(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) **1-0031826**

(51)[7] **C07K 16/28**; C12N 15/13; A61K 39/00; A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2017-05280
(22) 27/05/2016
(86) PCT/US2016/034716 27/05/2016
(87) WO2016/196314 08/12/2016
(30) 62/168,425 29/05/2015 US
(45) 25/05/2022 410
(43) 26/02/2018 359A
(73) ABBVIE INC. (US)
1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, United States of America
(72) BENATUIL, Lorenzo (US); ARGIRIADI, Maria, A. (US); MCRAE, Bradford, L. (US); HSIEH, Chung-Ming (US); David A. Egan (US); John E. Harlan (US); Rusell A. Judge (US); Rui Wang (US); Gillian A. Kingbury (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD40 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD40 đối kháng và phần kháng nguyên liên kết chúng. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 được làm cho giống như của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế làm trung hòa hoạt tính CD40 ở người (hCD40). Kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế là hữu ích để phát hiện CD40 và để ức chế hoạt tính CD40, ví dụ, ở đối tượng là người mắc rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 và phần liên kết kháng nguyên của chúng; axit nucleic được phân lập mã hóa cho trình tự axit amin kháng thể kháng CD40 đối kháng; vật truyền có chứa axit nucleic được phân lập này; tế bào chủ chứa vật truyền này; phương pháp sản xuất kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng; phương pháp *in vitro* làm giảm hoạt tính CD40 ở người; và phương pháp xác định sự có mặt của CD40 hoặc mảnh của chúng trong mẫu thử nghiệm bằng thử nghiệm miễn dịch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể CD40 (CD40), và phần liên kết kháng nguyên của chúng, và sử dụng chúng trong việc ngăn ngừa và/hoặc điều trị các bệnh khác nhau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD40 là thành viên họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u (TNF) đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển tế bào B, sự hoạt hóa tế bào lympho, và chức năng tế bào trình diện kháng nguyên (APC). Sự biểu hiện CD40 trên biểu mô, bạch cầu, và nội mô mạch tăng lên trong các bệnh tự miễn đặc hiệu cơ quan cũng như là tính tự miễn hệ thống như luput ban đỏ hệ thống (SLE). Sự phá vỡ con đường truyền tín hiệu CD40L/CD40 làm giảm sự sản xuất các xytokin tiền viêm như IL-23 và TNF, làm giảm sự biệt hóa và chức năng tế bào T trợ giúp, và ức chế sự hoạt hóa đại thực bào ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm mạn tính như bệnh Crohn. Sự tương tác của CD40 với CD40L kích thích cả đáp ứng miễn dịch thể dịch và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. CD40 điều hòa cặp phối tử-thụ thể này để hoạt hóa tế bào B và các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) khác bao gồm tế bào phân nhánh (DC).

CD40 là protein xuyên màng loại I có khối lượng phân tử 48 kDa (van Kooten, J Leukoc Biol. 2000 Jan;67(1):2-17) được biểu hiện trên nhiều loại tế bào tạo máu (tế bào lympho, tế bào bạch cầu đơn nhân, tế bào phân nhánh) và loại tế bào không tạo máu (biểu mô, nội mô, nguyên bào sợi). CD40L được biểu hiện chủ yếu trên tế bào T, tế bào B, và tiểu cầu đã được hoạt hóa. Phần lớn hiểu biết về sinh học CD40/CD40L đến từ sự tương tác giữa APC (sự biểu hiện CD40 trên tế bào phân nhánh (DC) hoặc tế bào B) và tế bào T biểu hiện CD40L. Trên tế bào B không hoạt động, sự ăn khớp CD40L dẫn đến sự hoạt hóa tế bào B, sự tăng sinh, và sự phát triển tế bào B ghi nhớ (Kehry, Immunol. 1996 Apr 1;156(7):2345-8). Sự truyền tín hiệu CD40 cũng được yêu cầu cho sự chuyển đổi lớp globulin miễn dịch và sự tạo thành trung tâm mầm. Tầm quan trọng của con đường truyền tín hiệu CD40/CD40L trong sinh học tế bào B có bằng chứng ở chuột thiếu hụt CD40 hoặc CD40L mà không có các trung tâm mầm và đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T bị kìm chế. Tuy nhiên, đáp ứng IgG không phụ thuộc tế bào T vẫn còn nguyên vẹn ở chuột CD40-/- gợi ý rằng đó là sự tương tác tế bào- tế bào mà bị thiếu

ở các con chuột này. Chuột thiếu hụt CD40 cũng thiếu khoang tế bào T. Sự truyền tín hiệu thông qua CD40 trên tế bào phân nhánh làm điều hòa tăng MHC lớp II cũng như là nhiều phân tử đồng kích thích khác nhau chẳng hạn như CD80 và CD86 và thúc đẩy sự trưởng thành của DC. DC trưởng thành kích thích sự hoạt hóa và sống sót của tế bào T CD4+ thông qua sự sản xuất xytokin chẳng hạn như IL-2 và IL-12. Việc mồi tế bào T không hiệu quả dường như là nguyên nhân chính của các đáp ứng thể dịch phụ thuộc tế bào T thỏa hiệp ở chuột CD40L-/- (Grewal, Nature. 1995 Dec 7;378(6557):617-20). Kiểu hình tế bào B tương tự có thể được quan sát thấy ở người mắc hội chứng tăng IgM liên kết với nhiễm sắc thể X. Các bệnh nhân này bị thiếu hụt miễn dịch sơ cấp do các đột biến trong locut CD40L mà phá hủy sự truyền tín hiệu CD40/CD40L. Các cá thể này có hàm lượng IgM tăng và không thể sản xuất IgA, IgG, và IgE dẫn đến có nguy cơ mắc các bệnh nhiễm khuẩn cơ hội tăng (Adriana, J Clin Immunol. 2008 May;28 Suppl 1:S62-6).

Con đường truyền tín hiệu CD40 là trung tâm đối với sự chuyển hóa của các tế bào lympho và APC không hoạt động hoặc nguyên bản thành kiểu hình được hoạt hóa/trưởng thành. Mặc dù sự mồi tế bào T và sự hoạt hóa tế bào B có thể xảy ra khi không có sự truyền tín hiệu CD40/CD40L, con đường này là cần thiết để tạo ra đáp ứng miễn dịch thích ứng mạnh mẽ. Sự ăn khớp CD40 bởi CD40L dẫn đến sự tuyển mộ của các yếu tố kết hợp thụ thể TNF (TRAF) đến miền tế bào chất của CD40 (Bishop, Adv Exp Med Biol. 2007;597:131-51). Sự phosphoryl hóa của các protein TRAF khác nhau dẫn đến sự hoạt hóa cả con đường NFkB chính tắc và không chính tắc. Ngoài ra, sự kết hợp của JAK3 với đuôi tế bào chất CD40 dẫn đến sự hoạt hóa STAT5 mà kích thích sự trưởng thành của DC cũng như là sự sản xuất TNF và IFNγ. Sự hoạt hóa PI3K phụ thuộc TRAF6 là tín hiệu sống sót thiết yếu ở DC trong khi TRAF2/TRAF6 có chức năng dự phòng trong sự hoạt hóa NFkB và sự điều hòa tăngcủa sự biển hiện CD80 (Hostager, J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45382-90). Tất cả các TRAF 2, 3, 5, và 6 đều cho thấy là đóng vai trò quan trọng trong sự chuyển đổi lớp globulin miễn dịch qua trung gian sự truyền tín hiệu CD40 (Leo, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16; 96(4): 1421-1426).

Con đường truyền tín hiệu CD40/CD40L được ngụ ý trong sự phát sinh bệnh của nhiều bệnh tự miễn bao gồm luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm ruột (IBD), đa xơ

cứng, viêm khớp dạng thấp, và hội chứng Sjogren (Law and Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009;647:8-36). Sự biểu hiện CD40 tăng trên đại thực bào, nội mô, biểu mô, và tế bào B trong mô bị tổn thương bởi sự tự miễn mạn tính bao gồm thận, ruột, và khớp (Borcherding, Am J Pathol. 2010 Apr;176(4):1816-27, ; Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. 2000 Jun;95(6):1516-23). CD40L hòa tan được tăng lên ở bệnh nhân mắc bệnh SLE, IBD, và hội chứng Sjogren cùng với gánh nặng viêm ở các bệnh nhân này.

Một số bằng chứng sớm nhất về con đường CD40/CD40L trong viêm ruột mạn tính đến từ các mô hình tiền lâm sàng trong đó các mAb kháng CD40L bảo vệ động vật gặm nhấm không bị viêm ruột kết thử nghiệm (de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23; Liu, J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):6005-14; Stuber, J Exp Med 1996 Feb 1, 183(2):693-8). Sự giảm điểm số hoạt tính bệnh có liên quan đến sự sản xuất xytokin tiền viêm ở ruột giảm đi và sự bảo vệ khỏi sự giảm thể trọng mạn tính. Các kết quả tương tự được quan sát thấy ở các động vật thiếu hụt về mặt di truyền đối với CD40 hoặc CD40L (de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23). Việc điều trị cho chuột bằng các mAb kháng CD40L sau khi khởi phát bệnh vẫn hữu hiệu để trong việc làm giảm hoạt tính bệnh gợi ý rằng con đường này là thiết yếu để duy trì bệnh viêm mạn tính. Ngoài ra, kháng thể chủ vận CD40 là đủ để điều khiển tình trạng viêm ruột ở chuột thiếu tế bào lympho (Uhlig, Immunity. 2006 Aug;25(2):309-18). Dữ liệu gần đây hơn sử dụng siARN CD40 cũng chỉ ra vai trò quan trọng đối với sự truyền tín hiệu CD40 trong bệnh viêm ruột kết (Arranz, J Control Release. 2013 Feb 10;165(3):163-72). Ở bệnh Crohn, bạch cầu đơn nhân màng mô liên kết và biểu mô biểu hiện mức cao của bạch cầu đơn nhân CD40 và CD40+ được làm giàu trong máu ngoại vi. Ngoài ra, hiện tượng đa hình ở locut *CD40* có liên quan đến tính nhạy tăng với IBD. Ở các bệnh nhân mắc bệnh Crohn được điều trị bằng kháng thể kháng TNF, biên dạng phiên mã cho thấy rằng hàm lượng mARN CD40 giảm ở bệnh nhân có đáp ứng điều trị bằng thuốc đầy đủ. Tuy nhiên, ở bệnh nhân đáp ứng kém đối với chất ức chế TNF, hàm lượng mARN CD40 không thay đổi gợi ý rằng các con đường phụ thuộc CD40, không phụ thuộc TNF có thể thúc đẩy viêm ở các bệnh nhân này. Các nghiên cứu này gợi ý rằng sự ức chế truyền tín hiệu qua trung gian CD40 là quan trọng trong sự phát sinh bệnh IBD cũng như là các bệnh tự miễn khác. Do đó, vẫn cần có kháng thể kháng CD40 đối kháng, và phần liên

kết kháng nguyên của chúng, mà có thể được sử dụng nhằm mục đích trị liệu để điều trị các bệnh và rối loạn viêm mạn tính, như bệnh Crohn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể được làm cho giống như của người đối kháng, và phần liên kết kháng thể của chúng, mà có khả năng liên kết với CD40 ở người và về cơ bản không có hoạt tính chủ vận.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết với epitop của CD40 ở người được xác định bởi vùng định hình Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99, và Thr24-Cys37 của SEQ ID NO:1. Theo một phương án, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là kháng thể đối kháng. Theo một phương án, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là kháng thể đối kháng mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR3 có trình tự trình tự axit amin SEQ ID NO: 12. Theo phương án khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 111 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11. Theo phương án khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 42 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11. Theo phương án khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 21.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là lớp IgG. Theo phương án có liên quan khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là lớp IgG1 hoặc IgG4.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có IC50 bằng ít nhất là 50 nM trong thử nghiệm báo cáo tế bào Jurkat.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 12 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, còn chứa CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 42. Theo phương án khác, trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, còn chứa CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11. Theo phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, còn chứa CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:6. Theo phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết của chúng, còn chứa CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 21.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR nêu trong SEQ ID NO: 6, 42, và 8, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa bộ CDR nêu trong SEQ ID NO: 21, 11, và 12.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, được làm cho giống như của người. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng còn chứa khung chất nhận ở người. Theo phương án có liên quan khác, khung chất nhận ở người có chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 82-106. Theo phương án khác, khung chất nhận ở người có chứa ít nhất một sự thế axit amin vùng khung, trong đó trình tự axit amin của khung này có độ đồng nhất ít nhất là 65% so với trình tự của khung chất nhận ở người và có chứa ít nhất 70 gốc axit amin giống với khung chất nhận ở người. Theo

phương án khác, khung chất nhận ở người có chứa ít nhất là một sự thế axit amin vùng khung ở gốc then chốt, gốc then chốt này được chọn từ:

gốc liền kề với CDR;

gốc ở vị trí glycosyl hóa;

gốc hiếm;

gốc có khả năng tương tác với CD40 ở người;

gốc có khả năng tương tác với CDR;

gốc chính tắc;

gốc tiếp xúc giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ;

gốc trong khu vực Vernier; và

gốc trong vùng gối lên nhau giữa CDR1 chuỗi nặng biến đổi được xác định theo Clothia và khung chuỗi nặng thứ nhất được xác định theo Kabat.

Theo phương án có liên quan khác, gốc then chốt được chọn từ 48H, 49H, và 36L. Theo một phương án, sự thế gốc then chốt là trong vùng chuỗi nặng biến đổi và là V48I hoặc S49A. Theo phương án khác, sự thế gốc then chốt là trong vùng chuỗi nhẹ biến đổi và là Y36F.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 28. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, về cơ bản không có hoạt tính chủ vận. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, ức chế sự kiên kết của CD40 với phối tử CD40 (CD40L) hoặc với phối tử CD40 hòa tan (sCD40L). Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết với CD40 của cyno. Theo một phương án, kháng thể kháng

CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết với CD40 ở người và ở cyno, nhưng không liên kết với CD40 của chuột, thỏ, hoặc chuột nhắt.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có khả năng điều biến chức năng sinh học của CD40. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có khả năng trung hòa CD40. Theo phương án khác nữa, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, ức chế sự hoạt hóa NF-κB.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có hằng số tốc độ liên kết (K_{on}) đối với CD40 được chọn từ ít nhất là khoảng $10^2 M^{-1}giây^{-1}$; ít nhất là khoảng $10^3 M^{-1}giây^{-1}$; ít nhất là khoảng $10^4 M^{-1}giây^{-1}$; ít nhất là khoảng $10^5 M^{-1}giây^{-1}$; và ít nhất là khoảng $10^6 M^{-1}giây^{-1}$; như đo được bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có hằng số phân ly (K_D) đối với CD40 được chọn từ nhóm gồm có: cao nhất là khoảng 10^{-7} M; cao nhất là khoảng 10^{-8} M; cao nhất là khoảng 10^{-9} M; cao nhất là khoảng 10^{-10} M; cao nhất là khoảng 10^{-11} M; cao nhất là khoảng 10^{-12} M; và cao nhất 10^{-13} M.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa miền không đổi globulin miễn dịch chuỗi nặng của miền không đổi IgM ở người, miền không đổi IgG1 ở người, miền không đổi IgG2 ở người, miền không đổi IgG3 ở người, miền không đổi IgG4 ở người, miền không đổi IgA ở người, hoặc miền không đổi IgE ở người. Theo phương án liên quan, miền vùng không đổi globulin miễn dịch chuỗi nặng của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là miền không đổi IgG1 ở người. Theo phương án có liên quan khác, miền không đổi IgG1 ở người của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, còn chứa miền không đổi globulin miễn dịch chuỗi nhẹ, có

chứa miền không đổi kappa Ig ở người hoặc miền không đổi lambda Ig ở người. Theo phương án liên quan, miền không đổi kappa Ig ở người của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:4 hoặc trong đó miền không đổi lambda Ig ở người có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:81.

Theo các phương án nhất định, sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà cạnh tranh với kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, như nêu trong khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:6, CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:42, CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:8, CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:21, CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:11, và CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:12.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 28 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 28, và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 20.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 41, hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 41, và/hoặc chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 40, hoặc trình tự có độ tương đồng ít nhất 90%, 95%, 96%,

97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 40. Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 41, chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 40.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40, có chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 40.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế là tái tổ hợp.

Theo các phương án nhất định, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm có chứa kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, như nêu trong khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, và chất mang dược dụng.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm có chứa kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, như nêu trong khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, và polysorbat. Theo phương án có liên quan khác, polysorbat là polysorbat 80.

Theo phương án khác, dược phẩm có chứa chất đệm histiđin.

Theo phương án khác, dược phẩm có chứa rượu đa chức. Theo phương án liên quan, rượu đa chức được chọn từ manitol, sorbitol, trehaloza, hoặc sucroza.

Theo phương án khác, dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 4 đến khoảng 8. Theo phương án liên quan, dược phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến khoảng 7.

Theo phương án khác, dược phẩm được làm đông khô.

Theo các phương án khác, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa trình tự axit amin kháng thể kháng CD40 đối kháng theo khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến vật truyền có chứa axit nucleic được phân lập. Theo phương án liên quan, vật truyền được chọn từ vật truyền pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, và pBJ.

Theo phương án khác, tế bào chủ có chứa vật truyền. Theo phương án liên quan, tế bào chủ là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn. Theo phương án khác, tế bào nhân chuẩn là tế bào sinh vật đơn bào, tế bào động vật, tế bào thực vật, tế bào nấm, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào chim, hoặc tế bào côn trùng. Theo phương án khác, tế bào động vật có vú là tế bào CHO hoặc tế bào COS.

Theo các phương án nhất định, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, phương pháp này bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ theo khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này trong môi trường nuôi cấy trong điều kiện đủ để sản xuất kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo các phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm giảm hoạt tính CD40 ở người, phương pháp này bao gồm bước cho CD40 ở người tiếp xúc với kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, sao cho hoạt tính CD40 ở người được làm giảm. Theo phương án khác, phương pháp này là phương pháp *in vitro*.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị đối tượng là người có rối loạn trong đó CD40 là có hại bao gồm bước cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm giảm hoạt tính CD40 ở người ở đối tượng là người có rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng là người này dùng kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, sao cho hoạt tính CD40 ở đối tượng là người này được làm giảm.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, được dùng trước, đồng thời, hoặc sau khi dùng tác nhân thứ hai cho đối tượng. Theo phương án liên quan khác, tác nhân thứ hai được chọn từ kháng thể, hoặc mảnh của chúng, có khả năng liên kết với IL-12; PGE2; LPA; NGF; CGRP; SubP; RAGE;

histamin ở người; chất phong bế thụ thể histamin; brađykinin; IL-1 alpha; IL-1beta; VEGF; PLGF; methotrexat; corticosteroit, tác nhân điều biến thụ thể glucocorticoit; xyclosporin, rapamyxin, FK506, tác nhân kháng viêm không steroit, steroit dùng để xông; chất chủ vận beta; chất chủ vận beta tác động ngắn hoặc tác động dài; chất đối kháng của leukotrien hoặc thụ thể leukotrien; ADVAIR; chất ức chế IgE; kháng thể kháng IgE; XOLAIR; chất ức chế phosphođiesteraza; chất ức chế PDE4; xanthin; thuốc chống gây tiết cholin; tác nhân ổn định tế bào mast; Cromolyn; chất ức chế IL-4; chất ức chế IL-5; chất ức chế eotaxin/CCR3, chất đối kháng của histamin hoặc thụ thể của nó bao gồm H1, H2, H3, và H4; chất đối kháng của prostaglađin D hoặc thụ thể DP1 và CRTH2 của nó; chất đối kháng TNF; mảnh hòa tan của thụ thể TNF; ENBREL; chất đối kháng enzym TNF; chất ức chế enzym chuyển hóa TNF (TACE); chất đối kháng thụ thể muscarinic; chất đối kháng TGF-beta; interferon gamma; perfeniđon; tác nhân hóa trị liệu, methotrexat; leflunomit; sirolimus (rapamyxin) hoặc chất tương tự chúng, CCI-779; chất ức chế COX2 hoặc cPLA2; NSAID; tác nhân điều biến miễn dịch; chất ức chế p38; chất ức chế TPL-2, MK-2 và NFkB; buđenosit; yếu tố sinh trưởng biểu bì; corticosteroit; xyclosporin; sulfasalazin; aminosalixylat; 6-mercaptopurin; azathioprin; metroniđazol; chất ức chế lipoxygenaza; mesalamin; olsalazin; balsalazit; chất chống oxy hóa; chất ức chế thromboxan; chất đối kháng thụ thể IL-1; kháng thể kháng IL-1β; kháng thể kháng-IL-6; yếu tố sinh trưởng; chất ức chế elastaza; hợp chất pyriđinyl-imiđazol; kháng thể hoặc chất chủ vận của LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF, hoặc PDGF; kháng thể của CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 hoặc phối tử của chúng; FK506; rapamyxin; mycophenolat mofetil; ibuprofen; prednisolon; chất ức chế phosphođiesteraza; chất chủ vận ađensosin; tác nhân chống huyết khối; chất ức chế bổ thể; tác nhân gây tiết ađrenalin; chất ức chế IRAK, NIK, IKK, p38, hoặc MAP kinaza; chất ức chế enzym chuyển hóa IL-1β; chất ức chế enzym chuyển hóa TNF-α.quadrature.; chất ức chế sự truyền tín hiệu tế bào T; chất ức chế metaloproteinaza; 6-mercaptopurin; chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin; thụ thể xytokin hòa tan; thụ thể p55 TNF hòa tan; thụ thể p75 TNF hòa tan; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; xytokin kháng viêm; IL-4; IL-10; IL-11; hoặc TGF-β.

Theo phương án khác, rối loạn được chọn từ rối loạn hô hấp; hen; hen dị ứng và không dị ứng; hen do nhiễm trùng; hen do nhiễm virut hợp bào hô hấp (RSV); bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD); tình trạng bệnh lý liên quan đến viêm đường thở; chứng tăng bạch cầu ái toan; xơ hóa và sản xuất chất nhầy dư thừa; xơ nang; xơ phổi; rối loạn do dị ứng; viêm da dị ứng; mày đay; eczema; viêm mũi dị ứng; viêm dạ dày-ruột non dị ứng; tình trạng viêm và/hoặc tự miễn của da; tình trạng viêm và/hoặc tự miễn của các cơ quan dạ dày-ruột; bệnh viêm ruột (IBD); viêm loét đại tràng; bệnh Crohn; tình trạng viêm và/hoặc tự miễn của gan; xơ hóa gan; xơ gan; xơ gan do virut viêm gan B và/hoặc C; xơ cứng bì; khối u hoặc ung thư; ung thư biểu mô tế bào gan; u nguyên bào đệm; u lympho; u lympho Hodgkin; nhiễm virut; nhiễm vi khuẩn; nhiễm ký sinh trùng; nhiễm HTLV-1; kìm hãm sự biểu hiện của đáp ứng miễn dịch kiểu 1 bảo vệ, và kìm hãm sự biểu hiện của đáp ứng miễn dịch kiểu 1 trong quá trình dùng vắc xin.

