổi khác liên quan đến điều trị.
#5533	sinh thiết	30	170/12	Banff: IA, lan tỏa xơ hóa kẽ sớm, sự tạo thành hốc nhỏ hình ống

10-0002	mổ tử thi	31	629/18	Banff: khác (giãn ống, thâm qua kẽ và xơ hóa, viêm ống tối thiểu, áp xe quanh đường nổi mạch máu, tế bào ura eozin quanh niệu quản)
				Khác: thiếu sự tạo thành GC ở các cơ quan bạch huyết thứ cấp. Viêm ruột kết manh tràng (B. coli). Không có sự thay đổi khác liên quan đến điều trị.
#5523	sinh thiết	không	không	
11-0001	mổ tử thi	92	119/10	Banff: không bị thải loại (sự thâm nhập quanh mạch tối thiểu, chất tạo nhầy trong một tĩnh mạch))
				Thiếu sự tạo thành GC ở các cơ quan bạch huyết thứ cấp. Không có sự thay đổi khác liên quan đến điều trị.
#5524	sinh thiết	không	không	
11-0002	mổ tử thi	92	112/10	Banff: không thải loại (sự thâm nhập kế đa ổ tối thiểu),
				Thiếu sự tạo thành GC ở các cơ quan bạch huyết thứ cấp. Không có các thay đổi khác liên quan đến điều trị.
#5536	sinh thiết	không	không	

11-0002	mổ tử thi	98	104/8	Banff: thay đổi ranh giới (sự thâm nhập kẽ đa ổ tối thiểu với viêm ống trung tâm tối thiểu), các tế bào huyết tương trung tâm
				Thiếu sự tạo thành GC ở các cơ quan bạch huyết thứ cấp. Không có các thay đổi khác liên quan đến điều trị.
#5538	sinh thiết	không	không	
11-0002	mổ tử thi	98	114/9	Banff: không thải loại (có sự thâm nhập kẽ đa ổ tối thiểu)
				Thiếu sự tạo thành GC ở các cơ quan bạch huyết thứ cấp. Viêm bạch huyết-mô bào trung tâm một bên ở phổi. Không có các thay đổi khác liên quan đến điều trị.

Con #5533 mà được gây chết vào ngày 31 sau khi cấy ghép đã biểu hiện giãn ống, thâm nhập kẽ và xơ hóa nhưng chỉ viêm ống thận tối thiểu. Ngoài ra, đã phát hiện thấy sự thâm nhiễm ưa eozin nổi trội ở vùng lân cận niệu quản và áp xe gần đường nối mạch máu. Tất cả các phát hiện đã chỉ ra chức năng thận yếu kéo dài song không thể khẳng định được việc thải loại.

Việc nhuộm miễn dịch C4d là âm tính ở tất cả các trường hợp.

Thiếu sự phát triển tâm mầm có hoặc không quan sát thấy hiện tượng teo nang được quan sát thấy ở các cơ quan bạch huyết ở tất cả các con. Viêm ruột kết manh tràng bị gây ra do nhiễm *Balantidium coli* được chẩn đoán ở các con #5529 và #5533.

Không có các thay đổi nào khác liên quan đến điều trị được quan sát thấy.

Nghiên cứu cấy ghép – thảo luận

Mục đích của nghiên cứu cấy ghép là để đánh giá, trong mô hình thải mảnh ghép cùng loại thận của động vật linh trưởng không phải người, tác dụng có lợi của mAb1 khi được dùng trong liệu pháp điều trị kết hợp với liều dưới liều điều trị của cyclosporin A. Ngoài ra, thích hợp để đánh giá sự không có tác dụng phụ ở mô hình trong đó tình trạng viêm toàn thân giảm.