Theo một phương án khác nữa, rối loạn được chọn từ bệnh tự miễn hoặc viêm, chẳng hạn như luput ban đỏ hệ thống (SLE), luput dạng đĩa, viêm thận do luput, bệnh u hạt (sarcoidosis), viêm khớp do viêm, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viêm khớp thiếu niên, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vảy nến, hội chứng Reiter, viêm cột sống dính khớp, viêm khớp do bệnh gút, sự thải bỏ mảnh ghép cơ quan hoặc mô, sự thải bỏ siêu cấp tính, cấp tính hoặc mãn tính và/hoặc bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, đa xơ cứng, hội chứng tăng IgE, viêm đa động mạch nốt, xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh celiac (viêm ruột nhạy cảm với gluten), viêm gan tự miễn, thiếu máu tăng sắc nghiêm trọng, thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh vẩy nến, xơ cứng bì, nhược cơ, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn, viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh Grave, viêm tuyến giáp Hasimoto, bệnh phức hợp miễn dịch, hội chứng rối loạn chức năng miễn dịch mệt mỏi mãn tính (CFIDS), viêm đa cơ và viêm da cơ, chứng cryoglobulin huyết, sự tan huyết khối, bệnh cơ tim, bệnh pemphigus thể thông thường, xơ hóa mô kẽ phổi, bệnh u hạt (sarcoidosis), bệnh tiểu đường Typ I và Typ II, quá mẫn kiểu trì hoãn typ 1, 2, 3, và 4, dị ứng hoặc rối loạn dị ứng, đáp ứng miễn dịch không mong muốn/không chủ định đối với các protein điều trị, bệnh hen, hội chứng Churg-Strauss (bệnh u hạt dị ứng), viêm da tạng dị ứng, viêm da tiếp xúc dị ứng và kích thích, bệnh mày đay, dị ứng do IgE, xơ vữa động mạch, viêm mạch, bệnh cơ do viêm không rõ

nguyên nhân, bệnh tan máu, bệnh Alzheimer, bệnh viêm đa rễ dây thần kinh mất myelin mãn tính, bệnh Sjogren, và bệnh vẩy nến.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh viêm ruột (IBD).

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm loét đại tràng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh Crohn.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị luput ban đỏ hệ thống (SLE).

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh sarcoit.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm khớp thiếu niên.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm khớp dạng thấp.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm khớp vẩy nến.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm cột sống dính khớp.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm tuyến mồ hôi mưng mủ.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm màng mạch nho.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh Sjogren.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh vẩy nến.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, được dùng bằng ít nhất một phương thức được chọn từ ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong khớp, trong cuống phổi, trong bụng, trong bao, trong gian sụn, trong khoang, trong khoang cơ thể, trong tiểu não, trong não thất, trong kết tràng, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong cơ tim, trong xương, trong chậu hông, trong màng ngoài tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong cột sống, trong bao hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong bàng quang, tiêm nhanh, âm đạo, trực tràng, má, dưới lưỡi, trong mũi, và qua da.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định sự có mặt của CD40 hoặc mảnh của nó trong mẫu thử nghiệm bằng thử nghiệm miễn dịch, trong đó thử nghiệm miễn dịch này bao gồm bước cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, theo khía cạnh và phương án bất kỳ được mô tả ở đây, và ít nhất là một nhãn có thể phát hiện được. Theo phương án khác, phương pháp này còn bao gồm các bước: (i) cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết với epitop trên CD40 hoặc mảnh của nó để tạo thành phức hợp thứ nhất; (ii) cho phức hợp này tiếp xúc với ít nhất một nhãn có thể phát hiện được, trong đó nhãn có thể phát hiện được này liên kết với epitop trên phức hợp thứ nhất, hoặc trên CD40 hoặc mảnh của nó, mà không được liên kết bởi kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, để tạo thành phức hợp thứ hai; và (iii) phát hiện sự có mặt của CD40 hoặc mảnh của nó trong mẫu thử nghiệm dựa trên tín hiệu tạo ra bởi nhãn có thể phát hiện được trong phức hợp thứ hai, trong đó sự có mặt của CD40 hoặc mảnh của nó tương quan trực tiếp với tín hiệu tạo ra bởi nhãn có thể phát hiện được. Theo phương án có liên quan khác, phương pháp này còn bao gồm các bước: (i) cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với ít nhất một kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể, hoặc phần liên kết kháng

nguyên của chúng, liên kết với epitop trên CD40 hoặc mảnh của nó để tạo thành phức hợp thứ nhất; (ii) cho phức hợp này tiếp xúc với ít nhất một nhãn có thể phát hiện được, trong đó nhãn có thể phát hiện được cạnh tranh với CD40 hoặc mảnh của nó để liên kết với kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, để tạo thành phức hợp thứ hai; và (iii) phát hiện sự có mặt của CD40 hoặc mảnh của nó trong mẫu thử nghiệm dựa trên tín hiệu phát ra từ nhãn có thể phát hiện được trong phức hợp thứ hai, trong đó sự có mặt của CD40 hoặc mảnh của chúng tương quan gián tiếp với tín hiệu phát ra từ nhãn có thể phát hiện được.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất DVD-Ig có chứa vùng liên kết, ví dụ CDR, được mô tả trong sáng chế này. Theo một phương án, DVD-Ig theo sáng chế có chứa bốn chuỗi polypeptit, trong đó hai chuỗi polypeptit có chứa VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, trong đó VD1 là miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất, VD2 là miền biến đổi chuỗi nặng thứ hai, C là miền không đổi chuỗi nặng, X1 là yếu tố kết nối với điều kiện là nó không phải là CH1, và X2 là vùng Fc; và hai chuỗi polypeptit có chứa VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, trong đó VD1 là miền biến đổi chuỗi nhẹ thứ nhất, VD2 là miền biến đổi chuỗi nhẹ thứ hai, C là miền không đổi chuỗi nhẹ, X1 là yếu tố kết nối với điều kiện là nó không phải là CH1, và X2 không chứa vùng Fc; và n bằng 0 hoặc 1; trong đó bốn chuỗi polypeptit này của protein liên kết nói trên tạo thành bốn vị trí liên kết kháng nguyên chức năng. Theo một phương án, chuỗi nặng thứ nhất (và/hoặc thứ hai) của DVD có chứa bộ CDR như nêu trong các SEQ ID NO: 6, 42, và 8. Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nhẹ thứ nhất (và/hoặc thứ hai) có chứa bộ CDR như nêu trong các SEQ ID NO: 21, 11, và 12. Theo một phương án, DVD-Ig theo sáng chế là đơn đặc hiệu và liên kết với huCD40. Theo phương án khác, DVD-Ig theo sáng chế là đa đặc hiệu và liên kết với CD40 và đích phân tử thứ hai.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A minh họa dưới dạng đồ thị hoạt tính đối kháng của kháng thể khảm (Kháng thể 1 (Ab1)) so với kháng thể đối chứng chủ vận và kháng thể đối kháng đã biết (4D11 (Astellas) và Bib (Boehringer)). Hình 1B minh hoạ dưới dạng đồ thị hoạt tính của cùng kháng thể khảm Ab1 trong thử nghiệm chất chủ vận bằng cách sử dụng cùng các chất đối chứng chủ vận và đối kháng như Hình 1A.

Hình 2 minh họa dưới dạng đồ thị hoạt tính chủ vận (Hình 2A) và hoạt tính đối kháng (Hình 2B) của kháng thể được làm cho giống như của người Ab101 so với kháng thể 4D11, kháng thể Blb, kháng thể IgG (đối chứng) và kháng thể đối chứng chủ vận (2141).

Hình 3 minh họa dưới dạng đồ thị kết quả từ nghiên cứu *in vivo* của kháng thể được làm cho giống như của người Ab101. Hình 3A minh họa dưới dạng đồ thị sự sản xuất IgG ở chuột hu*scid* đã nhận PBMC ở người kết hợp với đối chứng Ig, thể dung hợp CTLA4-Ig, hoặc kháng thể Ab101. Hình 3B mô tả minh họa dưới dạng đồ thị sự sống sót của tế bào B trong cùng mô hình chuột được dùng cùng các tác nhân như Hình 3A.

Hình 4 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự axit amin của chất đối kháng kháng thể chuột kháng CD40 của người, và sự sắp xếp thẳng hàng các trình tự liên ứng. Hình 4A thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của chuỗi nhẹ biến đổi của Kháng thể 3 (Ab3) (SEQ ID NO:48), Ab1 (SEQ ID NO:9) và Kháng thể 2 (Ab2) (SEQ ID NO:76) và trình tự liên ứng của chuỗi nhẹ biến đổi (SEQ ID NO: 116). Hình 4B thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của chuỗi nặng biến đổi của Ab3 (SEQ ID NO:44), Ab1 (SEQ ID NO:5) và Ab2 (SEQ ID NO:75) và trình tự liên ứng của chuỗi nặng biến đổi (SEQ ID NO: 117).

Hình 5A và Hình 5B minh họa dưới dạng đồ thị hiệu lực trung hòa đại diện (hoạt tính đối kháng) (Hình 5A) và hoạt tính chủ vận (Hình 5B) của Ab102 trên CD40 ở người trong thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân được mô tả trong ví dụ 7. Sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân tương ứng với sự gia tăng của nồng độ TNF trong mỗi thử nghiệm.

Hình 6 minh họa dưới dạng đồ thị sự ức chế đáp ứng liều lượng của điểm nội soi với sự sử dụng kháng thể 138 (Ab138) để phòng ngừa. Kháng thể 138 được thử nghiệm với các liều lượng là 15, 5, 1,5 và 0,5 mg/kg. Đối chứng âm IgG được sử dụng. Điều trị kháng p40IL-12/23 được sử dụng làm đối chứng dương. Bệnh qua trung gian bởi tế bào CD45Rbhi được chuyển cho động vật. RBlow dùng để chỉ nhóm đối chứng âm. Tế bào CD45RBlow không làm trung gian cho bệnh.

Hình 7 minh họa dưới dạng đồ thị kết quả của phân tích hóa mô miễn dịch để xác định các đại thực bào IBA1+ trong đại tràng có sử dụng kháng thể 138 (Ab138). Phân tích mô học của các phần đại tràng cho thấy sự giảm đại thực bào (phép đo mức độ viêm

thông thường). Đối chứng âm IgG được sử dụng. Sự điều trị kháng p40IL-12/23 được sử dụng làm đối chứng dương.

Hình 8 minh họa dưới dạng đồ thị hàm lượng trong huyết thanh của kháng thể tuần hoàn 138 (Ab138) 96 giờ (bằng $C_{lõm}$) sau liều cuối cùng ở mô hình chuyển tế bào T của bệnh viêm ruột kết. Hàm lượng trong huyết thanh cho thấy sự đáp ứng liều lượng. Sự điều trị kháng p40IL-12/23 được sử dụng làm đối chứng dương. Chỉ có 1 con vật trong nhóm 0,5 mg/kg có hàm lượng Ab138 đo được.

Hình 9A minh họa dưới dạng đồ thị kết quả nội soi sau khi dùng kháng thể 138 trong mô hình chuột viêm ruột kết. Sự điều trị bằng kháng thể 138 (Ab138) được bắt đầu ba tuần sau khi tiêm tế bào, sau khi xác nhận bệnh nội soi, và sự ức chế đáp ứng liều của tổng điểm MEDAI được ghi nhận. Liều lượng cao nhất (15 mg/kg) đạt được ý nghĩa thống kê (Hình 9A).

Hình 9B minh họa dưới dạng đồ thị kết quả mô học sau khi dùng kháng thể 138. Phân tích mô học về đại thực bào IBA1+ trong đại tràng dưới dạng số đo của sự viêm dạng tủy được thể hiện trên Hình 9B.

Hình 10 minh họa dưới dạng đồ thị cho thấy rằng Ab102 kìm chế IgM kháng KLH và IgG kháng KLH (đường nét đứt) so với động vật đối chứng chỉ điều trị bằng tá dược lỏng (đường nét liền). Khỉ Cynomolgus (hai/giới tính/nhóm) được dùng Ab102 ở liều lượng bằng 0 (chỉ tá dược lỏng) hoặc 10 mg/kg dưới da (SC) trong 5 tuần. Hemoxyanin chiết xuất từ loài nhuyễn thể biển (Keyhole limpet hemocyanin - KLH) được dùng cho tất cả các con vật vào Ngày 8. Mẫu huyết thanh được thu lấy từ mỗi con vật vào -11, -7, 0, 4, 7, 10, 14 và 21 ngày so với thời điểm dùng KLH (ngày KLH).

Hình 11A là đồ thị thể hiện kháng thể kháng CD40 138 ngăn ngừa protein niệu ở chuột MRL/lpr. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg của kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc sử dụng tá dược lỏng nước muối đệm phosphat (PBS) một mình được sử dụng làm đối chứng. Protein niệu được xác định dưới dạng tỉ lệ phần trăm protein trong nước tiểu <300 mg/dl.

Hình 11B là đồ thị minh họa kết quả cho thấy rằng kháng thể kháng CD40 138 kéo dài sự sống của chuột MRL/lpr. Các con vật được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng

thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng một mình được dùng làm đối chứng. Tỷ lệ sống sót được chỉ ra theo thời gian.

Hình 12A là đồ thị minh họa kết quả cho thấy rằng việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 đã ngăn ngừa sự phát triển của bệnh viêm thận. Hình 12A thể hiện tác dụng của kháng thể 138 lên bệnh cầu thận ở chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần, vào ngày 29 và ngày 63. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Bệnh cầu thận được đánh giá theo thang điểm 0-4. Khi mức độ nghiêm trọng của bệnh cầu thận trở nên tồi tệ hơn ở chuột MRL lão hóa, kháng thể 138 duy trì hiệu quả ở việc giảm thiểu bệnh cầu thận ở 5 và 15 mg/kg. Viêm mạch máu được ghi điểm trên thang điểm 0-4 dựa trên các tiêu chí sau: 0 – tối đa rất ít tế bào lympho hiếm; 1 - ít tế bào lympho tạo thành khối kết tụ lỏng lẻo; 2 - tế bào lympho tạo thành các khối kết tụ nhỏ rời rạc; 3 - khối kết tụ phân cực của tế bào lympho phình ra vào lumen của tĩnh mạch liền kề nhưng không bao quanh hoàn toàn động mạch vòng cung; 4 - tế bào lympho bao quanh hoàn toàn và kéo dài vào vỏ của động mạch vòng cung.

Hình 12B là đồ thị minh họa kết quả cho thấy rằng việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 đã ngăn ngừa sự phát triển của viêm thận. Hình 12B minh họa kết quả cho thấy tác dụng của kháng thể 138 lên viêm quanh mạch thận (PV) ở chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần, vào ngày 29 và ngày thứ 63. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Kháng thể kháng CD40 ở 5 và 15 mg/kg hữu hiệu để trong việc làm giảm sự thâm nhiễm quanh mạch (PV) trong thận vào 29 và 63 ngày.

Hình 12C là đồ thị cho thấy việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 ngăn ngừa sự phát triển của viêm thận. Hình 12C cho thấy tác dụng của kháng thể 138 lên viêm thận (TI) ở chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần, vào ngày 29 và ngày 60. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. TI được giảm sớm ở bệnh.

Hình 13A là đồ thị cho thấy kháng thể kháng CD40 138 ngăn ngừa bệnh viêm tuyến nước bọt. Hình 13A thể hiện tác dụng của kháng thể 138 đối với bệnh viêm tuyến nước bọt ở chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần, vào ngày 29 và ngày thứ 60. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Viêm quanh ống dẫn sửa được ghi điểm trên thang điểm 0-4 dựa trên các tiêu chí sau: 0 – tối đa rất ít bạch cầu hiếm; 1 - ít bạch cầu tạo thành khối kết tụ lỏng lẻo; 2 - bạch cầu tạo thành khối kết tụ nhỏ rời rạc; 3 - khối kết tụ phân cực của bạch cầu hoàn toàn bao quanh ống; 4 - khối kết tụ bạch cầu mở rộng vào nhu mô tuyến của tuyến nước bọt.

Hình 13B là đồ thị cho thấy kháng thể kháng CD40 138 đã ngăn ngừa chứng viêm khớp. Hình 13B thể hiện tác dụng của kháng thể 138 lên chứng viêm khớp ở chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần, vào ngày 29 và ngày 60. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Viêm khớp được chấm điểm cho mỗi chân trong hai chân của mỗi con chuột trên thang điểm 0-4 dựa trên các tiêu chí sau: 0 - không viêm; 1 - một số ít bạch cầu trong không gian khớp; 2 - bạch cầu thường xuyên trong không gian khớp với sự tăng sinh hoạt dịch nhẹ; 3 - bạch cầu mở rộng không gian khớp với sự tăng sinh hoạt dịch trung bình; 4 - bạch cầu và sự tăng sinh hoạt dịch mở rộng và kết tụ trong tất cả các không gian khớp với sự ăn mòn xương và/hoặc sự tăng sinh đáng chú ý. Điểm được cộng cho tổng số điểm có thể có bằng 8 cho mỗi con chuột.

Hình 14 là bảng gồm bốn đồ thị (i-iv) cho thấy kháng thể kháng CD40 138 ngăn chặn sự mở rộng của tế bào T trợ giúp có nang (Tfh) và các tế bào B trung tâm mầm (GC) ở lách, như được xác định bằng máy đếm tế bào theo dòng. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Bảng (i) thể hiện số lượng tế bào Tfh ở lách vào ngày 29. Bảng (ii) thể hiện số lượng tế bào Tfh ở lách vào ngày 63. Bảng (iii) thể hiện số lượng tế bào GC ở lách vào ngày 29. Bảng (iv) thể hiện số lượng tế bào GC ở lách vào ngày 63.

Hình 15A là đồ thị cho thấy kháng thể kháng CD40 138 ngăn ngừa sự gia tăng của tổng hàm lượng IgG tuần hoàn vào ngày 29. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần và 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng.

Hình 15B là đồ thị cho thấy kháng thể kháng CD40 138 ngăn ngừa sự gia tăng của tổng hàm lượng IgG tuần hoàn vào ngày 63. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần và 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng.

Hình 16A là đồ thị cho thấy hiệu quả của việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 đối với các chuẩn độ kháng ADN sợi kép (kháng-dsADN) vào ngày 29. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Vào ngày 29, các chuẩn độ kháng dsADN đã được xác định.

Hình 16B là đồ thị cho thấy sự điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 đối với chuẩn độ kháng ADN sợi kép (kháng-dsADN) vào ngày 63. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Vào ngày 63, các chuẩn độ kháng dsADN đã được xác định.

Hình 17A là đồ thị cho thấy việc dùng liều lượng phòng ngừa của kháng thể kháng CD40 138 ngăn chặn chứng protein niệu. Điều trị dự phòng bắt đầu trên chuột ở 26 tuần tuổi, và chuột bị protein niệu bị loại trừ khỏi nghiên cứu. Chuột được dùng liều lượng 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Protein niệu được xác định bằng tỉ lệ phần trăm protein trong nước tiểu < 300 mg/dl.

Hình 17B là đồ thị cho thấy việc dùng liều lượng dự phòng của kháng thể kháng-CD40 138 kéo dài thời gian sống sót bằng cách sử dụng mô hình chuột SLE. Điều trị dự phòng bắt đầu ở chuột ở 26 tuần tuổi, và chuột bị protein niệu bị loại trừ khỏi nghiên

cứu. Chuột được tiêm với 15 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg kháng thể 2 lần/tuần hoặc 15 mg/kg kháng thể 1 lần/tuần. Việc dùng tá dược lỏng PBS một mình được dùng làm đối chứng. Tỷ lệ sống còn được đánh giá suốt 36 tuần tuổi.

Hình 18A là đồ thị cho thấy rằng những con chuột được điều trị bằng kháng thể 138 ở liều lượng 15 mg/kg IP 2 lần/tuần, đã phát triển chứng protein niệu thấp theo thời gian, như thể hiện bằng mức protein trong nước tiểu (đương lượng mg/dl). Tá dược lỏng PBS được dùng IP, 2 lần/tuần được sử dụng làm đối chứng. Pređnisolon được dùng ở liều lượng 10 mg/kg theo đường miệng (PO), một lần mỗi ngày (SID). Chuột đối chứng không điều trị bằng tá dược lỏng PBS hay là chuột được điều trị bằng pređnisolon đều không phát triển protein niệu thấp. Ngưỡng protein niệu được chỉ định là 300 mg/dl.

Hình 18B là đồ thị cho thấy tốc độ hồi phục từ protein niệu ở chuột được điều trị bằng kháng thể 138 ở liều lượng 15 mg/kp IP 2 lần/tuần. Dựa trên tốc độ hồi phục từ protein niệu như được xác định bằng tỉ lệ phần trăm protein trong nước tiểu bình thường, thời gian trung bình để phục hồi protein niệu là 23±7 ngày. Tá dược lỏng PBS được dùng IP, 2 lần/tuần được sử dụng làm đối chứng. Pređnisolon được dùng ở liều lượng 10 mg/kg theo đường miệng (PO), một lần mỗi ngày (SID).

Hình 18C là đồ thị cho thấy những con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 ở liều lượng 15 mg/kp IP 2 lần/tuần, kéo dài đáng kể sự sống sót, như được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm sống sót. Tá dược lỏng PBS được dùng IP, 2 lần/tuần được sử dụng làm đối chứng. Pređnisolon được cung cấp đường miệng (PO), một lần mỗi ngày (SID).

Hình 19A là đồ thị cho thấy sự sản xuất nước bọt được bảo toàn bằng cách điều trị dự phòng bằng kháng thể 138 ở liều lượng 15 mg/kp IP 2 lần/tuần, 1,5 mg/kg 2 lần/tuần, 15 m/kg 1 lần/tuần. Tá dược lỏng PBS được sử dụng làm đối chứng. Pređnisolon được cung cấp với liều lượng 10 mg/kg. Sự sản xuất nước bọt ở chuột NZBWF-1 7 tuần tuổi, mà là những con chuột non hơn không bị bệnh, được sử dụng để so sánh thêm. Lượng nước bọt (mg) được xác định. Sự sản xuất nước bọt bởi chuột được điều trị bằng kháng CD40 là tương đối đồng nhất.

Hình 19B là đồ thị cho thấy thể tích nước bọt được bảo toàn bằng cách điều trị dự phòng bằng kháng thể kháng CD40 138 ở liều lượng 15 mg/kp IP 2 lần/tuần, 1,5

mg/kg 2 lần/tuần, 15 mg/kg 1 lần/tuần. Tá dược lỏng PBS được sử dụng làm đối chứng. Pređnisolon được dùng ở liều lượng 10 mg/kg. Thể tích nước bọt/khối lượng cơ thể (mg/gm) được xác định. Sự sản xuất nước bọt ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 lớn hơn đáng kể so với chuột đối chứng không được điều trị.

Hình 20A là đồ thị thể hiện sự sản xuất nước bọt được bảo toàn bằng cách điều trị trị liệu bằng kháng thể kháng CD40 138 ở liều lượng 15 mg/kg. Pređnisolon được dùng ở liều lượng 10 mg/kg. Sự sản xuất nước bọt ở chuột nhắt 11 tuần tuổi được sử dụng để so sánh thêm. Lượng nước bọt (mg) được xác định.

Hình 20B là đồ thị thể hiện sự sản xuất nước bọt được bảo toàn bằng cách điều trị trị liệu bằng kháng thể kháng CD40 138 ở liều lượng 15 mg/kg. Pređnisolon được dùng ở liều lượng 10 mg/kg. Sự sản xuất nước bọt ở chuột nhắt 11 tuần tuổi được sử dụng để so sánh thêm. Thể tích nước bọt/khối lượng cơ thể (mg/gm) được xác định.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, và việc sử dụng chúng. Nhiều khía cạnh của sáng chế đề cập đến kháng thể và các mảnh kháng thể, và dược phẩm của chúng, cũng như là axit nucleic, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp và tế bào chủ để tạo ra các kháng thể và mảnh này. Các phương pháp sử dụng kháng thể theo sáng chế để phát hiện CD40 ở người, để ức chế hoạt tính CD40/CD40L ở người, *in vitro* hoặc *in vivo*; và để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh hoặc các rối loạn chẳng hạn như bệnh viêm mãn tính và bệnh Crohn, cũng được bao hàm trong sáng chế.

Trừ khi được quy định khác ở đây, thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong sáng chế có ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực này. Ý nghĩa và phạm vi của các thuật ngữ cần rõ ràng, tuy nhiên, trong trường hợp có sự mơ hồ tiềm ẩn, các định nghĩa được nêu ở đây có tính quyết định so với các định nghĩa theo từ điển hoặc bên ngoài bất kỳ. Ngoài ra, trừ khi có yêu cầu khác tùy ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít sẽ có chứa cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều sẽ có chứa số ít. Trong đơn này, việc sử dụng "hoặc" có nghĩa là "và/hoặc" trừ khi được quy định khác. Ngoài ra, việc sử dụng thuật ngữ "sự bao gồm", cũng như các dạng khác, chẳng hạn như "bao gồm" và "được bao gồm", không làm giới hạn sáng chế. Ngoài ra,

các thuật ngữ chẳng hạn như "phần tử" hoặc "thành phần" bao hàm cả các phần tử và các thành phần có chứa một đơn vị và các phần tử và các thành phần chứa nhiều tiểu đơn vị trừ khi được quy định cụ thể khác.

Nói chung, các danh pháp được sử dụng liên quan đến và các kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh học, di truyền và hóa học protein và axit nucleic và phép lai được mô tả ở đây là những danh pháp đã biết và thường sử dụng trong lĩnh vực này. Các phương pháp và các kỹ thuật của sáng chế nhìn chung được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và như được mô tả trong nhiều tài liệu viện dẫn chung và tài liệu chuyên ngành được trích dẫn và thảo luận trong toàn bộ bản mô tả này trừ khi có quy định khác. Phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, thường được thực hiện trong lĩnh vực này hoặc như được mô tả ở đây. Các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và các kỹ thuật phòng thí nghiệm của, hóa học phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp và hóa học dược phẩm và y học được mô tả ở đây là các danh pháp đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng cho việc tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, điều chế dược phẩm, tạo chế phẩm, và phân phối, và điều trị cho bệnh nhân.

Rõ ràng sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, các thuật ngữ chọn lọc được định nghĩa dưới đây.

Thuật ngữ "polypeptit" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ chuỗi polyme bất kỳ của các axit amin. Các thuật ngữ "peptit" và "protein" được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ polypeptit và cũng dùng để chỉ chuỗi polyme của các axit amin. Thuật ngữ "polypeptit" bao hàm các protein tự nhiên hoặc nhân tạo, các mảnh protein và chất tương tự polypeptit của trình tự protein. Polypeptit có thể là monome hoặc polyme.

Thuật ngữ "protein được phân lập" hoặc "polypeptit được phân lập" là một protein hoặc polypeptit tùy theo nguồn gốc hoặc nguồn tạo dẫn xuất của nó không liên quan đến các thành phần đi kèm theo nó trong trạng thái tự nhiên của nó; về cơ bản không có các protein khác từ cùng loài; được biểu hiện bởi tế bào từ loài khác; hoặc không có trong tự nhiên. Do đó, polypeptit mà được tổng hợp hóa học hoặc được tổng

hợp trong hệ thống tế bào khác với tế bào mà nó bắt nguồn từ đó trong tự nhiên sẽ được "phân lập" khỏi các thành phần đi kèm trong tự nhiên của nó. Protein cũng có thể được hoàn trả về cơ bản không chứa các thành phần đi kèm với nó trong tự nhiên bằng cách phân lập, bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ về polypeptit được phân lập là kháng thể được phân lập, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng.

Thuật ngữ "thu hồi" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ quy trình hoàn trả lại loại hóa chất chẳng hạn như polypeptit về căn bản không chứa các thành phần đi kèm theo nó trong tự nhiên bằng cách phân lập, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế protein đã biết rõ trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "CD40 ở người" và "CD40 kiểu dại ở người" (viết tắt trong bản mô tả này là hCD40, hCD40wt), như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ protein xuyên màng dạng I. Theo một phương án, thuật ngữ CD40 ở người được dự định để bao gồm CD40 ở người tái tổ hợp (rhCD40), mà có thể được điều chế bằng các phương pháp biểu hiện tái tổ hợp tiêu chuẩn. Bảng 1 cung cấp trình tự axit amin của CD40 ở người (tức là, SEQ ID NO. 1), và miền ngoại bào của nó (tức là, SEQ ID NO:107), mà đã biết trong lĩnh vực này.

Bảng 1: Trình tự CD40 ở người

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO.:1	CD40 ở người	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTAC REKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTE FTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEE GWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQI ATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGP QDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKV AKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGS NTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRIS VQERQ
SEQ ID NO.:107	Miền Ngoại bào CD40 Ở người	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRE THCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETD TICTCEEGWHCTSEACESCV

"Hoạt tính sinh học" được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ tất cả các đặc tính sinh học vốn có của thụ thể CD40. Các đặc tính sinh học của CD40 bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở việc liên kết CD40L; sự tham gia vào sự phát triển của tế bào B; sự tham gia và kích thích tế bào lympho; sự tham gia vào chức năng tế bào trình diện kháng nguyên; điều hòa hoạt tính của tế bào phân nhánh, đại thực bào và tế bào B; gây ra sự sản xuất xytokin viêm ở đại thực bào và tế bào phân nhánh; điều hòa tăng sự trình diện kháng nguyên; điều hòa tăng kích thích tế bào T; và thúc đẩy sự chuyển đổi lớp globulin miễn dịch ở tế bào B.

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách đặc hiệu", như được sử dụng ở đây, khi đề cập đến sự tương tác của kháng thể, protein, hoặc peptit với loại hóa chất thứ hai, có nghĩa là sự tương tác này phụ thuộc vào sự có mặt của cấu trúc cụ thể (ví dụ, yếu tố quyết định kháng nguyên hoặc epitop) đối với các loại hóa chất; ví dụ,

kháng thể nhận ra và liên kết với cấu trúc protein đặc hiệu chứ không phải là các protein nói chung. Nếu kháng thể đặc hiệu đối với epitop "A", sự có mặt của phân tử có chứa epitop A (hoặc A tự do, không được gắn nhãn) trong phản ứng chứa "A" được gắn nhãn và kháng thể, sẽ làm giảm lượng A được gắn nhãn liên kết với kháng thể.

Thuật ngữ "chất chủ vận", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ chất điều biến mà khi tiếp xúc với phân tử quan tâm, ví dụ, CD40, gây ra sự gia tăng của độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử so với độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng quan sát được khi không có chất chủ vận.

Thuật ngữ "chất đối kháng" hoặc "chất ức chế", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ chất điều biến, khi tiếp xúc với phân tử quan tâm gây ra sự giảm độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử so với độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng quan sát được khi không có chất đối kháng. Các chất đối kháng cụ thể được quan tâm bao gồm các chất phong bế hoặc điều biến hoạt tính sinh học hoặc miễn dịch của CD40 ở người (hCD40). Kháng thể đối kháng của hCD40 có thể, ví dụ, ức chế sự điều hòa tăng CD86 của các tế bào B ở người sơ cấp mà được nuôi cấy với (hoặc được bộc lộ với) CD40L (chẳng hạn như nuôi cấy tế bào B với tế bào T ở người biểu hiện CD40L). Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận được xác định là có mức độ hoạt tính tương đương với hoặc ở trong một độ lệch chuẩn từ đối chứng âm trong thử nghiệm chủ vận, chẳng hạn như thử nghiệm bạch cầu đơn nhân chủ vận được mô tả trong ví dụ 7.

Kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế là một kháng thể đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, làm giảm hoạt tính hoặc chức năng CD40 so với hoạt tính hoặc chức năng CD40 khi không có kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó. Theo phương án cụ thể, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, về căn bản không có hoạt tính chất chủ vận, tức là, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, không gây ra sự gia tăng của độ lớn hoạt tính hoặc chức năng CD40 so với hoạt tính hoặc chức năng CD40 khi không có kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Hoạt tính chủ vận và đối kháng cũng có thể được đánh giá bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng dòng tế bào báo cáo biểu hiện CD40 ở người được liên kết với

phosphataza kiềm (AP) qua trung gian NFkB hoặc thử nghiệm tế bào B. Hơn nữa, theo một phương án, hoạt tính chủ vận và đối kháng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm chủ vận và đối kháng bạch cầu đơn nhân *in vitro* được mô tả trong ví dụ 7.

Thuật ngữ "ức chế sự liên kết với CD40L" dùng để chỉ khả năng của kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, để ngăn sự liên kết của CD40 với phối tử, CD40L. Sự ức chế của liên kết với CD40L sẽ dẫn đến làm suy yếu hoặc hủy bỏ hoạt tính sinh học qua trung gian liên kết của CD40 với CD40L.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ theo nghĩa rộng phân tử globulin miễn dịch (Ig) bất kỳ có chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), hoặc mảnh đoạn chức năng bất kỳ, thể đột biến, biến thể, hoặc dẫn xuất của chúng, mà giữ lại các đặc tính liên kết epitop cần thiết của phân tử Ig. Các dạng kháng thể đột biến, biến thể, hoặc dẫn xuất này đã biết trong lĩnh vực. Các phương án không làm giới hạn sáng chế được thảo luận dưới đây.

Trong kháng thể có chiều dài đầy đủ, mỗi chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (trong bản mô tả này viết tắt là HCVR hoặc VH) và vùng không đổi chuỗi nặng. Vùng không đổi chuỗi nặng có chứa ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này viết tắt là LCVR hoặc VL) và vùng không đổi chuỗi nhẹ. Vùng không đổi chuỗi nhẹ có chứa một miền, CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ thành các vùng có khả năng siêu biến, gọi là vùng xác định tính bổ sung (complementarity determining region - CDR), xen kẽ với các vùng được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (framework region - FR). Mỗi VH và VL có chứa ba CDR và 4 FR, được sắp xếp từ đầu amin đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc loại (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc lớp phụ bất kỳ.

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" hoặc "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc đơn giản là "phần kháng thể" hoặc "mảnh kháng thể"), như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, hCD40). Đã thấy rằng chức năng

liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bằng các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các phương án kháng thể này cũng có thể là các dạng thức đặc hiệu kép, đặc hiệu hai lần, hoặc đa đặc hiệu; liên kết đặc hiệu với hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau. Ví dụ về các mảnh liên kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" hoặc "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một gồm có các miền VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai có chứa hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối đisulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd gồm có các miền VH và CH1; (iv) mảnh Fv gồm có các miền VL và VH của nhánh đơn lẻ của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward*et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546, Winter *et al.*, Công bố PCT WO 90/05144 A1 được kết hợp ở đây để tham khảo), mà có chứa miền biến đổi đơn lẻ; và (vi) vùng xác định tính bổ sung được phân lập (CDR). Hơn nữa, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được kết hợp, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng một tác nhân liên kết tổng hợp cho phép chúng được tạo thành dưới dạng chuỗi protein đơn lẻ, trong đó các vùng VL và VH kết cặp để tạo thành các phân tử hóa trị một (gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); xem *ví dụ*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; và Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng được dự định là được bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" hoặc "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể. Các dạng kháng thể chuỗi đơn khác, chẳng hạn như diabody cũng được bao hàm. Các diabody là các kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit đơn lẻ, nhưng sử dụng thành phần liên kết quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi, do đó buộc các miền kết cặp với các miền bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên (xem ví dụ, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Các phần liên kết kháng thể này là đã biết trong lĩnh vực (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Thuật ngữ "cấu trúc kháng thể" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ polypeptit chứa một hoặc nhiều phần liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết với polypeptit thành phần liên kết hoặc miền không đổi globulin miễn dịch. Các polypeptit thành phần liên kết có chứa hai hoặc hơn hai gốc axit amin được kết nối bằng

liên kết peptit và được sử dụng để liên kết một hoặc nhiều phần liên kết kháng nguyên. Các polypeptit thành phần liên kết này là đã biết trong lĩnh vực (xem ví dụ, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Miền không đổi globulin miễn dịch dùng để chỉ miền không đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin miền không đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ IgG ở người là đã biết trong lĩnh vực và được trình bày trong Bảng 2.

BẢNG 2: Trình tự miền không đổi chuỗi nặng và miền không đổi chuỗi nhẹ IgG ở người

Protein	Ký hiệu nhận dạng trình tự	Trình Tự
		12345678901234567890123456789012
Vùng không đổi gamma-1 Ig	SEQ ID NO.:2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Protein	Ký hiệu nhận dạng trình tự	Trình Tự
		12345678901234567890123456789012
Đột biến vùng không đổi gamma-1 Ig	SEQ ID NO.:3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Vùng không đổi kappa Ig	SEQ ID NO.:4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Vùng không đổi Lambda Ig	SEQ ID NO.:81	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Hơn nữa, một kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể là một phần của các phân tử miễn dịch lớn hơn, được hình thành bởi liên kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị của kháng thể hoặc phần kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit khác. Các ví dụ về các phân tử miễn dịch này bao gồm việc sử dụng vùng lõi streptavidin để tạo ra một phân tử scFv bốn nhân (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) và sử dụng gốc xystein, peptit chỉ thị và đuôi polyhistiđin ở đầu tận cùng C để tạo ra phân tử scFv hóa trị hai và được biotinyl hóa (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Các phần kháng thể, như các đoạn Fab và $F(ab')_2$ có thể được điều chế từ toàn bộ kháng thể sử dụng các kỹ thuật thông thường, chẳng hạn như sự phân hủy papain hoặc pepsin, tương ứng, của toàn bộ kháng thể. Hơn nữa, các kháng thể, các phần kháng thể và các phân tử miễn dịch có thể thu được bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, như được mô tả ở đây.

"Kháng thể được phân lập", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ kháng thể về cơ bản là không có các kháng thể khác có các đặc tính kháng nguyên khác (ví dụ, một kháng thể được phân lập liên kết đặc hiệu với hCD40 về cơ bản là không có các kháng thể liên kết đặc hiệu các kháng nguyên khác với hCD40). Tuy nhiên, kháng thể được phân lập liên kết đặc hiệu với hCD40 có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, chẳng hạn các phân tử CD40 từ các loài khác. Hơn nữa, kháng thể được phân lập có thể không chứa các nguyên liệu và/hoặc hóa chất tế bào khác.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" dùng để chỉ kháng thể chứa các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ một loài và các trình tự vùng không đổi từ loài khác, chẳng hạn như các kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở chuột liên kết với vùng không đổi của người.

Thuật ngữ "kháng thể ghép CDR" dùng để chỉ các kháng thể chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng từ một loài nhưng trong đó các trình tự của một hoặc nhiều vùng CDR của VH và/hoặc VL được thay thế bằng trình tự CDR của loài khác, chẳng hạn như kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở chuột trong đó một hoặc nhiều CDR chuột (ví dụ, CDR3) được thay thế bằng trình tự CDR của người.

Các thuật ngữ "đánh số Kabat", "định nghĩa Kabat" và" gắn nhãn Kabat" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Các thuật ngữ này, được công nhận trong

lĩnh vực kỹ thuật, dùng để chỉ hệ thống đánh số các gốc axit amin mà biến đổi hơn (tức là, siêu biến) so với các gốc axit amin khác trong vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391 và, 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). Đối với vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng siêu biến nằm trong phạm vi từ vị trí axit amin 31 đến 35 đối với CDR1, các vị trí axit amin từ 50 đến 65 đối với CDR2, và các vị trí axit amin từ 95 đến 102 đối với CDR3. Đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng siêu biến nằm trong phạm vi từ vị trí axit amin 24 đến 34 đối với CDR1, các vị trí axit amin từ 50 đến 56 đối với CDR2, và các vị trí axit amin từ 89 đến 97 đối với CDR3.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất nhận" và "kháng thể chất nhận", dùng để chỉ kháng thể hoặc trình tự axit nucleic tạo ra hoặc mã hoá cho ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc 100% trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng khung. Theo một số phương án, thuật ngữ "chất nhận" dùng để chỉ trình tự axit amin hoặc axit nucleic kháng thể tạo ra hoặc mã hóa cho (các) vùng không đổi. Theo một số phương án, thuật ngữ "chất nhận" dùng để chỉ trình tự axit amin hoặc axit nucleic kháng thể tạo ra hoặc mã hóa cho một hoặc nhiều vùng khung và (các) vùng không đổi. Theo phương án cụ thể, thuật ngữ "chất nhận" dùng để chỉ trình tự axit amin hoặc axit nucleic kháng thể người tạo ra hoặc mã hóa cho ít nhất 80%, tốt hơn là, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98 %, hoặc 100% trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng khung. Theo phương án này, chất nhận có thể chứa ít nhất 1, ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5 hoặc ít nhất 10 gốc axit amin không có mặt ở một hoặc nhiều vị trí đặc hiệu của kháng thể người. Vùng khung chất nhận và/hoặc (các) vùng không đổi chất nhận có thể, ví dụ, có nguồn gốc hoặc thu được từ gen kháng thể dòng mầm, gen kháng thể trưởng thành, kháng thể chức năng (ví dụ, các kháng thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các kháng thể đang được phát triển, hoặc các kháng thể đã có trên thị trường).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "CDR" dùng để chỉ vùng xác định bổ sung bên trong các trình tự biến đổi kháng thể. Có ba CDR trong mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, được gọi là CDR1, CDR2 và CDR3, đối với mỗi vùng biến đổi. Thuật ngữ "bộ CDR " như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ nhóm

của ba CDR có mặt trong vùng biến đổi đơn lẻ có khả năng liên kết kháng nguyên. Đường biên chính xác của các CDR này được xác định khác nhau theo hệ thống khác nhau. Hệ thống được mô tả bởi Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) không chỉ cung cấp hệ thống đánh số gốc rõ ràng có thể áp dụng được cho vùng biến đổi bất kỳ của kháng thể, mà còn cung cấp các ranh giới gốc chính xác xác định ba CDR này. Những CDR này có thể được gọi là CDR Kabat. Chothia và cộng sự (Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) và Chothia *et al.*, Nature 342: 877-883 (1989)) phát hiện ra rằng các tiểu phần nhất định trong các CDR Kabat làm theo hình dạng khung peptit gần như giống hệt, mặc dù có sự đa dạng lớn của hàm lượng của trình tự axit amin. Các tiểu phần này được chỉ định là L1, L2 và L3 hoặc H1, H2 và H3, trong đó "L" và "H" lần lượt chỉ định các vùng chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng. Các vùng này có thể được gọi là CDR Chothia, mà có ranh giới gối lên CDR Kabat. Các ranh giới khác xác định CDR gối lên CDR Kabat đã được mô tả bởi Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) và MacCallum(*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Các định nghĩa biên CDR khác nữa có thể theo chặt chẽ một trong những hệ thống trên, nhưng dù sao cũng sẽ gối lên các CDR Kabat, mặc dù chúng có thể được rút ngắn hoặc kéo dài theo dự đoán hoặc phát hiện thực nghiệm mà các gốc hoặc nhóm gốc cụ thể hoặc thậm chí toàn bộ CDR không ảnh hưởng đáng kể đến liên kết kháng nguyên. Các phương pháp được sử dụng trong bản mô tả này có thể sử dụng các CDR được xác định theo hệ thống bất kỳ, mặc dù các phương án được ưu tiên sử dụng CDR được xác định theo Kabat hoặc Chothia.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ gốc "chính tắc" là gốc trong CDR hoặc khung mà xác định cấu trúc CDR chính tắc cụ thể theo định nghĩa của Chothia *et al.* (*J. Mol. Biol.* 196:901-907 (1987); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:799 (1992), cả hai được kết hợp trong bản mô tả này chỉ để tham khảo). Theo Chothia *et al.*, phần thiết yếu của CDR của nhiều kháng thể có hình dạng khung peptit gần như giống hệt thay vì sự đa dạng lớn ở hàm lượng của trình tự axit amin. Mỗi cấu trúc chính tắc chỉ chủ yếu đặc hiệu với bộ các góc xoắn khung peptit đối với mảnh tiếp giáp của các gốc axit amin tạo thành vòng.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "thể cho" và "kháng thể cho" dùng để chỉ kháng thể cung cấp một hoặc nhiều CDR. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể cho là kháng thể từ loài khác với kháng thể mà từ đó các vùng khung thu được hoặc

được tạo dẫn xuất. Trong ngữ cảnh của kháng thể được làm cho giống như của người, thuật ngữ "kháng thể cho" dùng để chỉ kháng thể không phải của người cung cấp một hoặc nhiều CDR.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khung" hoặc "trình tự khung" dùng để chỉ các trình tự còn lại của vùng biến đổi trừ đi các CDR. Bởi vì sự xác định chính xác trình tự CDR có thể được xác định bởi các hệ thống khác nhau, ý nghĩa của trình tự khung được giải thích khác nhau tương ứng. Sáu CDR (CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 của chuỗi nhẹ và CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 của chuỗi nặng) cũng chia các vùng khung trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thành bốn tiểu vùng (FR1, FR2, FR3 và FR4) trên mỗi chuỗi, trong đó CDR1 được định vị giữa FR1 và FR2, CDR2 giữa FR2 và FR3 và CDR3 giữa FR3 và FR4. Không xác định các tiểu vùng cụ thể là FR1, FR2, FR3 hoặc FR4, vùng khung, như được đề cập đến bởi các nguồn khác, đại diện cho FR kết hợp trong vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch có trong tự nhiên, đơn lẻ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, FR đại diện cho một trong bốn tiểu vùng, và các FR đại diện cho hai hoặc nhiều hơn hai trong bốn tiểu vùng cấu thành vùng khung.