Khi được dùng như liệu pháp điều trị kết hợp với liều dưới liều điều trị của CsA (20mg/kg qua đường miệng), mAb1 đã cho thấy hiệu quả trong việc làm tăng sự tồn tại của các mảnh ghép cùng loại thận ở các NHP. Thời gian tồn tại trung bình của mảnh ghép là >83,6 ngày và 5 trong số 6 con đạt được đến cuối quy trình thử nghiệm (được thiết lập trong 91-98 ngày).

Việc nhắm vào CD40 bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD40 phong bế không chủ vận (mAb1) dẫn đến kéo dài thời gian tồn tại mảnh ghép ở các NHP được cấy ghép tiểu đảo hoặc thận. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã đánh giá hiệu quả và độ an toàn của việc sử dụng mAb1 (mà là câm Fc) tốt hơn so với Chir12.12 được báo cáo trước đó (kháng thể kháng CD40 đơn dòng của người toàn vẹn của isotyp IgG1/kapa với các đặc tính làm cạn kiệt tế bào B và phong bế đồng kích thích).

Trong toàn bộ thời kỳ sau khi cấy ghép, không có mặt bất kỳ hậu quả bệnh lâm sàng có liên quan nào (ví dụ tăng nhẹ lượng amylaza/lipaza góp phần vào việc suy chức năng thận thông thường sau khi cấy ghép). Tuy nhiên, các con #5333, #5523 và #5524 đều cho thấy chức năng thận giảm ở thời điểm nằm trong khoảng từ 7 đến 19. Khoảng thời gian này thường được đặc trưng bởi sự phục hồi lượng SCrea/Surê, huyết áp và thể tích mảnh ghép ở các con sau khi cấy ghép. Trong các con này, các dấu hiệu suy chức năng thận được thấy như SCrea/SUre tăng lên (tất cả 3 con), thể tích mảnh ghép tăng tạm thời (#5523, #5524) hoặc chứng khát nhiều/chứng tiểu nhiều (#5523, #5524). Một giả thiết có thể là các con này đã phát triển quy trình thải loại sớm, mà được kiểm soát sau 3 tuần điều trị bằng mAb1. Sự bất thường này ở giai đoạn sớm sau khi cấy ghép có thể là do sự khác nhau được tạo ra bởi mô hình miễn dịch của sự hoạt động con đường CD40 hướng đích phân tử (câc Fc).

Một con (#5533) được gây chết vào ngày 31 do suy thận cấp tính (không thải loại). Kết quả này là do hồi phục không hoàn toàn chức năng thận sau quá trình cấy ghép. Các dấu hiệu chỉ ra chức năng thận yếu là lượng S_{Urê} cao (11-19 mmol/l) hoặc nồng độ S_{Ca} cao được duy trì (>2,8 mmol/l). Việc mất mảnh ghép cuối được tăng lên bởi tình trạng tăng huyết áp được duy trì (>140 mmHg tâm thu) kết hợp với tình trạng giảm huyết áp được quan sát trong suốt thời gian gây mê được áp dụng trong quá trình lấy sinh thiết và các đỉnh tăng huyết áp cao được ghi vào tối trước khi gây chết (~170 mmHg tâm thu) (Palmer BF (2002) N. Engl. J. Med; 347(16):1256-1261). Tất cả các biểu hiện đó không thể góp phần vào việc điều trị bằng mAb1 và chỉ góp phần vào các khác biệt giữa các cá nhân ở giai đoạn sau khi cấy ghép.

Hiệu quả cao của liệu pháp điều trị kết hợp có thể cũng được chứng minh về mô học. 5 trong số 6 mảnh ghép đã cho thấy chất lượng mảnh ghép tuyệt vời ở cuối của thử nghiệm. Thiếu sự phát triển tâm mầm cũng được quan sát ở thử nghiệm cấy ghép với Chir12.12. Không quan sát thấy sự thay đổi mô khác liên quan đến điều trị.