Các trình tự chất nhận chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người là đã biết trong lĩnh vực. Theo một phương án của sáng chế, các trình tự chất nhận chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được lựa chọn từ các trình tự được mô tả trong Bảng 3 và Bảng 4.

BẢNG 3: Các trình tự chất nhận chuỗi nặng

SEQ ID No.	Vùng Protein	Trình Tự
		12345678901234567890123456789012
82	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF T
83	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
84	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYY CAR
85	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

SEQ ID No.	Vùng Protein	Trình Tự
		12345678901234567890123456789012
82	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
86	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
87	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
88	21/28&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
89	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
90	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
91	VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
85	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
92	M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSLS
93	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
94	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
88	M60&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
82	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
83	VH1-46&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
95	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
85	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

BẢNG 4: Các trình tự chất nhận chuỗi nhẹ

SEQ ID No.	Vùng Protein	Trình Tự
		12345678901234567890123456789012
96	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
97	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
98	A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
99	A20&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
96	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
114	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
100	III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
99	III-3R&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
101	A1&JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
102	A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
103	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
99	A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
104	01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
105	01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
103	01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
106	01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

Như đã được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gen kháng thể dòng mầm" hoặc "mảnh gen" dùng để chỉ trình tự globulin miễn dịch được mã hoá bởi các tế bào không phải dạng lympho mà chưa trải qua quá trình trưởng thành mà dẫn đến sự sắp xếp lại và đột biến di truyền đối với sự biểu hiện globulin miễn dịch cụ thể. (Xem, ví dụ, Shapiro *et al.*, *Crit. Rev. Immunol.* 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis *et al.*, *Adv Exp Med Biol.*

484:13-30 (2001)). Một trong những lợi ích được cung cấp bởi các phương án khác nhau theo sáng chế phát sinh từ sự nhận thức rằng các gen kháng thể dòng mầm có nhiều khả năng hơn là các gen kháng thể trưởng thành để bảo tồn các cấu trúc trình tự axit amin thiết yếu đặc trưng của các cá thể trong loài, do đó ít có khả năng được nhận ra là từ nguồn bên ngoài khi được sử dụng để trị liệu trong loài đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ gốc "chìa khóa" dùng để chỉ các gốc bên trong vùng biến đổi mà có ảnh hưởng hơn đến độ đặc hiệu và/hoặc ái lực liên kết của kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm cho giống như của người. Gốc chìa khóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều gốc sau đây: gốc nằm gần CDR, vị trí glycozyl hóa tiềm năng (có thể là vị trí của glycozyl hóa N- hoặc O-), gốc hiếm, gốc có khả năng tương tác với kháng nguyên, gốc có khả năng tương tác với CDR, gốc chính tắc, gốc tiếp xúc giữa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, gốc trong khu vực Vernier và gốc trong vùng gối lên giữa định nghĩa Chothia của CDR1 chuỗi nặng biến đổi và định nghĩa Kabat của khung chuỗi nặng thứ nhất.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể được được làm cho giống như của người" là kháng thể hoặc một biến thể, dẫn xuất, chất tương tự hoặc mảnh của nó mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên được quan tâm (ví dụ, CD40 ở người), và có chứa một vùng khung (FR) về cơ bản có trình tự axit amin của kháng thể người và một vùng xác định bổ sung (CDR) về cơ bản có trình tự axit amin của kháng thể không phải của người. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "về cơ bản" trong ngữ cảnh của CDR dùng để chỉ CDR có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% ít nhất 99% với trình tự axit amin của CDR kháng thể không phải của người. Kháng thể được làm cho giống như của người về cơ bản có chứa tất cả của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi (Fab, Fab', F(ab') 2, FabC, Fv), trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vùng CDR tương ứng với vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người (*tức là*, kháng thể cho) và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các vùng khung là vùng khung của trình tự liên ứng globulin miễn dịch ở người. Tốt hơn là, kháng thể được làm cho giống như của người cũng có chứa ít nhất một phần của vùng không đổi globulin miễn dịch (Fc), thường là một phần của globulin miễn dịch người. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống như của người chứa cả hai chuỗi nhẹ cũng như ít nhất là miền biến

đổi của chuỗi nặng. Kháng thể này cũng có thể bao gồm các vùng CH1, bản lề, CH2, CH3, và CH4 của chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống như của người chỉ chứa chuỗi nhẹ được làm cho giống như của người. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống như của người chỉ chứa chuỗi nặng được làm cho giống như của người. Theo các phương án cụ thể, một kháng thể được làm cho giống như của người chỉ chứa miền biến đổi được làm cho giống như của người của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng được làm cho giống như của người.

Kháng thể được làm cho giống như của người có thể được chọn từ lớp bất kỳ của các globulin miễn dịch, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và lớp bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Kháng thể được làm cho giống như của người có thể có chứa các trình tự từ nhiều hơn một lớp hoặc phân lớp, và các miền không đổi cụ thể có thể được chọn để tối ưu hóa các chức năng tác động mong muốn bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực.

Vùng khung và vùng CDR của kháng thể được làm cho giống như của người không cần phải tương ứng chính xác với các trình tự bố mẹ, ví dụ, kháng thể cho CDR hoặc khung liên ứng có thể được gây đột biến bằng cách thế, cài xen và/hoặc loại bỏ ít nhất một gốc axit amin sao cho gốc của CDR hoặc khung tại vị trí đó không tương ứng với kháng thể cho hoặc khung liên ứng. Tuy nhiên, theo một phương án được ưu tiên, những đột biến này sẽ không rộng. Thông thường, ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 95% gốc kháng thể được làm cho giống như của người sẽ tương đồng với các gốc của trình tự FR và CDR bố mẹ. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khung liên ứng" dùng để chỉ vùng khung trong trình tự globulin miễn dịch liên ứng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự globulin miễn dịch liên ứng" dùng để chỉ trình tự tạo thành từ các axit amin (hoặc nucleotit) thường gặp nhất trong họ các trình tự globulin miễn dịch liên quan (xem ví dụ, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). Trong họ globulin miễn dịch, mỗi vị trí trong trình tự liên ứng được chiếm giữ bởi axit amin có mặt thường xuyên nhất ở vị trí đó trong họ này. Nếu hai axit amin có mặt với độ thường xuyên như nhau, một trong hai có thể được bao gồm trong trình tự liên ứng.

Như được sử dụng ở đây, khu vực "Vernier" dùng để chỉ tập con của các gốc khung mà có thể điều chỉnh cấu trúc CDR và điều chỉnh phù hợp với kháng nguyên như

được mô tả bởi Foote and Winter (1992, *J. Mol. Biol.* 224:487-499, được kết hợp trong bản mô tả này chỉ để tham khảo). Các gốc khu vực Vernier tạo thành lớp nằm dưới các CDR và có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của CDR và ái lực của kháng thể.

Thuật ngữ "protein liên kết đa hóa trị" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ protein liên kết có chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên. Protein liên kết đa hóa trị tốt hơn là được thiết kế để có ba hoặc nhiều hơn ba vị trí liên kết kháng nguyên, và nhìn chung không phải là kháng thể có trong tự nhiên. Thuật ngữ "protein liên kết đa đặc hiệu" dùng để chỉ protein liên kết có khả năng liên kết hai hoặc nhiều đích có liên quan hoặc không liên quan.

Thuật ngữ "miền biến đổi kép" hoặc "DVD" hoặc "DVD-Ig" như được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây, là các protein liên kết kháng nguyên có chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên và là các protein liên kết hóa trị bốn hoặc đa hóa trị. DVD có thể là đơn đặc hiệu, tức là, có khả năng liên kết một kháng nguyên hoặc đa đặc hiệu, tức là có khả năng liên kết hai hoặc nhiều kháng nguyên. Các protein liên kết DVD có chứa hai polypeptit DVD chuỗi nặng và hai polypeptit DVD chuỗi nhẹ được gọi là DVD Ig. Mỗi một nửa của DVD Ig gồm có polypeptit DVD chuỗi nặng, và polypeptit DVD chuỗi nhẹ, và hai vị trí liên kết kháng nguyên. Mỗi vị trí liên kết có chứa miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ với tổng cộng 6 CDR tham gia vào việc liên kết kháng nguyên trên mỗi vị trí liên kết kháng nguyên. Theo một phương án, các CDR được mô tả trong sáng chế này (ví dụ, các SEQ ID NO:6, 42, và 8 (chuỗi nặng) và 21, 11, và 12 (chuỗi nhẹ)) được sử dụng trong DVD kháng CD40. ví dụ về cấu trúc DVD Ig đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ như trong Patent Mỹ số 7,612,181, được kết hợp làm tài liệu tham khảo trong bản mô tả này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "làm trung hòa" dùng để chỉ sự trung hòa hoạt tính sinh học của thụ thể xytokin khi kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết đặc hiệu với thụ thể xytokin. Tốt hơn là, kháng thể làm trung hòa, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là kháng thể trung hòa có sự liên kết với hCD40 của nó dẫn đến sự ức chế hoạt tính sinh học của hCD40. Tốt hơn là kháng thể trung hòa, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, liên kết hCD40 và làm giảm hoạt tính sinh học của hCD40 ít nhất khoảng 20%, 40%, 60%, 80%, 85% hoặc nhiều hơn. Sự ức chế hoạt tính sinh học của hCD40 bằng kháng thể trung hòa, hoặc phần liên kết kháng

nguyên của chúng, có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chỉ số hoạt tính sinh học hCD40 đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "hoạt tính" bao gồm các hoạt tính chẳng hạn như tính đặc hiệu/ái lực liên kết của kháng thể đối với kháng nguyên, ví dụ như kháng thể kháng hCD40 liên kết với kháng nguyên hCD40 và/hoặc hiệu lực trung hòa của kháng thể, ví dụ như kháng thể kháng hCD40 mà sự liên kết với hCD40 của nó ức chế hoạt tính sinh học của hCD40, ví dụ, liên kết CD40L; tham gia vào sự phát triển của tế bào B; hoạt hóa tế bào lympho; tham gia vào chức năng tế bào trình diện kháng nguyên; điều hòa hoạt tính của tế bào phân nhánh, đại thực bào và tế bào B; gây ra sự sản xuất xytokin viêm ở các đại thực bào và tế bào phân nhánh; điều hòa tăng sự trình diện kháng nguyên; điều hòa tăng sự kích thích tế bào T; và thúc đẩy sự chuyển đổi lớp globulin miễn dịch trong tế bào B.

Các thử nghiệm ví dụ để đánh giá hoạt tính của các kháng thể kháng CD40 theo sáng chế bao gồm các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* như đã nêu trong bản mô tả này. Cụ thể, các thử nghiệm có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể kháng CD40 là kháng thể chủ vận hay kháng thể đối kháng.

Ví dụ, sự liên kết với CD40 ở người và sự ức chế tương tác CD40-CD40L có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu hiện CD40 ở người thông qua phân tích FACS. Các hoạt tính đối kháng và hoạt tính chủ vận có thể được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào báo cáo biểu hiện CD40 biểu hiện CD40 của người được kết nối với phosphataza kiềm (AP) qua trung gian NFkB. Khi tín hiệu được tiếp nhận thông qua CD40, sự hoạt hóa NFkB dẫn đến sự tiết AP được đo bằng chất đo màu. Trong thử nghiệm chất đối kháng ví dụ, dòng báo cáo CD40 có thể được nuôi cấy với dòng tế bào Jurkat biểu hiện CD40L (để tạo ra tương tác phối tử sinh lý) hoặc với CD40L hòa tan và khả năng của các kháng thể kháng CD40 để phong bế tín hiệu NFkB có thể được đánh giá. Trong thử nghiệm chất chủ vận ví dụ, dòng tế bào báo cáo CD40 ở người có thể được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 và tín hiệu NFkB được đo như đã mô tả ở trên.

Ngoài ra, có thể sử dụng thử nghiệm chất chủ vận tế bào B, trong đó các tế bào B được hoạt hóa bằng liều lượng thấp của kháng IgM và IL4, trước khi bổ sung kháng thể đối kháng CD40. Sự tăng cường hoạt hóa tế bào B có thể được đo như là sự điều hòa

tăng của CD86, mà đến lượt mình là dấu hiệu của hoạt tính chủ vận. Tương tự, thử nghiệm chất đối kháng tế bào B có thể được sử dụng trong đó các tế bào B sơ cấp của người được nuôi cấy với dòng tế bào T của người biểu hiện CD40L mà dẫn đến sự hoạt hóa tế bào B và sự điều hòa tăng của sự biểu hiện CD86 qua sự tương tác CD40/CD40L. Sự ức chế của sự điều hòa tăng CD86 của các tế bào B sơ cấp của người là dấu hiệu của hoạt tính đối kháng.

Thuật ngữ "epitop" bao gồm yếu tố quyết định polypeptit bất kỳ có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Trong các phương án nhất định, các yếu tố quyết định epitop bao gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử chẳng hạn như axit amin, chuỗi bên đường, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và, theo các phương án nhất định, có thể có đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc trưng, và/hoặc đặc điểm điện tích đặc trưng. Theo các phương án khác nhau, epitop có thể là epitop tuyến tính hoặc tuần tự, tức là, trình tự tuyến tính của các axit amin, của cấu trúc bậc một của kháng nguyên, tức là, CD40. Ngoài ra, theo các phương án khác, epitop có thể là epitop định dạng có một hình dạng ba chiều đặc trưng khi kháng nguyên mang vẻ cấu trúc thứ cấp của nó. ví dụ, các epitop định dạng có thể có chứa các axit amin phi tuyến tính, tức là, không tuần tự của kháng nguyên.

Theo một phương án cụ thể, epitop là vùng của kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng được cho là liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khi nó ưu tiên nhận ra kháng nguyên đích của nó trong hỗn hợp phức hợp của các protein và/hoặc các đại phân tử.

Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và các vùng không đổi có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Các kháng thể người trong sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hoá bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bởi các phương pháp gây đột ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, không được dự định là bao gồm các kháng thể trong đó các trình

tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác, chẳng hạn như chuột, đã được ghép vào các trình tự khung của người.

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định là bao gồm tất cả các kháng thể người được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, chẳng hạn như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vật truyền biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nạp vào tế bào chủ (được mô tả chi tiết trong Phần II C, dưới đây), các kháng thể được phân lập từ một thư viện kháng thể người tổ hợp, tái tổ hợp (Hoogenboom HR, (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà là chuyển gen đối với gen globulin miễn dịch ở người (xem ví dụ, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., và Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370) hoặc các kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương pháp khác bất kỳ bao gồm việc nối các trình tự gen của globulin miễn dịch ở người với các trình tự ADN khác. Những kháng thể người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi và không đổi có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Theo các phương án nhất định,tuy nhiên, các kháng thể người tái tổ hợp này được đưa đi gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi con vật chuyển gen đối với các trình tự Ig của người được sử dụng, sự gây đột biến soma *in vivo*) và do đó các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi có nguồn gốc từ và có liên quan đến trình tự VH và VL của dòng mầm ở người, có thể không tồn tại trong tự nhiên trong các danh mục dòng mầm kháng thể người *in vivo*. Một phương án đề xuất các kháng thể người hòan toàn có khả năng liên kết CD40 ở người mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, sử dụng các thư viện phagơ Ig ở người chẳng hạn như các thư viện được bộc lộ trong Jermutus *et al.*, Công bố PCT Số WO 2005/007699 A2.

Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon chất bề mặt", được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ hiện tượng quang học cho phép phân tích các tương tác đặc hiệu sinh

học thời gian thực bằng cách phát hiện sự thay đổi nồng độ protein trong nền cảm biến sinh học, ví dụ bằng cách sử dụng hệ thống BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Thụy Điển và Piscataway, NJ). Mô tả khác, xem Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; và Johnnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Thuật ngữ "k_{on} ", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm mục đích dùng để chỉ hằng số tốc độ của sự kết hợp liên kết của kháng thể với kháng nguyên để tạo thành phức hợp kháng thể/kháng nguyên như đã biết trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "k_{off} ", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ hằng số tốc độ của sự phân ly của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên như đã biết trong lĩnh vực.

Thuật ngữ " K_D ", như được sử dụng ở đây, được dự định là dùng để chỉ hằng số phân ly của tương tác kháng thể - kháng nguyên cụ thể như đã biết trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "kháng thể được gắn nhãn" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng thể có nhãn được kết hợp mà cung cấp nhận dạng của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Tốt hơn là, nhãn này là chỉ thị có thể phát hiện được, ví dụ, sự kết hợp của axit amin được gắn nhãn phóng xạ hoặc gắn vào polypeptit của các gốc biotinyl mà có thể được phát hiện bằng aviđin được đánh dấu (ví dụ, streptaviđin có chứa chỉ thị huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym có thể được phát hiện bằng phương pháp quang học hoặc đo màu). ví dụ về nhãn đối với polypeptit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất sau đây: đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, hoặc ^{153}Sm); chất đánh dấu huỳnh quang ví dụ, FITC, rhođamin, lanthanit photpho), chất đánh dấu enzym (ví dụ, peroxiđaza, luciferaza, phosphataza kiềm); các chỉ thị huỳnh quang hóa học; các nhóm biotinyl; các epitop polypeptit xác định trước được nhận diện bởi chất báo cáo thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp khóa kéo lơxin, vị trí liên kết đối với kháng thể thứ cấp, miền liên kết kim loại, các đuôi epitop); và tác nhân từ tính, chẳng hạn như chất càng hóa gađolini.

Các thuật ngữ "tinh thể" và "tinh thể hoá" được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, tồn tại ở dạng tinh

thể. Tinh thể là một dạng của trạng thái rắn của vật chất, mà khác biệt với các dạng khác như trạng thái rắn vô định hình hoặc trạng thái tinh thể lỏng. Tinh thể gồm có các mảng nguyên tử, ion, phân tử thường xuyên, lặp đi lặp lại, ba chiều (ví dụ, các protein như kháng thể), hoặc các tập hợp phân tử (ví dụ, phức hợp kháng nguyên/kháng thể). Các mảng ba chiều này được bố trí theo các mối quan hệ toán học cụ thể đã biết rõ trong lĩnh vực. Đơn vị cơ bản, hoặc khối xây dựng, được lặp lại trong tinh thể được gọi là đơn vị bất đối xứng. Sự lặp lại của đơn vị bất đối xứng trong một sự sắp xếp phù hợp với đối xứng tinh thể xác định, được xác định rõ ràng tạo ra "tế bào đơn vị" của tinh thể. Sự lặp lại của tế bào đơn vị bằng sự dịch mã thông thường trong cả ba chiều tạo ra tinh thể. Xem Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

Thuật ngữ "polynucleotit" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ dạng polyme gồm hai hoặc nhiều nucleotit, là ribonucleotit hoặc đeoxynucleotit hoặc dạng cải biến của một trong hai loại nucleotit. Thuật ngữ này bao gồm các dạng sợi đơn và sợi kép của ADN nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Thuật ngữ "polynucleotit được phân lập" được sử dụng ở đây có nghĩa là polynucleotit (ví dụ, có nguồn gốc từ hệ gen, cADN hoặc tổng hợp, hoặc dạng kết hợp của chúng) mà, theo nguồn gốc của nó, "polynucleotit được phân lập": không kết hợp với tất cả hoặc một phần của polynucleotit mà cùng với nó "polynucleotit được phân lập" được tìm thấy trong thiên nhiên; được liên kết có điều khiển với polynucleotit mà không được liên kết với trong tự nhiên; hoặc không có trong tự nhiên dưới dạng một phần của trình tự lớn hơn.

Thuật ngữ "vật truyền", như được sử dụng ở đây, được dự định là dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Một loại vật truyền là "plasmit", mà dùng để chỉ vòng ADN sợi kép mạch vòng mà các mảnh ADN khác có thể được nối vào đó. Một loại vật truyền khác là vật truyền virut, trong đó mảnh ADN khác có thể được nối vào hệ gen virut. Các vật truyền nhất định có khả năng tự sao chép ở tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vật truyền vi khuẩn có điểm mở đầu sao chép vi khuẩn và vật truyền động vật có vú thể bổ sung). Các vật truyền khác (ví dụ, các vật truyền động vật có vú không thuộc thể bổ sung) có thể được

hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ và do đó được sao chép cùng với hệ gen của vật chủ. Hơn nữa, các vật truyền nhất định có khả năng định hướng sự biểu hiện của gen mà chúng được liên kết có điều khiển với. Các vật truyền này được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "vật truyền biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "vật truyền biểu hiện"). Nhìn chung, vật truyền biểu hiện để sử dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả sáng chế này, "plasmit" và "vật truyền" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau dưới dạng plasmit là dạng thường được sử dụng nhất của vật truyền. Tuy nhiên, sáng chế được dự định là bao gồm các dạng vật truyền biểu hiện khác, chẳng hạn như vật truyền virut (ví dụ, retrovirut, ađenovirut và virut kết hợp ađeno có khiếm khuyết sao chép), mà có chức năng tương đương.

Thuật ngữ "liên kết có điều khiển" dùng để chỉ sự đặt cạnh nhau trong đó các thành phần được mô tả là có mối quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo cùng một phương thức dự kiến của chúng. Trình tự điều khiển "được liên kết có điều khiển" với trình tự mã hoá được nối theo cách mà sự biểu hiện của trình tự mã hóa đạt được trong điều kiện tương thích với trình tự điều khiển. Các trình tự "được liên kết có điều khiển" bao gồm cả các trình tự điều khiển biểu hiện mà tiếp giáp với gen quan tâm và các trình tự điều khiển biểu hiện mà hoạt động trong *trans* hoặc các một khoảng để điều khiển gen quan tâm. Thuật ngữ "trình tự điều khiển biểu hiện" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ trình tự polynucleotit cần thiết để thực hiện sự biểu hiện và xử lý các trình tự mã hóa mà chúng được nối vào. Các trình tự điều khiển biểu hiện bao gồm các trình tự mở đầu, kết thúc, khởi động và tăng cường phiên mã thích hợp; các tín hiệu xử lý ARN hiệu quả chẳng hạn như các tín hiệu ghép nối và polyađenyl hóa; các trình tự làm ổn định mARN bào tương; trình tự làm tăng cường hiệu quả dịch mã (*tức là*, trình tự liên ứng Kozak); trình tự làm tăng cường sự ổn định protein; và khi muốn, trình tự làm tăng cường sự bài tiết protein. Bản chất của các trình tự điều khiển này khác nhau tùy thuộc vào sinh vật chủ; ở sinh vật nhân sơ, các trình tự điều khiển như vậy có chứa vùng khởi động, vị trí liên kết ribosom, và trình tự kết thúc phiên mã; ở sinh vật nhân chuẩn, nhìn chung, các trình tự điều khiển này bao gồm vùng khởi động và trình tự kết thúc phiên mã. Thuật ngữ "trình tự điều khiển" được dự định là bao gồm các thành phần mà sự có mặt của chúng là thiết yếu đối với sự biểu hiện và xử lý, và có thể bao

gồm các thành phần khác mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, trình tự dẫn đầu và trình tự đối tác dung hợp. Các cấu trúc protein theo sáng chế có thể được biểu hiện, và được tinh chế bằng cách sử dụng vật truyền biểu hiện và tế bào chủ đã biết trong lĩnh vực, có chứa băng biểu hiện, vật truyền, tế bào chủ tái tổ hợp và phương pháp để biểu hiện tái tổ hợp và xử lý phân giải protein đối với các polyprotein và tiền protein tái tổ hợp từ khung đọc mở đơn lẻ (ví dụ, WO 2007/014162 được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo).

"Sự biến nạp", như xác định trong bản mô tả này, dùng để chỉ bất kỳ quá trình nào mà ADN ngoại sinh đi vào tế bào chủ. Sự biến nạp có thể xảy ra dưới điều kiện tự nhiên hoặc được làm cho giống như của người sử dụng các phương pháp khác nhau được biết rõ trong lĩnh vực. Sự biến nạp có thể dựa trên bất kỳ phương pháp biết đến sự cài trình tự axit nucleic lạ vào tế bào chủ tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn. Phương pháp được chọn là dựa trên tế bào chủ được biến nạp và có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự nhiễm virut, đục lỗ điện, lipofection, và bắn phá hạt. Tế bào "được biến nạp" bao gồm tế bào được biến nạp ổn định trong đó ADN được cài xen vào có khả năng sao chép dưới dạng plasmit tự sao chép hoặc dưới dạng một phần của nhiễm sắc thể vật chủ. Chúng cũng bao gồm tế bào cái mà biểu hiện tạm thời ADN hoặc ARN được cài xen trong khoảng thời gian giới hạn.

Thuật ngữ "tế bào chủ tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "tế bào chủ"), như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định dùng để chỉ tế bào mà ADN ngoại sinh được đưa vào. Cần hiểu rằng các thuật ngữ này không được dự định là chỉ dùng để chỉ các tế bào chủ thể cụ thể, mà còn dùng để chỉ con cháu của tế bào này. Bởi vì các cải biến nhất định có thể xảy ra ở các thế hệ tiếp theo do đột biến hoặc ảnh hưởng của môi trường, trên thực tế, con cháu có thể không thể giống hệt tế bào bố mẹ, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" như được sử dụng trong bản mô tả này Tốt hơn là tế bào chủ bao gồm tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn được chọn từ Giới sinh vật bất kỳ. Tế bào nhân chuẩn được ưu tiên bao gồm tế bào sinh vật đơn bào, tế bào nấm, tế bào thực vật và tế bào động vật. Tế bào chủ được ưu tiên nhất bao gồm nhưng không giới hạn ở dòng tế bào nhân sơ *E.Coli*; các dòng tế bào động vật có vú CHO, HEK 293 và COS; dòng tế bào côn trùng Sf9; và tế bào nấm *Saccharomyces cerevisiae*.

Các kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit và nuôi cấy mô và biến nạp (ví dụ, đục lỗ điện, chuyển nhiễm liposom). Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo các thông số kỹ thuật của nhà sản xuất hoặc như thường được thực hiện trong lĩnh vực hoặc như được mô tả ở đây. Các kỹ thuật và thủ tục nói trên có thể thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn mà được viện dẫn và thảo luận trong toàn bộ bản mô tả này. Xem ví dụ, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo vì bất kỳ mục đích nào.

"Sinh vật chuyển gen", như đã biết trong lĩnh vực và được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ sinh vật chứa các tế bào mà có chứa gen chuyển, trong đó gen chuyển được đưa vào trong sinh vật (hoặc tổ tiên của sinh vật) biểu hiện polypeptit không được biểu hiện trong tự nhiên ở sinh vật này. "Gen chuyển" là cấu trúc ADN, mà được hợp nhất ổn định và có điều khiển vào trong hệ gen của tế bào mà từ đó phát triển thành sinh vật chuyển gen, định hướng sự biểu hiện của sản phẩm gen được mã hoá trong một hoặc nhiều loại tế bào hoặc mô của sinh vật chuyển gen.

Thuật ngữ "điều hòa" và "điều biến" được sử dụng thay thế lẫn nhau, và, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ sự thay đổi hoặc sự biến đổi của hoạt tính của phân tử quan tâm (ví dụ, hoạt tính sinh học của hCD40). Việc điều biến có thể là sự tăng hoặc sự giảm của độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử quan tâm. Các hoạt tính và chức năng ví dụ của phân tử bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đặc tính liên kết, hoạt tính enzym, sự hoạt hóa thụ thể tế bào và sự truyền tín hiệu.

Tương ứng, thuật ngữ "chất điều biến", như được sử dụng trong bản mô tả này, là hợp chất có khả năng làm thay đổi hoặc biến đổi hoạt tính hoặc chức năng của phân tử quan tâm (ví dụ, hoạt tính sinh học của hCD40). ví dụ, chất điều biến có thể gây ra sự tăng lên hoặc sự giảm đi của độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng nhất định của phân tử so với độ lớn của hoạt tính hoặc chức năng được quan sát thấy khi không có chất điều biến này. Theo các phương án nhất định, chất điều biến là chất ức chế, mà làm giảm độ lớn của ít nhất là một hoạt tính hoặc chức năng của phân tử. Các chất ức chế ví dụ bao

gồm, nhưng không giới hạn ở, protein, peptit, kháng thể, thể peptit, carbohyđrat hoặc các phân tử hữu cơ nhỏ. Các thể peptit được mô tả, ví dụ, trong WO01/83525.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng hữu hiệu" dùng để chỉ lượng trị liệu mà đủ để làm giảm hoặc cải thiện mức độ nghiêm trọng và/hoặc khoảng thời gian của rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, ngăn chặn sự tiến triển của rối loạn, gây ra sự hồi quy của rối loạn, ngăn ngừa sự xuất hiện trở lại, sự phát triển, sự khởi phát hoặc tiến triển của một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn, phát hiện rối loạn, hoặc tăng cường hoặc cải thiện (các) tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị của liệu pháp khác (ví dụ, tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng không đáp ứng" được sử dụng để chỉ đối tượng có IBD (ví dụ, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng), mà không có sự cải thiện, hoặc có sự cải thiện hạn chế hoặc không đầy đủ, ở tình trạng bệnh lý lâm sàng sau khi điều trị bằng chất ức chế TNFα (ví dụ, thiếu sự giảm đi của CDAI, thiếu sự giảm đi của việc sử dụng corticosteroit). Theo một phương án, đối tượng không đáp ứng TNF là đối tượng có IBD mà không đạt được sự giảm 100 điểm hoặc lớn hơn của điểm Chỉ Số Hoạt TÍnh Bệnh Crohn (CDAI) sau khi điều trị bằng chất ức chế TNFα. Theo một phương án, đối tượng không đáp ứng là đối tượng có IBD mà không đạt được sự giảm 100 điểm hoặc lớn hơn của điểm Chỉ Số Hoạt TÍnh Bệnh Crohn (CDAI) trong khung thời gian cụ thể sau khi điều trị bằng chất ức chế TNFα.

I. Kháng thể Liên kết CD40 Của Người (hCD40)

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất các kháng thể được làm cho giống như của người có tính đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết CD40, bao gồm CD40 của người (hCD40). Các phương án khác của sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng ở chuột, hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết với CD40, cũng như là các kháng thể khảm có chứa vùng biến đổi của kháng thể kháng CD40 ở chuột được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, các kháng thể theo sáng chế là kháng thể kháng CD40 (ví dụ, kháng CD40 ở người) có tính đối kháng không có hoạt tính chủ vận đáng kể.

1. Kháng Thể Đối Kháng Kháng hCD40 Được làm cho giống như của người Có Nguồn Gốc từ Kháng Thể 1 (Ab1)

Sáng chế dựa trên, ít nhất là một phần, sự nhận diện của kháng thể kháng CD40 được làm cho giống như của người có đặc tính đối kháng và, theo các phương án nhất định, không có hoạt tính chủ vận đáng kể.

Như được mô tả trong ví dụ 1, đã xác định được ba kháng thể chuột kháng hCD40 đối kháng, *tức là,* Ab1 (trình tự VL được mô tả trong SEQ ID NO: 9 và trình tự VH được mô tả trong SEQ ID NO: 5), Ab2 (trình tự VL được mô tả trong SEQ ID NO: 76 và trình tự VH được mô tả trong SEQ ID NO: 75), và Ab3 (trình tự VL được mô tả trong SEQ ID NO: 48 và trình tự VH được mô tả trong SEQ ID NO: 44).

Các trình tự CDR liên ứng được xác định dựa trên sự sắp xếp thẳng hàng của các trình tự chuỗi axit amin của CDR của các kháng thể đối kháng ở chuột Ab1, Ab2, và Ab3. Các trình tự axit amin liên ứng đối với các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 VH lần lượt được mô tả trong SEQ ID NO 78, 79 và 80, và các trình tự axit amin liên ứng đối với các trình tự axit amin CDR1, CDR2 và CDR3 VL được lần lượt được mô tả trong SEQ ID NO. 108, 109 và 110. Tất cả các trình tự đều được mô tả dưới đây trong Bảng 5 và trên Hình 4.

Bảng 5. Sự Sắp Xếp Thẳng Hàng Trình Tự Axit Amin CDR Thể Lai Kháng CD40

	Thể lai	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
Chuỗi nặng (lần lượt là SEQ ID NO 45-47, 6-8, 6, 42, 8 và 78-80, theo thứ tự xuất hiện)	Ab3	GYTFTSYTMH	YINPSSDYPNYNQKFKD	WGYSFDY
	Ab1	GFTFSDYGMN	YISSGRSNIYYADTVKG	SWGYFDV
	Ab2	GFTFSDYGMN	YISSGRGNIYYADTVKG	SWGYFDV
	Liên ứng	**GFTFSDYGMN**	**YISSGRNIYYADTVKG**	**SWGYFDV**
		Y TS T H	NPSS YPN NQKFD	WGYS

Chuỗi nhẹ (lần lượt là SEQ ID NO 49-51, 10-12, 10-12 và 108-110, theo thứ tự xuất hiện)	Ab3 Ab1 Ab2 **Liên ứng**	RSSKSLLHS-NGNTYLY KSSQSLLNSGNQKNYLT KSSQSLLNSGNQKNYLT **KSSQSLLNSGNQKNYLT** R K H – GNT Y	RMSTLAS WASTRES WASTRES **WASTRES** RM LA	MQHLEYPLT QNDYTYPLT QNDYTYPLT **QNDYTYPLT** MQHLE

Trình tự axit amin liên ứng của miền CDR1 chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:78 (G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)). Trình tự axit amin liên ứng của miền CDR2 chuỗi nặng biến đổi như nêu trong SEQ ID NO:79 (YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S)(D/S/G)(N/Y)(I/P) (Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K) (V/F)K(G/D)). Trình tự axit amin liên ứng của miền CDR3 chuỗi nặng biến đổi được nêu trong SEQ ID NO:80 ((S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV).

Trình tự axit amin liên ứng của miền CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi được nêu trong SEQ ID NO:108 ((K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)). Trình tự axit amin liên ứng của miền CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi được nêu trong SEQ ID NO:109 ((W/R)(A/M) ST (R/L) (E/A)S). Trình tự axit amin liên ứng của miền CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi được nêu trong SEQ ID NO:110 ((Q/M)(N/Q) (D/H)(Y/L)(T/E)YPLT).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, chứa chuỗi nhẹ biến đổi chứa CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 108, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 109, CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 110, và bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 78, CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 79, CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 80.

Sau khi xác định các kháng thể chuột Ab1, Ab2, và Ab3, các kháng thể Ab1 và Ab3 được chọn để làm cho giống người (được mô tả dưới đây trong ví dụ 2). Bảng 11 và Bảng 12 cung cấp trình tự axit amin lần lượt của các vùng CDR, VH, và VL của Ab1 và Ab3 được làm cho giống như của người. Cụ thể, chín kháng thể được làm cho giống như của người khác nhau được tạo ra dựa trên Ab3 (xem ví dụ 2 và Bảng 12 dưới đây). Bốn kháng thể được làm cho giống như của người khác nhau dựa trên Ab1 cũng được tạo ra, bao gồm:

A) huAb1VH.1 / VL.1 (trình tự axit amin VH nêu trong SEQ ID NO: 13 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VH lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 6, 7, và 8; và trình tự axit amin VL nêu trong SEQ ID NO: 14 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VL lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 10, 11, và 12);

B) huAb1VH.1A/VL.1 (trình tự axit amin VH nêu trong SEQ ID NO: 15 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VH lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 6, 7, và 8; và trình tự axit amin VL nêu trong SEQ ID NO: 14 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VL lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 10, 11, và 12);

C) huAb1VH.1/VL.1A (trình tự axit amin VH nêu trong SEQ ID NO: 13 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VH lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 6, 7, và 8; và trình tự axit amin VL nêu trong SEQ ID NO: 16 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VL lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 10, 11, và 12); và

D) huAb1VH.1A/VL.1A (trình tự axit amin VH như nêu trong SEQ ID NO: 15 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VH lần lượt nêu trong các SEQ ID NO: 6, 7, và 8; trình tự axit amin VL như nêu trong SEQ ID NO: 16 và các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 VL lần lượt như nêu trong các SEQ ID NO: 10, 11, và 12).

Các phiên bản được làm cho giống như của người của Ab1 còn được cải biến để loại bỏ vị trí khử amit tiềm năng trong CDR1 chuỗi nhẹ. Sáu biến thể kháng thể huAb1 được phân tích, và bốn trong số các kháng thể này được nhận dạng là chất đối kháng của CD40. Sáu kháng thể này được đề cập đến trong bản mô tả này là Ab1v1, Ab1v2, Ab1v3, Ab1v4, Ab1v5, và Ab1v6 (CDR và trình tự biến đổi được nêu trong Bảng 13 dưới đây). Trong số sáu biến thể Ab1 được làm cho giống như của người, huAb1v1s được chọn dưới dạng có hoạt tính đối kháng đặc biệt tốt hơn. Trình tự biến đổi chuỗi

nặng của huAb1v1 được đề xuất trong SEQ ID NO: 15 cùng với các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt được mô tả trong các SEQ ID NO: 6, 7, và 8. Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của huAb1v1 được đề xuất trong SEQ ID NO: 20 cùng với các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt được mô tả trong các SEQ ID NO: 21, 11, và 12.

CDR2 Chuỗi nặng của kháng thể huAb1v1 còn được gây đột biến để thu được trong mười bảy biến thể (được mô tả dưới đây trong ví dụ 4). Các biến thể CDR2 chuỗi nặng huAb1v1 được đề cập trong bản mô tả này dưới dạng từ huAb1v1CDR2v1 đến huAb1v1CDR2v17. Các trình tự các chuỗi nặng từ huAb1v1CDR2v1 đến huAb1v1CDR2v17 được nêu trong Bảng 16, trong đó VH huAb1v1CDR2v7 được chọn làm dòng có hoạt tính đối kháng đặc biệt tốt hơn chống lại CD40, trong khi vẫn tương đối không có hoạt tính chủ vận. Trình tự biến đổi chuỗi nặng của huAb1v1CDR2v7 được đề xuất trong SEQ ID NO: 28 với các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt được mô tả trong các SEQ ID NO: 6, 42, và 8.

Sau khi chọn lọc VH huAb1v1CDR2v7 (VH của SEQ ID NO: 28 với các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt được mô tả trong các SEQ ID NO: 6, 42, và 8) và VL huAb1v1 (VL của SEQ ID NO: 20 cùng với các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 lần lượt được mô tả trong các SEQ ID NO: 21, 11, và 12), các vùng biến đổi được tách dòng vào hai nền IgG khác nhau dẫn đến hai kháng thể đối kháng kháng CD40, *tức là,* Ab101 và Ab102. Bảng 6 (và Bảng 19) đề xuất các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ cho phương án cụ thể của sáng chế liên quan tới các kháng thể IgG. Trong bảng 6, các vùng không đổi được gạch chân và các miền CDR được in đậm.

BẢNG 6: Kháng thể kháng CD40 Ab101 và Ab102 ở người và trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ của chúng

Ab	Trình Tự Chuỗi Nặng	HC SEQ ID NO:	Trình Tự Chuỗi Nhẹ	LC SEQ ID NO:
Ab101	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISS GRGNIYYADTVKG**RFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR**SWGYFDV**W GQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	39	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN C**KSSQSLLNRGNQKNYLT**WF QQKPGQPPKLLIY**WASTRES**G VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	40

Ab102	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISS** **GRGNIYYADTVKG**RFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR**SWGYFDV**W GQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDQLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHNHYT QKSLSLSPGK	41	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN C**KSSQSLLNRGNQKNYLT**WF QQKPGQPPKLLIY**WASTRES**G VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	40

Theo đó, theo một phương án, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:40 và chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: NO:39 (Ab101). Theo phương án thay thế, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng chứa chuỗi nhẹ có trình tự

axit amin như nêu trong SEQ ID NO:40 và chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: NO:41 (Ab102).

Do đó, sáng chế gồm kháng thể kháng CD40 ở chuột, khảm, và được làm cho giống như của người có hoạt tính đối kháng. Theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 12 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng có CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:6, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:42, CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:8, CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:21, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:11, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:12. Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo một phương án,kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41; và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39; và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40.

Kháng thể có trình tự axit amin (biến đổi hoặc CDR) được mô tả trong các Bảng 5, 6, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, và 19 được bao gồm trong sáng chế. Theo đó, theo một khía cạnh, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 10, 17, 19, hoặc 21; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12. Theo cách khác hoặc ở dạng kết hợp, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như

nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc 42; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 10; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 19; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 17; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 21; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 21; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 42; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 108; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 109; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 78; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 79; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO: 5, 13, 15, hoặc 22-38; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO: 9, 14, 16, 18, 20 hoặc 43.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:14, 16 hoặc 18.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:14, 16, 18, 20 hoặc 43.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 28 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 20.

Kháng thể được mô tả trong sáng chế này, cụ thể là kháng thể Ab102, có hoạt tính đối kháng mà không có hoạt tính chủ vận đối với CD40 đáng kể. Do đó, sáng chế bao gồm kháng thể liên kết với epitop được nhận diện bởi kháng thể Ab102 và Ab101. Theo một phương án cụ thể, sáng chế gồm kháng thể được phân lập, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết với CD40 ở người sao cho CD40 với kháng thể này, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, liên kết với epitop được xác định bởi các vùng định hình Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99, và Thr24-Cys37 của SEQ ID NO:1 bị ức chế từ liên kết với phối tử CD40 (CD40L). Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, có khả năng liên kết CD40 ở người mà liên kết với epitop trong CD40 ở người chứa ba, bốn, năm, sáu, bẩy,tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn, mười lăm, mười sáu, mười bẩy, mười tám, mười chín, hai mươi, hai mốt, hai hai, hai ba, hai tư, hai lăm, hai sáu, hai bẩy, hai tám, hai chín, ba mươi, ba mốt, ba hai, ba ba, ba tư hoặc tất cả gốc axit amin Cys62-Phe67 (Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66, Phe67), Gln79-Cys83 (Gln79, His 80, Lys81, Tyr82, Cys83), Arg90-Thr99 (Arg90, Val91, Gln92, Gln93, Lys94, Gly95, Thr96, Ser97, Glu98 và Thr99), và Thr24-Cys37 (Thr24, Ala25, Cys26, Arg27, Glu28, Lys29, Gln30, Tyr31, Leu32, Ile33, Asn34, Ser35, Gln36, Cys37) của SEQ ID NO:1.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vùng CDR2 chuỗi nặng có hoạt tính đối kháng chống lại CD40. Cụ thể là, gốc 55 (gốc X) của trình tự axit amin CDR2 VH YISSGRXNIYYADTVKG (SEQ ID NO: 112) được xác định là có vai trò trong việc làm tăng hoạt tính đối kháng của kháng thể so với trình tự CDR2 bố mẹ có gốc S55. Gốc Thr, Asp, Val, Leu, Ile, và Met ở vị trí 55 của CDR2 HC dẫn đến mức độ thấp hơn của hoạt tính đối kháng liên quan đến các axit amin khác ở vị trí 55. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 111 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11.

trình tự axit amin miền CDR1 và CDR3 mà có thể được kết hợp với SEQ ID NO: 111 trong chuỗi kháng thể nặng và nhẹ biến đổi của kháng thể được mô tả, bao gồm, ví dụ, Bảng 13 và Bảng 18.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vùng CDR1 chuỗi nhẹ có gốc được nhận dạng là chuyển đổi đối kháng/chủ vận. Như được mô tả dưới đây trong ví dụ 3, sự cải biến của motif "NS" của vùng CDR1 VL KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10) ở gốc "S" có thể dẫn đến kháng thể đối kháng chuyển đổi thành kháng thể chủ vận. Do đó, theo một phương án, sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD40 đối kháng có vùng VL CDR1 chứa SEQ ID NO: 113 (KSSQSLLNXGNQKNYLT; trong đó X không phải là gốc axit amin Pro).

Thuật ngữ "kháng thể cạnh tranh" ở đây dùng để chỉ số lượng kháng thể bất kỳ hướng đích vào cùng một phân tử hoặc được liên kết ổn định nhưng không cộng hóa trị với thực thể siêu phân tử, tốt hơn là cùng một phân tử, *tức là*, CD40, trong đó ít nhất một phân tử có khả năng làm giảm một cách đặc hiệu liên kết có thể đo được của nhau, tốt hơn là bằng cách cản trở không gian sự tiếp cận của chất khác đến epitop đích của nó (được mô tả ở trên) hoặc bằng cách gây ra và/hoặc làm ổn định cấu hình trong thực thể đích mà làm giảm ái lực của đích đối với kháng thể khác, tốt hơn là bằng cách phong bế trực tiếp sự tiếp cận đến epitop đích của phân tử kia bằng cách liên kết với epitop trong vùng lân cận đủ gần với khu vực trước, gối lên nhau hoặc giống hệt nhau, cụ thể là giống hệt nhau. Hai epitop trong bản mô tả này được gọi là "chồng lên nhau" nếu chúng chia sẻ một phần cấu trúc hóa học của chúng, tốt hơn là trình tự axit amin của chúng, và " giống hệt nhau", nếu cấu trúc hóa học của chúng, tốt hơn là trình tự axit amin của chúng, là giống hệt nhau.