Một con sống sót kéo dài (#5529) đã phát triển bệnh viêm ruột kết mãn tràng do *Balantidium coli* gây ra. Mặc dù, bệnh lây nhiễm này thường gặp ở khỉ macaques và thường không có triệu chứng, nhưng sự ức chế miễn dịch có thể dẫn đến sự khởi phát bệnh cấp tính (Schuster FL, Ramirez-Avila L, (2008) Clin. Microbiol. Rev; 21(4): 626-38). Ở con này không quan sát thấy các dấu hiệu lâm sàng, như tiêu chảy hoặc giảm khối lượng cơ thể.

Về việc theo dõi tổng số tế bào B, việc làm cạn kiệt một phần có thể được quan sát theo thời gian ở tất cả các con được điều trị. Việc làm cạn kiệt một phần này có thể không do việc làm cạn kiệt qua trung gian thụ thể Fc có hoạt tính vì mAb1 là kháng thể câm, mà không liên kết với FcR cũng như không qua trung gian ADCC *in vitro*. Việc làm cạn kiệt một phần có thể là do thiếu các tâm mầm, mà được quan sát trên mô học ở cuối của thử nghiệm. Việc làm cạn kiệt một phần này có thể là do thiếu các dấu hiệu tồn tại.

Tóm lại, các kết quả của nghiên cứu cấy ghép ủng hộ việc sử dụng mAb1 như các đích có giá trị để điều trị sự thải loại thận trong liệu pháp điều trị kết hợp

với profin an toàn tuyệt vời. Profin an toàn tuyệt vời và hiệu quả còn ủng hộ việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong điều trị rối loạn tự miễn và/hoặc rối loạn viêm, và phòng sự thải ghép qua trung gian truyền tín hiệu CD40 qua trung gian CD40L trên các tế bào biểu hiện kháng nguyên CD40.

Tổng kết

Kháng thể kháng CD40 chưa được báo cáo là gây ra các tác dụng cầm máu trên các bệnh nhân, tuy nhiên sự tăng enzym tụy ở các bệnh nhân u lympho tế bào B dùng Ab kháng CD40 Chir12.12 và nguy cơ viêm tụy có thể xảy ra loại trừ việc sử dụng kháng thể kháng CD40 khả biến Fc trong bệnh tự miễn mạn tính và sự cấy ghép vì các lý do an toàn. Do đó, các tác giả của sáng chế tạo ra kháng thể kháng CD40 IgG1 cầm Fc (mAb1, mAb2, và mAb3) không thể gây ra độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) cả *in vitro* và *in vivo*. mAb1 không thể kéo dài thời gian tồn tại mảnh ghép cùng loại thận ở động vật linh trưởng không phải người kết hợp với cyclosporin với liều dưới liều điều trị. Ngoài ra, mAb1 có thể ức chế hoàn toàn đáp ứng kháng thể nguyên phát và thứ phát với việc gây miễn dịch bằng kháng nguyên phụ thuộc tế bào T. Quan trọng là, không có bằng chứng về các tác dụng cầm máu hoặc mô học về tụy bất thường trong nghiên cứu cấy ghép hoặc tạo miễn dịch. Nói chung, các kết quả này gợi ý rằng mAb1 là an toàn và có hiệu quả điều trị, và có thể được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh tự miễn do tế bào lympho B và tế bào trình diện kháng nguyên gây ra hoặc bị cấy ghép mảnh ghép cùng loại ở đó tương tác CD40-CD154 có liên quan đến việc gây ra bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập trực tiếp chống lại polypeptit CD40 đích (SEQ ID NO:28), khác biệt ở chỗ kháng thể này có trình tự axit amin chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 11 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:12.
2. Kháng thể phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này ức chế sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi CD40L với trị số IC50 bằng 50ng/ml hoặc nhỏ hơn.
3. Kháng thể phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này không có hoặc có hoạt tính chủ vận thấp đối với sự truyền tín hiệu CD40.
4. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kết hợp với ít nhất một tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.
5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó dược phẩm này còn chứa thêm các hoạt chất khác.
6. Dược phẩm dạng lỏng chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 với ít nhất một dung dịch đệm.
7. Axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.
8. Vector tách dòng hoặc biểu hiện chứa một hoặc nhiều axit nucleic theo điểm 7.
9. Vector tách dòng hoặc biểu hiện theo điểm 8 chứa các trình tự mã hóa SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO:23, được liên kết động với các trình tự khởi đầu thích hợp.
10. Tế bào chủ chứa một hoặc nhiều vector tách dòng hoặc biểu hiện theo điểm 8 hoặc 9.
11. Quy trình sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 10, tinh chế và thu hồi kháng thể này.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novartis AG

<120> Kháng thể phân lập trực tiếp chống lại polypeptit CD40 và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> PAT54423

<150> US 61/413567

<151> 2010-11-15

<160> 28

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 5

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 6

Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 7

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 10
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 10

```

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20           25           30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35           40           45

Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50           55           60

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

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

Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
100          105          110

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

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

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

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

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

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

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

```

```

<210> 11
<211> 450
<212> PRT
<213> Người hiện đại

```

```

<400> 11

```

```

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

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

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

```

Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	His	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Ile	Thr	Leu	Tyr	65	70	75
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	210	215	220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	325	330	335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 12

<211> 219

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 12

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 13

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 14
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 14

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 15
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 15

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 16
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 16

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20           25           30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35           40           45
Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85           90           95
Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115          120          125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130          135          140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165          170          175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180          185          190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215

```

<210> 17
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 17

```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1           5           10           15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20           25           30

```

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 18
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 18

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

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 19
<211> 217
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 19

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210>	20
<211>	1956
<212>	ADN
<213>	Người hiện đại

<400>	20						
caggtgcagt	tgggtggagtc	tggggggaggc	gtgggtccagc	ctggggaggtc	cctgagactc		60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgcactgggt	ccgccaggct		120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	aggaaagtaa	tagataccat		180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagat	cacgctgtat		240
ctgcaaata	acagcctcag	aactgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatggg		300
ggtatagcag	cacctgggcc	tgactactgg	ggccagggaa	ccctggtcac	cgtctcctca		360
gcaagtacca	agggcccatc	cgtcttcccc	ctggcgcccg	ctagcaagag	cacctctggg		420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg		480
tggaaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca		540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc		600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgggtgag		660
aggccagcac	agggagggag	ggtgtctgct	ggaagccagg	ctcagcgctc	ctgcctggac		720
gcaccccggc	tatgcagtcc	cagtccaggg	cagcaaggca	ggccccgtct	gcctcttcac		780
ccggaggcct	ctgcccggcc	cactcatgct	cagggagagg	gtcttctggc	tttttcccca		840
ggctctgggc	aggcacaggc	taggtgcccc	taaccaggc	cctgcacaca	aaggggcagg		900