Theo phương án cụ thể, kháng thể cạnh tranh, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà cạnh tranh với kháng thể bất kỳ có mặt trong đó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể cạnh tranh có thể cạnh tranh với các kháng thể được mô tả ở đây (ví dụ, Ab101 hoặc Ab102) và liên kết với epitop định hình của CD40 của người bao gồm các gốc Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 và Thr24-Cys37.

Theo phương án cụ thể, kháng thể chủ vận có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 74; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể chủ vận bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm (a) CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 17; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 chủ vận, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO: 15 hoặc 13; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO: 77 hoặc 43.

2. Kháng Thể Kháng CD40 Được làm cho giống như của người Được Tạo Dẫn Xuất Từ Kháng Thể 3 (Ab3)

Trình tự axit amin cho các phiên bản được làm cho giống như của người của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Ab3 ở chuột được nêu ở Bảng 11 dưới đây. Do đó, sáng chế còn bao gồm các kháng thể có chứa các trình tự biến đổi và/hoặc CDR từ kháng thể 3 (Ab3).

Theo một khía cạnh, sáng chế này đề xuất kháng thể được làm cho giống như của người, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 49; (b) CDR2 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 50; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 46; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47.

Theo đó, theo một khía cạnh, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:49; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 50; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51. Theo cách khác hoặc ở dạng kết hợp, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 45; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 46; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO: 44, 52, 54 hoặc 55; và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong các SEQ ID NO: 48, 53, 56 hoặc 57.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 44 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 48.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:53, 56 hoặc 57.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:53, 56 hoặc 57.

Theo phương án khác, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, gồm vùng biến đổi chuỗi nặng gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:53, 56 hoặc 57.

3. Kháng Thể khảm Kháng CD40

Kháng thể khảm là phân tử trong đó các phần khác nhau của kháng thể được tạo dẫn xuất từ các loài động vật khác nhau, chẳng hạn như kháng thể có vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng chuột và vùng không đổi globulin miễn dịch ở người. Các phương pháp sản xuất kháng thể khảm là đã biết trong lĩnh vực. Xem ví dụ, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Patent Mỹ số 5,807,715; 4,816,567; và 4,816,397, được kết hợp ở đây để tham khảo. Ngoài ra, các kỹ thuật được phát triển để sản xuất "kháng thể khảm" (Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature* 314:452-454, mỗi tài liệu này được kết hợp vào đây để tham khảo) bằng cách nối các gen từ phân tử kháng thể chuột có tính đặc hiệu kháng nguyên thích hợp cùng với các gen từ phân tử kháng thể người có hoạt tính sinh học thích hợp có thể được sử dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:10; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 42; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:76 và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:75.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:49; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 50; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 45; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 46; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47. Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi

nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44.

Theo khía cạnh khác, sáng chế hướng tới kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:10; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 11; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 7; và (c) CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8. Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng CD40 đối kháng, phần liên kết kháng nguyên của chúng, có vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9 và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5.

Trình tự CDR của kháng thể kháng CD40 được phân lập được nêu trên thiết lập họ kháng thể CD40 mới, hoặc phần liên kết của chúng, được phân lập theo sáng chế này, và bao gồm các kháng thể mà bao gồm các trình tự CDR được liệt kê trong các Bảng 5, 11-13, và 15-18. Để tạo ra và chọn các CDR theo sáng chế có hoạt tính liên kết và/hoặc trung hòa CD40 được ưu tiên đối với hCD40, các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực để tạo ra các kháng thể theo sáng chế và đánh giá các đặc tính liên kết và/hoặc trung hòa CD40 của các kháng thể này có thể được sử dụng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả cụ thể ở đây.

4. Xác định đặc điểm kháng thể theo sáng chế

Các kháng thể kháng CD40 theo sáng chế này là các kháng thể đối kháng và có thể thể hiện khả năng làm giảm hoặc trung hòa hoạt tính CD40 cao, ví dụ, như được đánh giá bởi thử nghiệm bất kỳ trong một vài thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và như được mô tả trong sáng chế này. Theo phương án nhất định, kháng thể kháng CD40 theo sáng chế có hoạt tính đối kháng và về cơ bản không có hoạt tính chủ vận. Hoạt tính đối kháng và chủ vận được xác định bởi thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực, bao gồm các thử nghiệm được mô tả trong sáng chế này. ví dụ, sự liên kết với CD40 ở người và sự ức chế của tương tác CD40-CD40L có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu hiện CD40 ở người thông qua phân tích FACS.

Theo một phương án, hoạt tính đối kháng hoặc chủ vận CD40 của kháng thể kháng CD40 được xác định bằng cách sử dụng dòng tế bào báo cáo. ví dụ, hoạt tính đối kháng và chủ vận có thể được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào báo cáo CD40 biểu hiện CD40 ở người được liên kết với NFkB qua trung gian phosphataza kiềm (AP). Khi tín hiệu nhận được thông qua CD40, sự hoạt hóa NFkB dẫn đến sự tiết AP được đo bằng nền đo màu. Một thử nghiệm đối kháng ví dụ là, dòng báo cáo CD40 có thể được nuôi cấy với dòng tế bào Jurkat biểu hiện CD40L (để tạo ra tương tác phối tử sinh lý) hoặc với CD40L hòa tan, trong đó khả năng của kháng thể kháng CD40 để phong bế tín hiệu NFkB (từ ít đến không có mặt AP như được xác định bằng các phương pháp chuẩn) có thể được đánh giá. Một thử nghiệm chủ vận ví dụ là, dòng tế bào báo cáo CD40 ở người có thể được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 và tín hiệu NFkB được đo (nhìn thấy dưới dạng sự có mặt của AP ở trên đối chứng âm) như được mô tả ở trên. ví dụ về dòng tế bào báo cáo CD40 là Tế bào CD40L HEK-Blue™ (InvivoGen), dùng để đo hoạt tính sinh học của CD40L thông qua sự bài tiết phosphataza kiềm phôi (SEAP) khi hoạt hóa NF-κB sau khi kích thích CD40. Tương tác CD40L-CD40 có thể được theo dõi bằng cách đánh giá hàm lượng SEAP bằng QUANTI-Blue (InvivoGen).

Theo một phương án, kháng thể đối kháng kháng CD40, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế có IC50 bằng 0,4 nM hoặc nhỏ hơn, như xác định được bằng thử nghiệm báo cáo CD40L hòa tan đối kháng. Theo một phương án, kháng thể đối kháng kháng CD40, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế có IC50 bằng 51 nM hoặc nhỏ hơn, như xác định được bằng thử nghiệm báo cáo CD40 đối kháng trong dòng tế bào Jurkat. Theo một phương án, kháng thể đối kháng kháng CD40, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, của sáng chế có IC50 bằng 3,4 nM hoặc nhỏ hơn, như xác định được bằng thử nghiệm báo cáo CD40 đối kháng trong dòng tế bào Jurkat. Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, của sáng chế có IC50 bằng 0,9 nM hoặc nhỏ hơn, như xác định được bằng thử nghiệm báo cáo CD40 đối kháng trong dòng tế bào Jurkat.

Theo một phương án, hoạt tính đối kháng hoặc chủ vận CD40 của kháng thể kháng CD40 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm chủ vận tế bào B. ví dụ, thử nghiệm chủ vận tế bào B có thể được sử dụng trong đó tế bào B được hoạt hóa với liều

lượng thấp kháng-IgM và IL4, trước khi bổ sung kháng thể đối kháng kháng CD40. Sự tăng cường của sự hoạt hóa tế bào B có thể được đo dưới dạng sự điều hòa tăng của CD86, mà đến lượt nó là dấu hiệu của hoạt tính chủ vận. Tương tự, thử nghiệm đối kháng tế bào B có thể được sử dụng, trong đó các tế bào B ở người sơ cấp được nuôi cấy với dòng tế bào T ở người biểu hiện CD40L mà dẫn đến sự hoạt hóa tế bào B và sự điều hòa tăng của sự biểu hiện CD86 thông qua sự tương tác CD40/CD40L. Sự ức chế của sự điều hòa tăng CD86 của tế bào B ở người sơ cấp là dấu hiệu của hoạt tính đối kháng.

Theo một phương án, hoạt tính đối kháng hoặc chủ vận CD40 của kháng thể kháng CD40 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Các hoạt tính đối kháng và chủ vận được đánh giá bởi khả năng của kháng thể để làm trung gian cho ADCC. Kháng thể CD40 đối kháng sẽ là chất trung gian hữu hiệu của ADCC, trong khi kháng thể chủ vận sẽ không có hoạt tính ADCC. Tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) dùng để chỉ một dạng gây độc tế bào gây ra do sự hoạt hóa các đại thực bào, các tế bào NK, các tế bào bạch cầu trung tính, v.v., mà nhận biết các tế bào đích bằng cách liên kết với miền không đổi của kháng thể thông qua các thụ thể Fc được biểu hiện trên bề mặt của chúng. Tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) dùng để chỉ một dạng gây độc tế bào gây ra do sự hoạt hóa hệ thống bổ thể mà xảy ra thông qua sự liên kết kháng thể với kháng nguyên. Sự giảm hoạt tính ADCC và CDC có nghĩa là sự giảm của các hoạt tính này so với, ví dụ, kháng thể đối kháng kháng CD40 đối chứng chẳng hạn như kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi thể lai 4D11 (Mã Số Nộp Lưu FERM BP-7758). EP1707627B1, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn, mô tả các thử nghiệm để xác định hoạt tính ADCC và CDC.

Ngoài ra, hoạt tính sinh học của các tế bào phân nhánh (DC) được kích thích bằng Ab kháng CD40 bất động có thể được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính chủ vận. Các DC được cho là tế bào trình diện kháng nguyên mạnh nhất mà có khả năng thu nhận Ag trong các mô không phải dạng lympho và mang chúng tới các cơ quan bạch huyết thứ cấp tới các tế bào T sơ khai để đáp ứng các kích thích trưởng thành như các tín hiệu nguy hiểm và trợ giúp. Ngược lại, việc trình diện của các Ag bởi các DC mà không có sự hoạt hóa dẫn đến việc loại bỏ các tế bào T tác động mà có TCR cùng nguồn gốc hoặc

cảm ứng các tế bào T điều tiết trong các mô bạch huyết thứ cấp. Do đó, sự có mặt hoặc không có mặt của các tín hiệu trưởng thành đối với các DC chưa trưởng thành trong các mô ngoại vi đóng vai trò làm sự chuyển đổi để gây ra đáp ứng miễn dịch thích ứng hoặc dung chịu. Tín hiệu giúp đỡ tế bào T CD4 + chủ yếu cho sự trưởng thành của DC được cung cấp bởi sự tương tác giữa CD40 được biểu hiện trên DC và phối tử CD40 (L) trên tế bào T CD4+ được hoạt hóa. Do đó, sự kích thích CD40 sẽ dẫn đến sự di chuyển của DC vào các mô bạch huyết thứ cấp bằng cách điều hòa tăng sự biểu hiện của CCR7. Watanabe *et al.* 2003 *J Immunol*; 171:5828-5836 mô tả các thử nghiệm có thể được sử dụng để xác định xem các kháng thể kháng CD40 có thể hoạt hóa DC hay không để xác định hoạt tính chủ vận và hoạt tính đối kháng. Các thử nghiệm ví dụ này bao gồm việc xác định sự biểu hiện của Ag MHC lớp I / II và các phân tử đồng kích thích trên BM-DC được kích thích bằng Ab kháng CD40 được cố định, hoạt tính di chuyển *in vivo* của BM-DC được kích thích bằng Ab kháng CD40 được cố định, hoạt tính di chuyển *in vitro* và sự biểu hiện CCR7 của BM-DC được kích thích bằng Ab kháng CD40 được cố định.

Theo một phương án, hoạt tính chủ vận của kháng thể kháng CD40, phần liên kết kháng nguyên của chúng, được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân *in vitro*, chẳng hạn như thử nghiệm được mô tả dưới đây trong ví dụ 7 Thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân *in vitro* bao gồm việc bộc lộ các bạch cầu đơn nhân với kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, nếu kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, là chất hoạt hóa của CD40 (chất chủ vận) thì có sự tăng lên thu được của sự sản xuất TNF. Bằng cách sử dụng thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân *in vitro* , kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận sẽ dẫn đến sự vắng mặt hoặc sản xuất ở mức tối thiểu TNF, như được mô tả trong ví dụ 7.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 đối kháng, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận có hoạt tính nằm trong độ lệch chuẩn của đối chứng âm trong thử nghiệm chủ vận CD40 *in vitro*, ví dụ, thử nghiệm bạch cầu đơn nhân chất chủ vận được mô tả trong ví dụ 7.

Các thử nghiệm chất chủ vận được mô tả thêm ở US 5786456, US2011 / 0243932 và EP1707627B1, mỗi tài liệu trong số chúng được kết hợp bằng cách viện dẫn. Các thử nghiệm đối kháng để kiểm tra chức năng kháng thể được mô tả thêm ở US 7361345,

US2011 / 0243932 và EP1707627B1, mỗi trong số chúng được kết hợp bằng cách viện dẫn trong bản mô tả này.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể được phân lập, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với CD40 ở người, trong đó kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, tách ra từ CD40 của người với hằng số tốc độ k_{off} bằng khoảng 0,1 giây^{-1} hoặc nhỏ hơn, được xác định bởi phép cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc ức chế hoạt tính của CD40 ở người với IC_{50} bằng khoảng 1 x 10^{-6}M hoặc nhỏ hơn. Theo cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể tách ra từ CD40 của người với hằng số tốc độ k_{off} bằng khoảng 1 x 10^{-2}giây^{-1} hoặc nhỏ hơn, được xác định bằng phép cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế hoạt động của CD40 ở người với IC_{50} bằng khoảng 1 x 10^{-7}M hoặc nhỏ hơn. Theo cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể tách ra từ CD40 của người với hằng số tốc độ k_{off} bằng khoảng 1 x 10^{-3} giây^{-1} hoặc nhỏ hơn, được xác định bằng phép cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế CD40 ở người với IC_{50} bằng khoảng 1 x 10^{-8}M hoặc nhỏ hơn. Theo cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể tách ra từ CD40 của người với hằng số tốc độ k_{off} bằng khoảng 1 x 10^{-4} giây^{-1} hoặc nhỏ hơn, được xác định bằng phép cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế hoạt tính CD40 với IC_{50} bằng khoảng 1 x 10^{-9}M hoặc nhỏ hơn. Theo cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể tách ra từ CD40 của người với hằng số tốc độ k_{off} bằng khoảng 1 x 10^{-5} giây^{-1} hoặc nhỏ hơn, được xác định bằng phép cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế CD40 với IC_{50} bằng khoảng 1 x 10^{-10}M hoặc nhỏ hơn. Theo cách khác, kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể tách ra từ CD40 của người với hằng số tốc độ k_{off} bằng khoảng 1 x 10^{-5} giây^{-1} hoặc nhỏ hơn, được xác định bằng phép cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc có thể ức chế hoạt tính CD40 với IC_{50} bằng khoảng 1 x 10^{-11}M hoặc nhỏ hơn.

Các kháng thể được làm cho giống như của người như mô tả trong các ví dụ dưới đây. Các đột biến ngược khung được đưa vào các trình tự kháng thể ghép với CDR bằng phương pháp tổng hợp *de novo* của miền biến đổi hoặc bằng các đoạn mồi oligonucleotit gây đột biến và phản ứng chuỗi polymeraza, hoặc cả hai cho phép các dạng kết hợp khác nhau của các đột biến ngược và các đột biến khác cho mỗi đoạn ghép CDR. Các vùng

biến đổi được làm cho giống như của người của các kháng thể CD40 đơn dòng ở chuột được tách dòng vào các vật truyền biểu hiện IgG để xác định đặc điểm chức năng.

Theo phương án nhất định, kháng thể bao gồm vùng không đổi chuỗi nặng, như vùng không đổi IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD. Tốt hơn là, vùng không đổi chuỗi nặng là vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 hoặc vùng không đổi chuỗi nặng IgG4. Ngoài ra, kháng thể có thể có chứa một vùng không đổi chuỗi nhẹ, hoặc là vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa hoặc vùng không đổi chuỗi nhẹ lamda. Tốt hơn là, kháng thể có chứa vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa. Theo cách khác, kháng thể có thể là, ví dụ, mảnh Fab hoặc mảnh Fv chuỗi đơn.

5. Tạo ra kháng thể kháng CD40 được làm cho giống như của người

Như được mô tả ở trên, các kháng thể được làm cho giống như của người là các phân tử kháng thể từ các loài không phải là người mà liên kết với kháng nguyên mong muốn có một hoặc nhiều vùng quyết định bổ sung (CDR) từ các loài không phải là người và các vùng khung từ phân tử globulin miễn dịch ở người. Các trình tự Ig của người đã biết được bộc lộ, ví dụ, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez- /query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH- 05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.- html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html- ; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin- ks.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP- Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu- blic/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;

www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), tất cả được kết hợp ở đây để tham khảo. Các trình tự nhập vào này có thể được sử dụng để làm giảm khả năng miễn dịch hoặc làm giảm, tăng cường hoặc cải biến sự liên kết, ái lực, tốc độ on, tốc độ off, tính khả năng bám, độ đặc hiệu, thời gian bán thải, hoặc đặc tính thích hợp khác bất kỳ, như đã biết trong lĩnh vực.

Các gốc khung trong vùng khung của người có thể được thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể cho CDR để làm thay đổi, tốt hơn là cải thiện, sự liên kết kháng nguyên. Các sự thế khung được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, bằng cách tạo mô hình tương tác của CDR và gốc khung để xác định gốc khung quan trọng đối với việc liên kết kháng nguyên và so sánh trình tự để xác định các gốc khung bất thường tại các vị trí cụ thể. (Xem, ví dụ, Queen *et al.*, Patent Mỹ số 5,585,089; Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988), toàn bộ được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Các mô hình globulin miễn dịch ba chiều thường có sẵn và quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các chương trình máy tính có sẵn mà minh hoạ và hiển thị các cấu trúc định dạng ba chiều có thể xảy ra của các trình tự globulin miễn dịch quan tâm được chọn. Việc kiểm tra các hiển thị này cho phép phân tích vai trò có thể có của các gốc trong việc thực hiện chức năng của trình tự globulin miễn dịch, *tức là*, phân tích các gốc ảnh hưởng đến khả năng của globulin miễn dịch quan tâm để liên kết với kháng nguyên của nó. Bằng cách này, các gốc FR có thể được lựa chọn và kết hợp từ các trình tự liên ứng và nhập vào để đạt được đặc tính kháng thể mong muốn, chẳng hạn như tăng ái lực đối với (các) kháng nguyên đích. Nhìn chung, gốc CDR trực tiếp và đáng kể nhất tham gia vào sự ảnh hưởng đến sự liên kết kháng nguyên. Các kháng thể có thể được làm cho giống như của người bằng cách sử dụng một loạt các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như nhưng không chỉ giới hạn ở các kỹ thuật

được mô tả trong Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia và Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, PNAS 91:969-973 (1994); PCT publication WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Patent Mỹ số 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4.816.567, tất cả được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn, bao gồm các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này.

Các ví dụ về các kháng thể được làm cho giống như của người kháng CD40 được đề xuất ở các Phần 1 và 2 ở trên và trong các ví dụ dưới đây.

II. Sản xuất kháng thể và sản xuất dòng tế bào sản xuất kháng thể

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong một số lượng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

1. Kháng thể đơn dòng kháng CD40 bằng cách sử dụng công nghệ lai tế bào

Các kháng thể đơn dòng có thể được điều chế bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này bao gồm việc sử dụng công nghệ lai, tái tổ hợp và hiển thị phagơ, hoặc dạng kết hợp của chúng. ví dụ, các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật lai bao gồm các kỹ thuật đã biết và được hướng dẫn trong lĩnh vực này, ví dụ, trong Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, *et al.*, in: Các kháng thể đơn dòng và thể lai tế bào T 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (tài liệu đã nêu được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn). Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" được sử dụng ở đây không chỉ giới hạn ở các kháng thể được tạo ra thông qua công nghệ lai. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" dùng để chỉ kháng thể có nguồn gốc từ một dòng đơn lẻ, bao gồm

dòng tế bào nhân chuẩn, nhân sơ, hay phagơ bất kỳ, và không phải phương pháp sản xuất nó.

Các phương pháp để sản xuất và sàng lọc kháng thể đặc hiệu bằng cách sử dụng công nghệ lai là thông thường và đã biết trong lĩnh vực. Theo một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra các kháng thể đơn dòng cũng như các kháng thể được tạo ra bằng phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào lai tiết ra kháng thể theo sáng chế mà, tốt hơn là, tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào lách được phân lập từ chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên theo sáng chế với tế bào u tủy và sau đó sàng lọc thể lai thu được từ sự dung hợp đối với các dòng tế bào lai mà tiết ra kháng thể có thể liên kết với polypeptit theo sáng chế (Xem ví dụ 1). Tóm lại, chuột có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên CD40. Theo phương án được ưu tiên, kháng nguyên CD40 được dùng với chất bổ trợ để kích thích đáp ứng miễn dịch. Các chất bổ trợ này bao gồm chất bổ trợ Freund đầy đủ hoặc không đầy đủ, RIBI (muramyl đipeptit) hoặc ISCOM (phức hợp kích thích miễn dịch). Các chất bổ trợ này có thể bảo vệ polypeptit khỏi sự phân tán nhanh bằng cách cô lập nó trong một chất lắng cục bộ hoặc chúng có thể chứa các chất kích thích vật chủ tiết ra các yếu tố gây ra có tính hóa chất đối với đại thực bào và các thành phần khác của hệ miễn dịch. Tốt hơn là, nếu polypeptit được sử dụng, kế hoạch gây miễn dịch sẽ bao gồm hai hoặc nhiều lần sử dụng polypeptit, trải ra trong vài tuần.

Sau khi gây miễn dịch con vật bằng kháng nguyên CD40, kháng thể và/hoặc tế bào sản xuất kháng thể có thể thu được từ con vật này. Huyết thanh chứa kháng thể kháng CD40 thu được từ con vật này bằng cách lấy máu hoặc giết chết con vật. Huyết thanh có thể được sử dụng khi thu được nó từ con vật, một phân đoạn globulin miễn dịch có thể thu được từ huyết thanh, hoặc các kháng thể kháng CD40 có thể được tinh chế từ huyết thanh. Huyết thanh hoặc globulin miễn dịch thu được theo cách này là đa dòng, do đó có dãy tính chất không đồng nhất.

Khi đáp ứng miễn dịch được phát hiện, ví dụ, các kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên CD40 được phát hiện trong huyết thanh chuột, thu lấy lách chuột và phân lập tế bào lách. Các tế bào lách sau đó được dung hợp bằng các kỹ thuật đã biết với các tế bào u tủy thích hợp bất kỳ, ví dụ các tế bào từ dòng tế bào SP20 có sẵn từ ATCC. Các thể lai được chọn lọc và tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Các dòng lai sau đó

được thử nghiệm bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực đối với các tế bào tiết ra kháng thể có khả năng liên kết CD40. Dịch Ascites, thường chứa hàm lượng kháng thể cao, có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột có dòng tế bào lai dương tính.

Theo phương án khác, các tế bào lai bất tử sản xuất kháng thể có thể được điều chế từ con vật được gây miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch, con vật bị giết chết và các tế bào B ở lách được dung hợp với các tế bào u tủy bất tử như đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Harlow and Lane, *supra.* Theo phương án được ưu tiên, các tế bào u tủy không tiết ra các polypeptit globulin miễn dịch (dòng tế bào không tiết). Sau khi dung hợp và chọn lọc kháng sinh, các thể lai được sàng lọc bằng cách sử dụng CD40, hoặc phần của nó, hoặc tế bào biểu hiện CD40. Theo phương án được ưu tiên, sàng lọc ban đầu được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch liên kết enzym (ELISA) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), tốt hơn là ELISA. ví dụ về sàng lọc ELISA được đề xuất trong WO 00/37504, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các thể lai sản xuất kháng thể kháng CD40 được lựa chọn, tách dòng và sàng lọc thêm về các đặc tính mong muốn, bao gồm sự sinh trưởng thể lai mạnh mẽ, sự sản xuất kháng thể ở mức độ cao và đặc tính kháng thể mong muốn, như được thảo luận thêm dưới đây. Thể lai có thể được nuôi cấy và mở rộng *in vivo* trong động vật sinh sản hữu tính, ở động vật thiếu hệ thống miễn dịch, ví dụ, chuột trụi lông, hoặc trong môi trường nuôi cấy tế bào *in vitro.* Các phương pháp chọn lọc, tách dòng và mở rộng thể lai đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Theo một phương án được ưu tiên, các thể lai là thể lai chuột, như được mô tả ở trên. Theo phương án ưu tiên khác, thể lai được sản xuất ra ở các loài không phải là người, không phải là chuột nhắt chẳng hạn như chuột, cừu, lợn, dê, gia súc hoặc ngựa. Theo phương án khác, thể lai là thể lai người, trong đó u tủy không tiết ở người được dung hợp với tế bào ở người biểu hiện kháng thể kháng CD40.

Mảnh kháng thể được nhận diện epitop đặc hiệu có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. ví dụ, mảnh Fab và F(ab')2 theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách phân cắt bằng cách phân giải protein đối với phân tử globulin miễn dịch, bằng cách sử dụng enzym như papain (để tạo ra mảnh Fab) hoặc pepsin (để tạo ra mảnh F(ab')2).

Mảnh F(ab')2 chứa vùng biến đổi, vùng không đổi chuỗi nhẹ và miền CHI của chuỗi nặng.

2. Kháng thể đơn dòng kháng CD40 bằng cách sử dụng SLAM

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, kháng thể tái tổ hợp được tạo ra từ các tế bào lympho đơn lẻ, được phân lập bằng cách sử dụng quy trình đã biết trong lĩnh vực như phương pháp kháng thể tế bào lympho được chọn lọc (SLAM), như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,627,052, công bố PCT WO 92/02551 và Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. Trong phương pháp này, các tế bào đơn lẻ tiết ra kháng thể quan tâm, ví dụ, các tế bào lympho có nguồn gốc từ động vật bất kỳ trong số các động vật được gây miễn dịch được mô tả trong Phần 1, được sàng lọc bằng cách sử dụng thử nghiệm mảng tan máu đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng nguyên CD40, một tiểu đơn vị của CD40, hoặc mảnh của nó, được ghép đôi với tế bào hồng cầu cừu bằng cách sử dụng yếu tố liên kết, chẳng hạn như biotin, và được sử dụng để xác định các tế bào đơn lẻ tiết ra kháng thể có độ đặc hiệu đối với CD40. Sau khi xác định các tế bào tiết kháng thể quan tâm, cADN vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được giải phóng từ tế bào bằng PCR phiên mã ngược và sau đó các vùng biến đổi này có thể được biểu hiện, trong bối cảnh của các vùng không đổi globulin miễn dịch thích hợp (ví dụ, các vùng không đổi của người), trong tế bào chủ động vật có vú, chẳng hạn như tế bào COS hoặc CHO. Tế bào chủ được chuyển nạp bằng các trình tự globulin miễn dịch được khuếch đại, có nguồn gốc từ tế bào lympho được chọn lọc *in vivo*, sau đó có thể trải qua phân tích và chọn lọc *in vitro* thêm, ví dụ bằng cách phân tích khối lượng các tế bào được chuyển nạp để phân lập các tế bào biểu hiện kháng thể đối với CD40. Các trình tự globulin miễn dịch được khuếch đại có thể còn được thao tác *in vitro*, chẳng hạn như bằng phương pháp trưởng thành ái lực *in vitro* chẳng hạn như các phương pháp được mô tả trong Công bố PCT WO 97/29131 và Công bố PCT WO 00/56772.

3. Kháng thể đơn dòng kháng CD40 bằng cách sử dụng động vật chuyển gen

Theo một phương án khác của sáng chế, các kháng thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật không phải ở người có chứa một số, hoặc tất cả, các locut globulin miễn dịch ở người bằng kháng nguyên CD40. Theo một phương án được ưu tiên, động vật không phải là người là chuột chuyển gen XENOMOUSE, là chủng chuột được thiết

kế mà có chứa các mảnh lớn các locut globulin miễn dịch của người và thiếu hụt sự sản xuất kháng thể chuột. *Xem, ví dụ,* Green *et al. Nature Genetics* 7:13-21 (1994) và Các Patent Mỹ số 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 và 6,130,364. Cũng xem WO 91/10741, được công bố ngày 25 tháng 7 năm 1991, WO 94/02602, được công bố ngày 3 tháng 2 năm 1994, WO 96/34096 và WO 96/33735, cả hai được công bố ngày 31 tháng 10 năm 1996, WO 98/16654, công bố ngày 23 tháng 4 năm 1998, WO 98/24893, được công bố ngày 11 tháng 6 năm 1998, WO 98/50433, được công bố ngày 12 tháng 11 năm 1998, WO 99/45031, được công bố ngày 10 tháng 9 năm 1999, WO 99/53049, công bố ngày 21 tháng 10 năm 1999, WO 00 09560, công bố ngày 24 tháng 2 năm 2000 và WO 00/037504, công bố ngày 29 tháng 6 năm 2000. Chuột chuyển gen XENOMOUSE sản xuất ra danh mục ở người giống người lớn của các kháng thể ở người đầy đủ, và tạo ra Mab ở người đặc hiệu kháng nguyên. Chuột chuyển gen XENOMOUSE chứa xấp xỉ 80% lượng danh mục kháng thể của người thông qua việc đưa vào các mảnh YAC cấu hình dòng mầm, kích thước megabazơ của các locut chuỗi nặng của người và các locut chuỗi nhẹ x của người. Xem Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), các tài liệu bộc lộ này được kết hợp ở đây chỉ để tham khảo.

4. Kháng thể đơn dòng kháng CD40 bằng cách sử dụng thư viện kháng thể tái tổ hợp

Phương pháp *in vitro* cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế, trong đó thư viện kháng thể được sàng lọc để nhận dạng kháng thể có độ đặc hiệu liên kết mong muốn. Các phương pháp sàng lọc của các thư viện kháng thể tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực và bao gồm các phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Ladner *et al.* Patent Mỹ số 5,223,409; Kang *et al.* Công bố PCT Số WO 92/18619; Dower *et al.* Công bố PCT Số WO 91/17271; Winter *et al.* Công bố PCT Số WO 92/20791; Markland *et al.* Công bố PCT Số WO 92/15679; Breitling *et al.* Công bố PCT Số WO 93/01288; McCafferty *et al.* Công bố PCT Số WO 92/01047; Garrard *et al.* Công bố PCT Số WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991)

Nature 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; và Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, Công bố đơn sáng chế Mỹ 20030186374, và Công bố PCT Số WO 97/29131, nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Thư viện kháng thể tái tổ hợp có thể là từ đối tượng được gây miễn dịch bằng CD40, hoặc phần của CD40, chẳng hạn như miền ngoại bào. Ngoài ra, thư viện kháng thể tái tổ hợp có thể là từ đối tượng nguyên bản, *tức là*, đối tượng chưa được gây miễn dịch bằng CD40, chẳng hạn như thư viện kháng thể của người từ đối tượng người chưa được gây miễn dịch bằng CD40 ở người. Kháng thể theo sáng chế được chọn bằng cách sàng lọc thư viện kháng thể tái tổ hợp bằng peptit chứa CD40 của người để bằng cách đó chọn ra các kháng thể nhận biết CD40. Các phương pháp tiến hành sàng lọc và lựa chọn như vậy đã biết trong lĩnh vực, như được mô tả trong các tài liệu tham khảo ở đoạn trước. Để chọn các kháng thể theo sáng chế có ái lực liên kết cụ thể đối với hCD40, chẳng hạn như các kháng thể mà phân ly từ CD40 ở người với hằng số tốc độ k_{off} cụ thể, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt đã biết có thể được sử dụng để chọn các kháng thể có hằng số tốc độ k_{off} mong muốn. Để chọn các kháng thể theo sáng chế có hoạt tính trung hòa cụ thể đối với hCD40, chẳng hạn như kháng thể có $IC_{50\ cụ\ thể}$, các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực để đánh giá sự ức chế của hoạt tính hCD40 có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết với CD40 của người. Tốt hơn là, kháng thể là kháng thể trung hòa. Theo các phương án khác nhau, kháng thể là kháng thể tái tổ hợp hoặc kháng thể đơn dòng.

Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp hiển thị phagơ khác nhau đã biết trong lĩnh vực. Trong phương pháp hiển thị phagơ, các miền kháng thể chức năng được hiển thị trên bề mặt của hạt phagơ mà mang các trình tự polynucleotit mã hoá cho chúng. Cụ thể, phagơ này có thể được sử dụng để hiển thị các miền liên kết kháng nguyên được biểu hiện từ danh mục hoặc thư viện kháng thể tái tổ hợp (ví dụ, ở người hoặc ở chuột). Phagơ biểu hiện miền liên kết kháng nguyên mà liên kết với kháng nguyên quan tâm có thể được chọn hoặc được

xác định bằng kháng nguyên, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng nguyên được gắn nhãn hoặc kháng nguyên được liên kết hoặc được bắt giữ vào bề mặt hoặc hạt rắn. Phagơ được sử dụng trong các phương pháp này thường là phagơ sợi, bao gồm các miền liên kết fd và M13 được biểu hiện từ phagơ với các miền kháng thể Fab, Fv hoặc Fv được làm ổn định bằng đisunfua được dung hợp theo cách tái tổ hợp với gen phagơ III hoặc protein gen VIII. Các ví dụ về phương pháp hiển thị phagơ mà có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể trong sáng chế bao gồm các phương pháp được bộc lộ trong tài liệu Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); Đơn PCT Số PCT/GB91/01134; Các Công bố PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; và Patent Mỹ số 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780, 225; 5,658,727; 5,733,743 và 5,969,108; mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Như được mô tả trong các tài liệu tham khảo nêu trên, sau khi chọn lọc phagơ, các vùng mã hóa cho kháng thể từ phagơ có thể được phân lập và được sử dụng để tạo ra kháng thể nguyên vẹn bao gồm kháng thể của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mong muốn khác bất kỳ, và được biểu hiện ở vật chủ mong muốn bất kỳ, bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, nấm men và vi khuẩn, ví dụ, như được mô tả chi tiết dưới đây. ví dụ, các kỹ thuật để sản xuất tái tổ hợp các mảnh Fab, Fab 'và F(ab')2 cũng có thể được dùng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong kỹ thuật, chẳng hạn như các kỹ thuật đã được bộc lộ trong Công bố PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); and Sawai *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); và Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988) (các tài liệu tham khảo này được kết hợp để tham khảo toàn bộ nội dung của chúng). Các ví dụ về các kỹ thuật mà có thể được sử dụng để sản xuất Fv và kháng thể chuỗi đơn bao gồm các ví dụ được mô tả trong Patent Mỹ số 4,946,778 và 5,258,498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90:7995-7999 (1993); và Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988).

Cách khác để sàng lọc các thư viện kháng thể tái tổ hợp bằng cách hiển thị phagơ, các phương pháp luận khác đã biết trong lĩnh vực để sàng lọc các thư viện tổ hợp lớn có thể được áp dụng để xác định các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế. Một loại hệ thống biểu hiện thay thế là hệ thống trong đó thư viện kháng thể tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng thể dung hợp ARN-protein, như được mô tả trong Công bố PCT Số WO 98/31700 của Szostak và Roberts, và trong tài liệu Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. Trong hệ thống này, sự dung hợp cộng hóa trị được tạo ra giữa mARN và peptit hoặc protein mà nó mã hoá cho bằng sự dịch mã *in vitro* của mARN tổng hợp mà mang puromyxin, kháng sinh chất nhận peptiđyl, ở đầu 3' của chúng. Do đó, mARN cụ thể có thể được làm giàu từ hỗn hợp phức hợp của các mARN (ví dụ, thư viện tổ hợp) dựa trên các tính chất của peptit hoặc protein được mã hóa, ví dụ, kháng thể, hoặc phần của chúng, chẳng hạn như sự liên kết của kháng thể, hoặc phần của chúng, với kháng nguyên đặc hiệu kép. Trình tự axit nucleic mã hóa cho kháng thể, hoặc phần của chúng, được thu hồi từ việc sàng lọc các thư viện này có thể được biểu hiện bằng phương thức tái tổ hợp như mô tả ở trên (ví dụ, trong tế bào chủ động vật có vú), và hơn nữa, có thể được đưa đi làm trưởng thành ái lực thêm bằng cách chu kỳ sàng lọc bổ sung của các thể dung hợp mARN-peptit trong đó các đột biến được đưa vào (các) trình tự được chọn ban đầu, hoặc bằng các phương pháp khác để làm trưởng thành ái lực *in vitro* của các kháng thể tái tổ hợp, như được mô tả ở trên.

Theo cách tiếp cận khác các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng việc sử dụng phương pháp hiển thị nấm men đã biết trong lĩnh vực. Trong phương pháp hiển thị nấm men, các phương pháp di truyền được sử dụng để gắn các lĩnh vực kháng thể vào thành tế bào nấm men và hiển thị chúng trên bề mặt men. Cụ thể, nấm men này có thể được sử dụng để hiển thị các miền liên kết kháng nguyên được biểu hiện từ danh mục hoặc thư viện kháng thể tổ hợp (ví dụ, ở người hoặc ở chuột). ví dụ về các phương pháp hiển thị nấm men mà có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể theo sáng chế bao gồm các phương pháp được bộc lộ trong Wittrup *et al.* (Patent Mỹ số 6,699,658) được kết hợp ở đây để tham khảo.

5. Sản xuất kháng thể CD40 tái tổ hợp

Kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. ví dụ, biểu hiện từ tế bào chủ, trong đó (các) vật truyền biểu hiện mã hóa cho các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chuyển nạp vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Các dạng khác nhau của thuật ngữ "chuyển nạp" được dự định là bao hàm nhiều kỹ thuật thường được sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn, ví dụ, đục lỗ điện, kết tủa canxi-phosphat, chuyển nạp DEAE-đextran và dạng tương tự. Mặc dù có thể biểu hiện các kháng thể theo sáng chế ở tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn, nhưng sự biểu hiện của các kháng thể ở tế bào nhân chuẩn được ưu tiên hơn và tốt nhất là ở tế bào chủ động vật có vú, bởi vì các tế bào nhân chuẩn (và đặc biệt là tế bào động vật có vú) tốt hơn tế bào nhân sơ trong việc lắp ráp và tiết ra kháng thể có hoạt tính miễn dịch và được cuộn gập thích hợp.

Các tế bào động vật có vú được ưu tiên 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 tế bào dhfr-CHO, được mô tả trong tài liệu Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, được sử dụng với chỉ thị chọn lọc DHFR, ví dụ, như được mô tả trong R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), tế bào u tủy NS0, tế bào COS và tế bào SP2. Khi vật truyền biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cho các gen kháng thể được đưa vào các tế bào chủ động vật có vú, các kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong khoảng thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ hoặc, tốt hơn là tiết kháng thể vào môi trường nuôi cấy trong đó tế bào chủ được sinh trưởng. Kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp tinh chế protein chuẩn.

Tế bào chủ cũng có thể được sử dụng để sản xuất các mảnh kháng thể chức năng, chẳng hạn như các mảnh Fab hoặc các phân tử scFv. Cần hiểu rằng các biến đổi của quy trình nêu trên cũng thuộc phạm vi của sáng chế. ví dụ, có thể mong muốn chuyển tế bào chủ với ADN mã hóa cho mảnh chức năng của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế. Công nghệ ADN tái tổ hợp cũng có thể được sử dụng để loại bỏ một số, hoặc tất cả, ADN mã hoá một trong hai hoặc cả hai chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà không cần thiết để liên kết với kháng nguyên quan tâm. Các phân tử được biểu hiện từ các phân tử ADN bị cắt cụt này cũng được bao hàm bởi kháng thể theo sáng chế. Ngoài ra, các kháng thể chức năng kép có thể được tạo ra, trong đó một chuỗi nặng và một

chuỗi nhẹ là kháng thể theo sáng chế và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác đặc hiệu đối với kháng nguyên khác với kháng nguyên được quan tâm bằng cách liên kết chéo kháng thể theo sáng chế với kháng thể thứ hai bằng phương pháp liên kết chéo hóa học tiêu chuẩn.

Trong hệ thống được ưu tiên để biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp mã hoá cho cả chuỗi nặng kháng thể và chuỗi nhẹ kháng thể được đưa vào tế bào dhfr-CHO bằng cách chuyển nạp qua trung gian canxi phosphat. Trong vật truyền biểu hiện tái tổ hợp, các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể đều liên kết có điều khiển với các thành phần điều hòa vùng tăng cường CMV/vùng khởi động AdMLP để thúc đẩy sự phiên mã mức độ cao của gen. Vật truyền biểu hiện tái tổ hợp cũng mang gen DHFR, cho phép chọn lọc tế bào CHO mà đã được chuyển nạp bằng vật truyền bằng cách sử dụng sự chọn lọc/sự khuếch đại methotrexat. Các tế bào chủ biến nạp được chọn được nuôi cấy để cho phép biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể và kháng thể nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn được sử dụng để điều chế vật truyền biểu hiện tái tổ hợp, chuyển nạp tế bào chủ, chọn lọc thể biến nạp, nuôi cấy tế bào chủ và thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bằng cách nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đến khi kháng thể tái kết hợp theo sáng chế được tổng hợp. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước phân lập kháng thể tái tổ hợp từ môi trường nuôi cấy.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất kháng thể được glycosyl hoá, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng chứa một hoặc nhiều gốc carbohyđrat. Sự sản xuất protein *in vivo* mới sinh có thể trải qua quá trình xử lý thêm, được gọi là cải biến sau dịch mã. Cụ thể là, các gốc đường (glycosyl) có thể được thêm vào theo con đường enzym, quá trình đã biết dưới dạng glycosyl hóa. Các protein thu được mang các chuỗi bên oligosacarit được liên kết cộng hóa trị được gọi là protein được glycosyl hóa hoặc glycoprotein. Các kháng thể là glycoprotein có một hoặc nhiều gốc carbohyđrat trong miền Fc, cũng như miền biến đổi. Các gốc carbohyđrat trong miền Fc có tác dụng quan trọng đến chức năng tác động của miền Fc, với tác dụng tối thiểu lên sự liên kết kháng nguyên hoặc thời gian bán thải của kháng thể (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11–16). Ngược lại,

sự glycosyl hóa của miền biến đổi có thể có ảnh hưởng đến hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể. Sự glycosyl hóa trong miền biến đổi có thể có tác dụng tiêu cực lên ái lực liên kết kháng thể, có thể là do sự cản trở không gian (Co, M.S., *et al.*, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361- 1367), hoặc dẫn đến tăng ái lực đối với kháng nguyên (Wallick, S.C., *et al.*, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., *et al.*, *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723).

Một khía cạnh của sáng chế đề cập tới việc tạo ra thể đột biến vị trí glycosyl hóa, trong đó vị trí glycosyl hóa được liên kết O hoặc N của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, bị đột biến. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tạo ra các thể đột biến như vậy bằng cách sử dụng các công nghệ đã biết tiêu chuẩn. Các thể đột biến vị trí glycosyl hóa mà giữ lại hoạt tính sinh học, nhưng tăng hoặc giảm hoạt tính liên kết, là đối tượng khác của sáng chế.

Theo một phương án khác nữa, sự glycosyl hóa của kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế được cải biến. ví dụ, kháng thể không được glycosyl hóa có thể được tạo ra (*tức là*, kháng thể thiếu sự glycosyl hóa). Sự glycosyl hóa có thể được thay đổi, ví dụ, để làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Các cải biến carbohyđrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, làm thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể. ví dụ, một hoặc nhiều sự thế axit amin có thể được tạo ra mà dẫn đến việc loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa vùng biến đổi để nhờ đó loại bỏ sự glycosyl hóa tại vị trí đó. Sự không glycosyl hóa có thể làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Cách tiếp cận như vậy được mô tả chi tiết trong Công bố PCT WO2003016466A2 và Patent Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861, mỗi tài liệu trong số đó được kết hợp ở đây chỉ để tham khảo.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, kháng thể được cải biến theo sáng chế có thể được tạo ra mà có kiểu glycosyl hóa được thay đổi, chẳng hạn như kháng thể được hypofucosyl hóa có số lượng gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể có cấu trúc chia đôi GlisNAc tăng. Các mẫu glycosyl hóa biến đổi này được chứng minh là làm tăng khả năng ADCC của các kháng thể. Các cải biến carbohyđrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ có bộ máy glycosyl hóa thay đổi. Các tế bào có bộ máy glycosyl hóa thay đổi được mô tả trong lĩnh vực và có thể được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế để bằng cách đó tạo

ra kháng thể có sự glycosyl hóa thay đổi. Xem, ví dụ, Shields, R. L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, cũng như là, Bằng sáng chế Châu Âu Số: EP 1.176.195; Các Công bố PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80, mỗi tài liệu trong số đó được đưa vào đây bằng cách tham khảo toàn bộ.