tgctgggctc	agacctgcca	agagccatat	ccgggaggac	cctgcccctg	acctaaagccc		960
accccaaagg	ccaaactctc	cactccctca	gctcggacac	cttctctcct	cccagattcc		1020
agtaactccc	aatcttctct	ctgcagagcc	caaatcttgt	gacaaaactc	acacatgccc		1080
accgtgccc	ggtaagccag	cccaggcctc	gccctccagc	tcaaggcggg	acaggtgccc		1140
tagagtagcc	tgcatccagg	gacaggcccc	agccgggtgc	tgacacgtcc	acctccatct		1200
cttcctcagc	acctgaactc	ctgggggggac	cgtcagtcct	cctcttcccc	ccaaaaccca		1260

aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc 1320
 acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc 1380
 agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg 1440
 tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc 1500
 tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgagag 1560
 ggccacatgg acagaggcgg gctcggccca cctctgccc tgagagtgc cgtgtacca 1620
 acctctgtcc ctacagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1680
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1740
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1800
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctatagca agctcacctg ggacaagagc 1860
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1920
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1956

<210> 21
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 21
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgaccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtccagtca gagcctcctg tatagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag gtctgatct ctttgggttc taatogggcc 180
 tccgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctcg acaaactcca 300
 ttactttcg gccctgggac caaagtggat atcagacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgagaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 22
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 22
 caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggccggtc cctgagactg 60

tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agctacggca tgcactgggt ggcacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccgtg atctcctacg aggaatccaa cagataccac 180
 gctgactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgggaca actccaagat caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg gaccgaggac accgcctgtg actactgcgc cagggacgga 300
 ggaatcgccg ctcttggaac tgattattgg ggccagggca ccctgggtgac agtgtcctcc 360
 gctagcacca agggcccctc cgtgttccct ctggccccct ccagcaagtc cacctctggc 420
 ggcaccgccg ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcccg gaccgtgtcc 480
 tggaactctg gcgcctgac ctccggcgtg cacaccttcc cagccgtgct gcagtcctcc 540
 ggctgtact ccctgtcctc cgtggtgacc gtgccctcta gctctctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaaccc 660
 aagtctgcg acaagacca cacctgtccc cctgcccctg cccctgaact gctgggcgga 720
 ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 780
 gaagtacct gcgtgggtgg ggacgtgtcc cacgaggacc ctgaagtga gttcaattgg 840
 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacgcc 900
 tccacctacc ggggtggtgtc tgtgtgaccc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatctcc 1020
 aaggccaagg gccagccccg cgagccacag gtgtacacac tgccccccag ccgggaagag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtcaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
 gccgtggagt gggagtccaa cggacagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
 ctggactccg acggctcatt ctctctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg 1260
 cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagtccc tgtccctgag ccccggaag 1350

<210> 23
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 23
 gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgaccgtga cacctggcga gcctgcctct 60
 atctcctgca gatcctccca gtccctgctg tactccaacg gctacaacta cctggactgg 120
 tatctgcaga agcccggcca gtccccacag gtgctgatct ccctgggctc caacagagcc 180
 tctggcgtgc ccgaccggtt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac actgaagatc 240
 tcacgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcaggcccc gcagaccccc 300

ttcaccttcg gccctggcac caaggtggac atccggcgta cgggtggcgc tcccagcgtg 360
 ttcatcttcc cccccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420
 ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcacccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtgta cgcctgcgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 24

<211> 1350

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 24

caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggccggtc cctgagactg 60
 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agctacggca tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccgtg atctcctacg aggaatccaa cagataccac 180
 gctgactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgggaca actccaagat caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg gaccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacgga 300
 ggaatcgccg ctcttgacc tgattattgg ggccaggga ccctggtgac agtgtcctcc 360
 gctagcacca agggccctc cgtgttccct ctggccccct ccagcaagtc cacctctggc 420
 ggcaccgccc ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaactctg gcgccctgac ctccggcgtg cacaccttcc cagccgtgct gcagtctcc 540
 ggctgtact ccctgtctc cgtggtgacc gtgccctcta gctctctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaaccc 660
 aagtctgcg acaagaccca cacctgtccc ccctgccctg ccctgaact gctgggcgga 720
 ccttccgtgt tctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 780
 gaagtgacct gcgtggtggt ggccgtgtcc cagcaggacc ctgaagtga gttcaattgg 840
 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac 900
 tccacctacc ggggtggtgtc tgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatctcc 1020
 aaggccaagg gccagccccg cgagccacag gtgtacacac tgccccccag ccgggaagag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctgggtcaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
 gccgtggagt gggagtccaa cggacagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
 ctggactccg acggctcatt ctctctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgtgtg 1260

cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320

cagaagtccc tgtccctgag ccccggaag 1350

<210> 25

<211> 657

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 25

gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgacgtga cacctggcga gcctgcctct 60

atctcctgca gatcctccca gtccctgctg tactccaacg gctacaacta cctggactgg 120

tatctgcaga agcccgcca gtccccacag gtgctgatct ccctgggctc caacagagcc 180

tctggcgtgc ccgaccggtt ctccggtctt ggctctggca ccgacttcac actgaagatc 240

tcacgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcaggcccg gcagaccccc 300

ttcaccttcg gccctggcac caaggtggac atccggcgta cgggtggccgc tcccagcgtg 360

ttcatcttcc cccccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420

ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480

agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540

agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtgta cgccctgcgag 600

gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 26

<211> 1350

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 26

caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggccggtc cctgagactg 60

tcttgccg ccctccggtt caccttctcc agctacggca tgcactgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtggccgtg atctcctacg aggaatccaa cagataccac 180

gctgactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgggaca actccaagat caccctgtac 240

ctgcagatga actccctgcg gaccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacgga 300

ggaatcgccg ctccctggacc tgattattgg ggccaggga ccctggtgac agtgtcctcc 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcct ctggcccctt ccagcaagtc tacctccggc 420

ggcacagctg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc 480

tggaaactctg gcgccctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtccctc 540

ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtcaca gtgccttcaa gcagcctggg caccagacc 600

tatatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct 660
aagtctcgcg acaagaccca cacctgtcct ccttgccctg ctctgaagc tgcctggcggc 720
ccttctgtgt tcctgttccc tccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct 780
gaagtgacct gcgtgggtgg ggacgtgtcc caagaggatc ctgaagtga gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctggggagga acagtacaac 900
tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gagtacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgcctgccc ctatcgaaaa gacaatctcc 1020
aaggccaagg gccagcctag ggaaccccag gtgtacaccc tgccacccag ccgggaggaa 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctgggtcaagg gcttctaccc ttccgatatc 1140
gccgtggagt gggagtctaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cctcctgtg 1200
ctggactccg acggctcctt ctctctgtac tccaaactga ccgtggacaa gtcccgggtg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgtc tcccggcaag 1350

<210> 27
<211> 657
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 27
gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgaccgtga cacctggcga gcctgcctct 60
atctcctgca gatcctccca gtccctgctg tactccaacg gctacaacta cctggactgg 120
tatctgcaga agcccggcca gtccccacag gtgctgatct ccctgggctc caacagagcc 180
tctggcgtgc ccgaccggtt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac actgaagatc 240
tcacgggtgg aagccgagga cgtgggctg tactactgca tgcaggcccc gcagaccccc 300
ttcaccttcg gccctggcac caaggtggac atccggcgta cgggtggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420
ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtggg aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtgta cgctgcgag 600
gtgaccaccc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 28
<211> 277
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 28

```

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1          5          10          15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20          25          30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35          40          45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50          55          60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65          70          75          80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85          90          95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100         105         110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115         120         125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130         135         140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145         150         155         160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165         170         175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180         185         190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195         200         205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210         215         220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225         230         235         240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245         250         255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260         265         270

Val Gln Glu Arg Gln
275

```

Fig.1

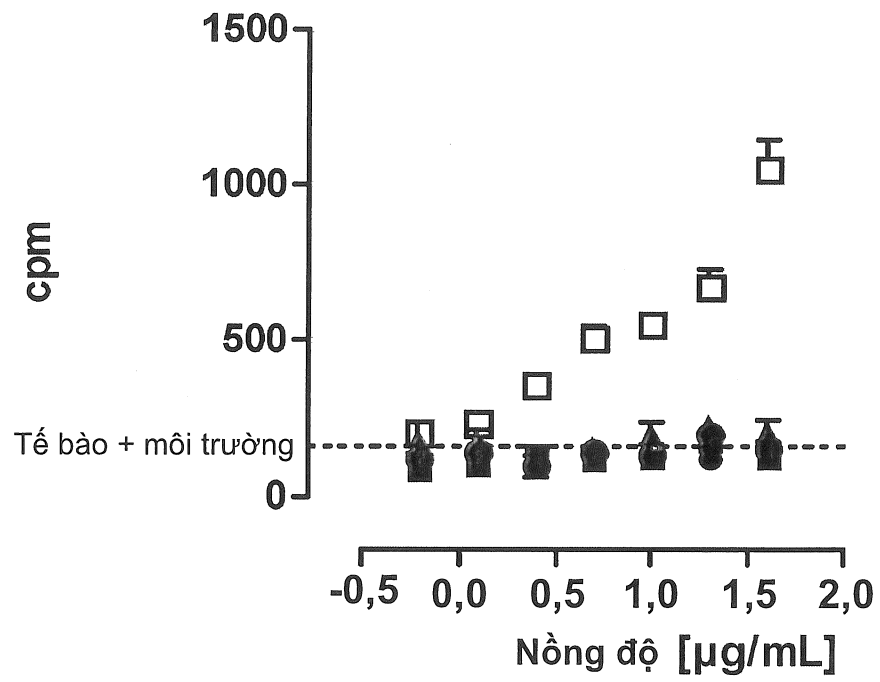


Fig.2

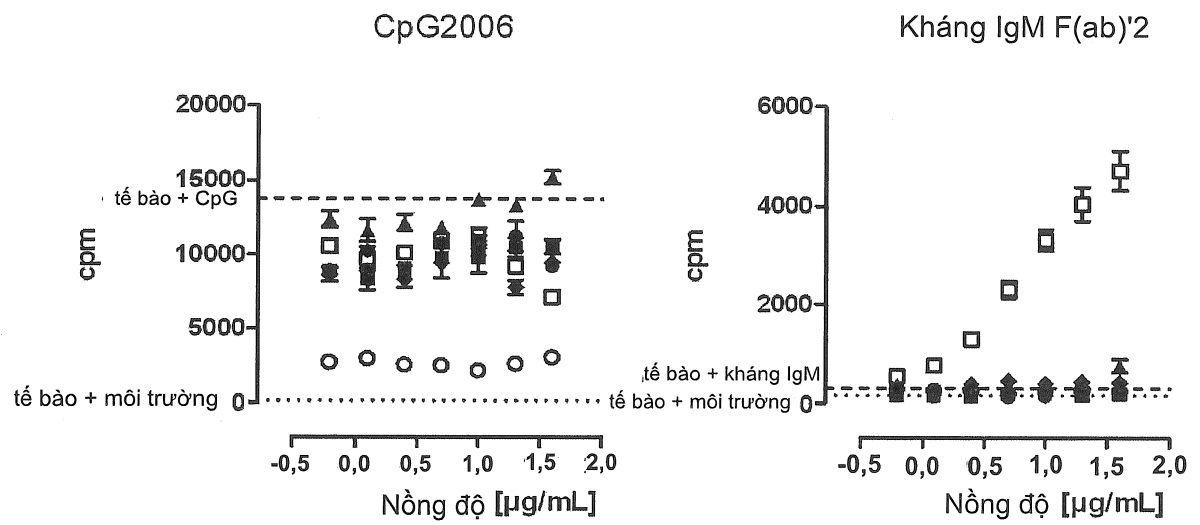


Fig.3

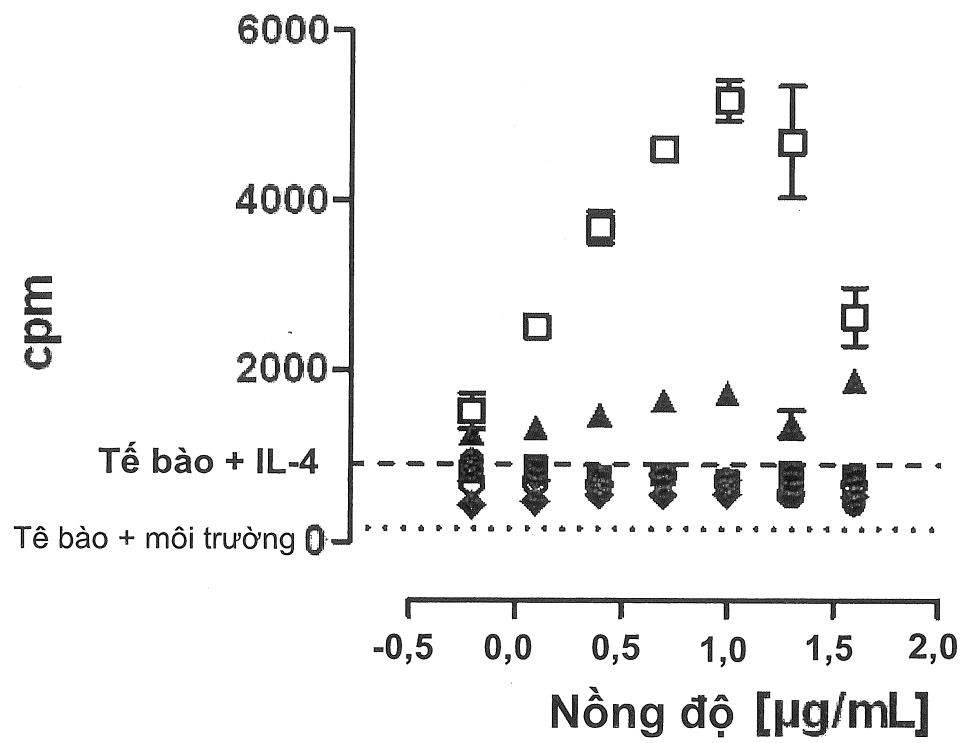


Fig.4

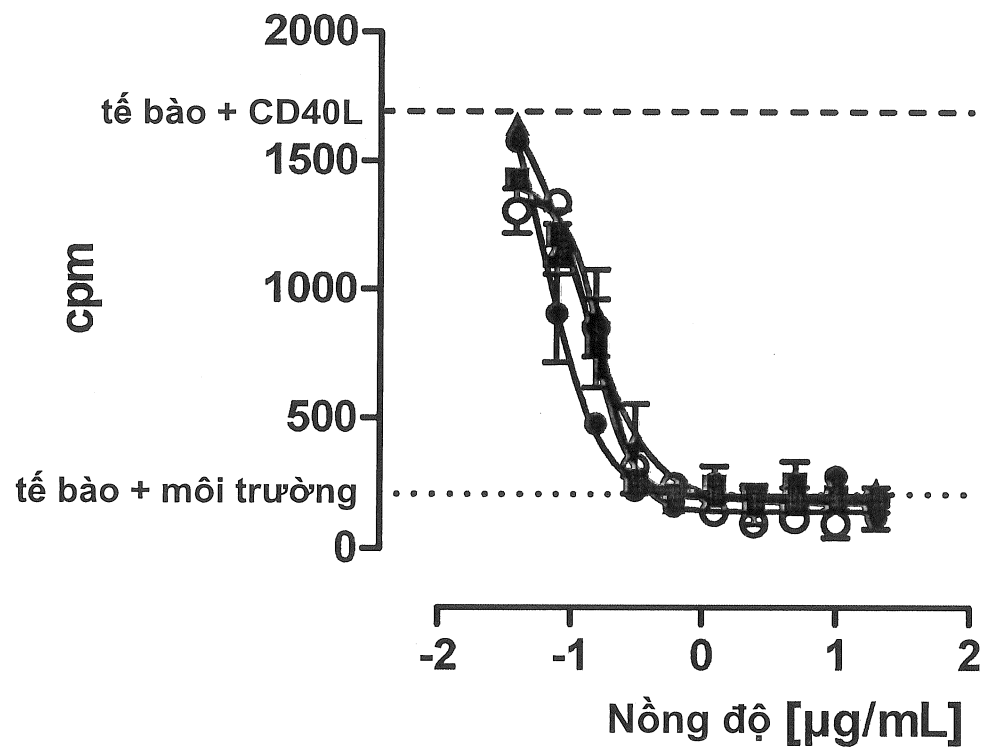


Fig.5