Sự glycosyl hóa protein phụ thuộc vào trình tự axit amin của protein quan tâm, cũng như là tế bào chủ trong đó protein được biểu hiện. Các sinh vật khác nhau có thể tạo ra các enzym glycosyl hóa khác nhau (ví dụ, glycosyltransferaza và glycosiđaza), và có sẵn các chất nền khác nhau (đường nucleotit). Do các yếu tố như vậy, mô hình glycosyl hóa protein, và hợp phần của các gốc glycosyl, có thể khác nhau tùy thuộc vào hệ thống vật chủ trong đó protein cụ thể được biểu hiện. Các gốc glycosyl hữu dụng trong sáng chế có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, glucoza, galactoza, manoza, fucoza, n-axetylglucosamin và axit sialic. Tốt hơn là các kháng thể được glycosyl hóa, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa các gốc glycosyl sao cho mô hình glycosyl hóa là ở người.

Các chuyên gia trong lĩnh vực biết rằng sự glycosyl hóa protein khác nhau có thể dẫn đến đặc tính protein khác nhau. ví dụ, hiệu quả của một protein trị liệu được sản xuất trong vật chủ vi sinh vật, chẳng hạn như nấm men, và được glycosyl hóa bằng cách sử dụng con đường nội sinh nấm men có thể được giảm đi so với cùng protein được biểu hiện ở tế bào động vật có vú, chẳng hạn như dòng tế bào CHO. Các glycoprotein này cũng có thể gây miễn dịch ở người và có thời gian bán thải *in vivo* giảm sau khi dùng. Các thụ thể cụ thể ở người và các động vật khác có chất nhận ra các gốc glycosyl cụ thể và thúc đẩy sự thanh thải nhanh protein từ dòng máu. Các tác dụng phụ khác có thể bao gồm sự thay đổi cuộn gập protein, độ hòa tan, nhạy cảm với proteaza, trao đổi, vận chuyển, phân chia cục bộ, tiết, sự nhận diện bởi các protein hoặc các yếu tố khác, tính kháng nguyên, hoặc tính gây dị ứng. Theo đó, người thực hành có thể thích protein trị liệu có hợp phần và mô hình glycosyl hóa cụ thể, ví dụ như hợp phần và mô hình glycosyl hóa giống hệt, hoặc ít nhất là tương tự, với protein trị liệu được sản xuất trong tế bào người hoặc trong các tế bào đặc trưng loài của động vật dự kiến.

Việc biểu hiện các protein glycosyl hóa khác với protein của tế bào chủ có thể đạt được bằng cách cải biến di truyền tế bào chủ để biểu hiện enzym glycosyl hóa khác loại. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, người thực hành có thể tạo

ra kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng thể hiện sự glycosyl hóa protein ở người. ví dụ, các chủng nấm men được cải biến di truyền để biểu hiện các enzym glycosyl hóa không có trong tự nhiên sao cho các protein được glycosyl hóa (glycoprotein) được sản xuất ra trong các chủng nấm men này thể hiện sự glycosyl hóa protein giống như sự glycosyl hóa protein của tế bào động vật, cụ thể là tế bào người (Công bố Patent Mỹ số 20040018590 và 20020137134 và Công bố PCT WO2005100584 A2).

Ngoài kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, sáng chế cũng hướng đến kháng thể kháng idiotypic (kháng-Id) đặc hiệu cho các kháng thể này, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế. Kháng thể kháng Id là kháng thể, mà nhận ra các quyết định duy nhất thường có liên quan đến vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể khác. Kháng Id có thể được điều chế bằng cách gây miễn dịch con vật bằng kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, hoặc vùng chứa CDR của chúng. Con vật được gây miễn dịch sẽ nhận ra, và đáp ứng với các quyết định idiotypic của kháng thể gây miễn dịch và sản xuất ra kháng thể kháng Id. Các kháng thể kháng Id cũng có thể được sử dụng làm "chất sinh miễn dịch" để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật khác, tạo ra cái gọi là kháng thể kháng kháng Id.

Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng protein quan tâm có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng thư viện của tế bào chủ được thiết kế di truyền để biểu hiện các enzym glycosyl hóa khác nhau, sao cho tế bào chủ thành viên của thư viện sản xuất ra protein quan tâm có mô hình glycosyl hóa thay đổi. Người thực hành sau đó có thể lựa chọn và phân lập các protein quan tâm có mô hình glycosyl hóa mới cụ thể. Tốt hơn là, protein có mô hình glycosyl hóa mới được chọn cụ thể thể hiện các đặc tính sinh học được cải thiện hoặc được thay đổi.

III. Sử dụng kháng thể kháng CD40 đối kháng

Với khả năng liên kết với CD40 ở người, các kháng thể kháng CD40 ở người, hoặc phần của chúng, theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện CD40 ở người (ví dụ, trong một sinh học, chẳng hạn như huyết thanh hoặc huyết tương), bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch thông thường, chẳng hạn như thử nghiệm hấp thụ miễn dịchliên kết enzym (ELISA), thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (RIA) hoặc hóa mô miễn

dịch mô. Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện CD40 ở người trong mẫu sinh học bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể, hoặc phần kháng thể, theo sáng chế và phát hiện kháng thể (hoặc phần kháng thể) liên kết với CD40 ở người hoặc kháng thể (hoặc phần kháng thể) không liên kết, bằng cách đó phát hiện ra CD40 ở người trong mẫu sinh học. Kháng thể được gắn nhãn trực tiếp hoặc gián tiếp bằng chất có thể phát hiện được để dễ dàng phát hiện các kháng thể được liên kết hoặc không được liên kết. Các chất có thể phát hiện được thích hợp bao gồm các enzym khác nhau, các nhóm giả, nguyên liệu huỳnh quang, nguyên liệu phát quang và nguyên liệu phóng xạ. ví dụ về các enzym thích hợp có chứa peroxiđaza củ cải ngựa, phosphatase kiềm, β-galactosiđaza, hoặc axetylcholinesteraza; ví dụ về các phức hợp nhóm giả bao gồm streptaviđin/biotin và aviđin/biotin; ví dụ các nguyên liệu huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, fluoresxein, isostioxyanat huỳnh quang, rhođamin, điclorotriazinylamin fluoresxein, đansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về nguyên liệu phát quang bao gồm luminol; và ví dụ về nguyên liệu phóng xạ thích hợp bao gồm: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, hoặc ^{153}Sm.

Thay thế cho việc gắn nhãn kháng thể, CD40 ở người có thể được thử nghiệm trong dịch sinh học bằng thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh bằng cách sử dụng chuẩn rhCD40 được gắn nhãn bằng chất có thể phát hiện được và kháng thể kháng CD40 ở người không được gắn nhãn. Trong thử nghiệm này, mẫu sinh học, các chuẩn rhCD40 được gắn nhãn và kháng thể kháng CD40 ở người được kết hợp và lượng của chuẩn rhCD40 được gắn nhãn liên kết với kháng thể không được nhãn được xác định. Lượng CD40 ở người trong mẫu sinh học tỷ lệ nghịch với lượng của chuẩn rhCD40 được gắn nhãn liên kết với kháng thể kháng CD40. Tương tự, CD40 ở người cũng có thể được thử nghiệm trong dịch sinh học bằng thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh bằng cách sử dụng các chuẩn rhCD40 được gắn nhãn bằng chất có thể phát hiện được và kháng thể kháng CD40 ở người không được gắn nhãn.

Kháng thể và phần kháng thể theo sáng chế tốt hơn là có khả năng trung hòa hoạt tính CD40 ở người cả *in vitro* và *in vivo*. Theo đó, các kháng thể và các phần kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế hoạt tính hCD40, ví dụ, trong môi trường nuôi cấy tế bào có chứa hCD40, ở người hoặc ở các đối tượng động vật có vú khác có CD40 mà kháng thể theo sáng chế phản ứng chéo với nó. Theo một phương án, sáng

chế đề xuất phương pháp ức chế hoạt tính hCD40 bao gồm bước cho hCD40 tiếp xúc với kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế để hoạt tính hCD40 bị ức chế. ví dụ, trong môi trường nuôi cấy tế bào có chứa, hoặc nghi ngờ có chứa hCD40, kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy để ức chế hoạt tính hCD40 trong môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hoạt tính hCD40 ở đối tượng, tốt hơn từ đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại. Sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hoạt tính CD40 ở đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn này, mà phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng dùng kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế sao cho hoạt tính CD40 ở đối tượng được giảm đi. Tốt hơn là, CD40 là CD40 của người, và đối tượng là người. Theo cách khác, đối tượng có thể là động vật có vú biểu hiện CD40 mà kháng thể theo sáng chế có khả năng liên kết với. Đối tượng cũng có thể là động vật có vú mà CD40 được đưa vào (ví dụ, bằng cách dùng CD40 hoặc bằng cách biểu hiện của gen chuyển CD40). Kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cho người với mục đích điều trị. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cho động vật có vú không phải là người có biểu hiện CD40 mà kháng thể này có khả năng liên kết với nhằm mục đích thú y hoặc làm mô hình động vật của bệnh ở người. Đối với vấn đề sau, các mô hình động vật này có thể hữu ích cho việc đánh giá hiệu quả điều trị của các kháng thể theo sáng chế (ví dụ, thử nghiệm liều lượng và thời gian điều trị).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại" được dự định là bao gồm các bệnh và các rối loạn khác, trong đó sự có mặt của CD40 ở đối tượng mắc rối loạn đã được chứng minh là hoặc bị nghi ngờ là chịu trách nhiệm về sinh lý bệnh học của rối loạn hoặc yếu tố góp phần làm trầm trọng thêm rối loạn này. Theo đó, rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại là rối loạn trong đó sự giảm hoạt tính CD40 được dự kiến là sẽ làm giảm các triệu chứng và/hoặc sự tiến triển của rối loạn. Những rối loạn như vậy có thể được chứng minh, ví dụ, bằng sự gia tăng của nồng độ của CD40 trong dịch sinh học của đối tượng mắc rối loạn (ví dụ, sự gia tăng của nồng độ CD40 trong huyết thanh, huyết tương, dịch khớp, *v.v.* của đối tượng), mà có thể được phát hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD40 như mô tả ở trên. Các ví dụ không giới hạn của rối loạn có thể được điều trị bằng các kháng thể theo sáng chế, và

các biến thể của chúng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm các rối loạn được thảo luận trong phần dưới đây liên quan đến dược phẩm của kháng thể theo sáng chế. ví dụ, các rối loạn thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, luput ban đỏ hệ thống (SLE), luput dạng đĩa, viêm thận do luput, bệnh u hạt (sarcoidosis), viêm khớp thiếu niên, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, hội chứng Reiter, viêm cột sống dính khớp, viêm khớp do bệnh gút, sự thải bỏ mảnh ghép cơ quan hoặc mô, bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, đa xơ cứng, hội chứng tăng IgE, viêm đa động mạch kết nốt, xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh celiac (viêm ruột nhạy cảm với gluten), viêm gan tự miễn, thiếu máu tăng sắc nghiêm trọng, thiếu máu tan máu tự miễn, vẩy nến, xơ cứng bì, nhược cơ, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự miễn, viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh Grave, viêm tuyến giáp Hashimoto, bệnh phức hợp miễn dịch, hội chứng rối loạn chức năng miễn dịch mệt mỏi mãn tính (CFIDS), viêm đa cơ và viêm da cơ, chứng cryoglobulin huyết, sự tan huyết khối, bệnh cơ tim, bệnh pemphigus thể thông thường, xơ hóa mô kẽ phổi, bệnh u hạt (sarcoidosis), bệnh tiểu đường typ I và typ II, quá mẫn kiểu trì hoãn typ 1, 2, 3, và 4, dị ứng hoặc rối loạn dị ứng, bệnh hen, hội chứng Churg-Strauss (bệnh u hạt dị ứng), viêm da tạng dị ứng, viêm da tiếp xúc dị ứng và kích thích, bệnh mày đay, dị ứng do IgE, xơ vữa động mạch, viêm mạch, bệnh cơ do viêm không rõ nguyên nhân, bệnh tan máu, bệnh Alzheimer, bệnh viêm đa rễ dây thần kinh mất myelin mãn tính.. Theo một phương án cụ thể, bệnh hoặc rối loạn là rối loạn viêm mãn tính. Theo phương án cụ thể, rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại là bệnh viêm ruột (IBD), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế được sử dụng để điều trị rối loạn trong đó hoạt tính TNFα là có hại, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viêm khớp dạng thấp, viêm loét đại tràng, viêm tuyến mồ hôi mưng mủ, viêm khớp tự phát chưa thành niên, viêm khớp vẩy nến, bệnh vẩy nến, viêm cột sống dính khớp, và bệnh Crohn. Theo một phương án, rối loạn trong đó hoạt tính TNFα là có hại là viêm màng mạch nho.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị đối tượng mắc bệnh viêm ruột (IBD).

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm loét đại tràng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh Crohn.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị luput ban đỏ hệ thống (SLE).

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh sarcoit.

Theo một phương án,kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị đối tượng là người mắc viêm khớp tuổi thiếu niên.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm khớp dạng thấp.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm khớp vẩy nến.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị đối tượng mắc viêm cột sống dính khớp.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm tuyến mồ hôi mưng mủ.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm màng mạch nho.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh Sjogren.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh vẩy nến.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị viêm da cơ địa.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng để điều trị bệnh xơ cứng bì.

Các mAb kháng CD40 theo sáng chế sẽ có khả năng điều trị cả những bệnh nhân nguyên bản sinh học và những quần thể người phản ứng không đủ kháng TNF do vai trò trung tâm của CD40 trong cả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh và tập nhiễm. Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị có khả năng ức chế sự truyền tín hiệu CD40 kìm hãm các con đường phân tử chẳng hạn như sự sản xuất TNF và IL-23 và sự biểu hiện phân tử kết dính/đồng kích thích mà duy trì chứng viêm mãn tính ở ruột. Dựa trên biên dạng biểu hiện của bệnh nhân Crohn được điều trị bằng kháng TNF, việc điều trị bằng kháng CD40 có thể có khả năng mở rộng vượt ra ngoài quần thể đáp ứng với kháng TNF để điều trị phạm vi rộng hơn của bệnh nhân Crohn. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị quần thể phụ của bệnh nhân IBD không đáp ứng với liệu pháp kháng TNF. Những bệnh nhân IBD này có thể bị bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng và không đáp ứng hoặc đã có đáp ứng hạn chế đối với việc điều trị bằng chất ức chế TNFα, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, hoặc golimumab. Các kháng thể đối kháng CD40 được mô tả ở đây có thể được sử dụng, để điều trị người không đáp ứng TNF mắc bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm phương pháp điều trị cho bệnh nhân cần điều trị, *ví dụ*, bệnh nhân người lớn, mắc bệnh Crohn từ vừa đến nặng, là người không đáp ứng với kháng TNF.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp để điều trị các bệnh này. Cần hiểu rằng các kháng thể theo sáng chế hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với tác nhân bổ sung, ví dụtác nhân điều trị, tác nhân bổ sung này được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cho mục đích dự định. ví dụ, tác nhân bổ sung có thể là tác nhân điều trị được công nhận trong lĩnh vực là có ích để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh đang được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế. Tác nhân bổ sung cũng có thể là tác nhân mang lại đóng góp có lợi cho hợp phần điều trị, ví dụ, tác nhân ảnh hưởng đến độ nhớt của hợp phần. Cần hiểu thêm rằng các dạng kết hợp

có thể được bao gồm trong sáng chế này là các dạng kết hợp hữu ích cho mục đích dự định. Các tác nhân nêu dưới đây là để minh hoạ cho các mục đích và không được dự định là làm giới hạn sáng chế. Các dạng kết hợp, là một phần của sáng chế, có thể là các kháng thể theo sáng chế và ít nhất một tác nhân bổ sung được chọn từ các danh sách dưới đây. Dạng kết hợp cũng có thể có chứa nhiều hơn một tác nhân bổ sung, ví dụ, hai hoặc ba tác nhân bổ sung nếu dạng kết hợp là hợp phần được tạo thành mà có thể thực hiện chức năng dự định của nó.

Liệu pháp kết hợp có thể bao gồm một hoặc nhiều chất đối kháng CD40, ví dụ, các kháng thể kháng CD40 hoặc các mảnh của nó, được tạo chế phẩm với và / hoặc được đồng sử dụng với, một hoặc nhiều thuốc điều trị bổ sung, ví dụ, một hoặc nhiều chất ức chế xytokin và yếu tố tăng trưởng, chất ức chế miễn dịch, chất kháng viêm (ví dụ, chất kháng viêm toàn thân), tác nhân kháng xơ, chất ức chế chuyển hóa, chất ức chế enzym và/hoặc các chất gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào, chất ức chế phân bào, kháng sinh kháng u, chất điều hòa miễn dịch, vật truyền dùng cho liệu pháp gen, chất alkyl hóa, chất chống tạo mạch mới, chất chống chuyển hóa, chất chứa boron, chất bảo vệ hóa học, hormon, chất kháng hormon, corticosteroit, chất trị liệu quang hoạt, oligonucleotit, chất nuclit phóng xạ, chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế tyrosin kinaza, hoặc chất gây cảm thụ bức xạ, như được mô tả thêm trong bản mô tả này.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với thuốc thứ hai để điều trị bệnh viêm ruột (IBD). Theo các phương án nhất định, tác nhân thứ hai là mesalamin, balsalazit, azathioprin, 6-MP, methotrexat, infliximab, certolizumab, ađalimumab, golimumab, natalizumab, vedolizumab, ustekinumab, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với tác nhân thứ hai để điều trị SLE, trong đó tác nhân thứ hai là nitropaste/nitroglyxerin, nifeđipin, sildenafil, tađalifil, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40 hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với tác nhân thứ hai để điều trị SLE, trong đó tác nhân thứ hai là corticosteroit, chất sản xuất steroit nội sinh,

NSAID, chất kháng viêm, thuốc kháng thấp khớp làm cải biến bệnh (DMARD), chất kìm hãm miễn dịch, chất chống đông tụ, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với corticosteroit để điều trị SLE. ví dụ về corticosteroit có thể được sử dụng bao gồm prednisolon, metylprednisolon, prednison, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với tác nhân gây ra sự sản xuất steroit nội sinh, ví dụ, corticotropin (Acthar), để điều trị SLE.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với liệu pháp tại chỗ hoặc tiêm để điều trị SLE. Một ví dụ về liệu pháp như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cortison, hydrocortison, kem pimecrolimus, thuốc mỡ tacrolimus, imiquimod, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với thuốc kháng viêm không steroit (NSAID) để điều trị SLE. Một ví dụ về NSAID có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, indomethaxin, nabumeton, celecoxib, ibuprofen, naproxen, diclofenac, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với thuốc kháng viêm để điều trị SLE. Theo phương án khác, thuốc kháng viêm là axetaminophen và/hoặc salixylat.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với các thuốc chống thấp khớp làm cải biến bệnh (DMARD) để điều trị SLE. ví dụ về DMARD bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hydroxycloroquin (Plaquenil), cloroquin, methotrexat (Rheumatrex), leflunomit (Arava), sulfasalazin, hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với Belimumab (Benlysta), Rituximab (Rituxan), Ig trong tĩnh mạch hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với chất kìm hãm miễn dịch để điều trị SLE. ví dụ về chất kìm hãm miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, azathioprin (Imuran), xyclophosphamit (Cytoxan), xyclosporin, tacrolimus, và mycophenolat.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD40, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, ví dụ Ab102, được sử dụng kết hợp với chất chống đông tụ để điều trị SLE. ví dụ về chất chống đông tụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, aspirin, heparin, warfarin, và enoxaparin (Lovenox).

Các ví dụ khác về tác nhân điều trị bổ sung được ưu tiên có thể được đồng sử dụng và/hoặc được tạo chế phẩm với một hoặc nhiều chất đối kháng CD40, ví dụ, các kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng. Sự kết hợp như vậy có thể được sử dụng để điều trị rối loạn liên quan đến CD40 như đã nêu ở đây. Các ví dụ khác về tác nhân điều trị có thể được đồng sử dụng và/hoặc được tạo chế phẩm với một hoặc nhiều kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng bao gồm một hoặc nhiều: chất đối kháng TNF (ví dụ, mảnh hòa tan của thụ thể TNF, ví dụ, thụ thể TNF ở người p55 hoặc p75 hoặc dẫn xuất của chúng, ví dụ, TNFR-IgG 75 kD (protein dung hợp thụ thể TNF-IgG 75 kD, ENBREL)); chất đối kháng enzym TNF, ví dụ, chất ức chế enzym chuyển hóa TNF (TACE); chất đối kháng thụ thể muscarinic; chất đối kháng TGF-beta; interferon gamma; perfenidon; chất hóa trị liệu, ví dụ, methotrexat, leflunomit, hoặc sirolimus (rapamyxin) hoặc chất tương tự, ví dụ, CCI-779; chất ức chế COX2 và cPLA2; chất kháng viêm không steroit (NSAID); chất điều hòa miễn dịch; chất ức chế p38, chất ức chế TPL-2, MK-2 và NFkB, trong số các chất khác.

Dạng kết hợp được ưu tiên khác là (các) chất kháng viêm kìm hãm xytokin (CSAID); kháng thể hoặc chất đối kháng của xytokin hoặc yếu tố tăng trưởng ở người khác, ví dụ, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, interferon, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF, và endothelin-1, cũng như là

thụ thể của các xytokin và yếu tố tăng trưởng này. Kháng thể theo sáng chế, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể được kết hợp với kháng thể vào phân tử bề mặt tế bào chẳng hạn như CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA hoặc phối tử của chúng bao gồm CD154 (gp39 hoặc CD40L).

Sự kết hợp được ưu tiên của các tác nhân điều trị có thể cản trở ở các điểm khác nhau trong chu trình viêm; các ví dụ được ưu tiên bao gồm các chất đối kháng TNF như kháng thể TNF khảm, được làm cho giống như của người hoặc ở người, ađalimumab, (HUMIRA, D2E7, Công bố PCT Số WO 97/29131), CA2 (REMICADE), CDP 571, và các thụ thể TNF p55 hoặc p75 hòa tan, các dẫn xuất của chúng, (P75TNFR1gG (ENBREL) hoặc p55TNFR1gG (LENERCEPT), cũng như các chất ức chế enzym chuyển hóa TNF (TACE), các chất ức chế IL-1 tương tự (chất ức chế enzym chuyển hóa Interleukin-1, IL-1RA v.v.) có thể hữu hiệu để vì cùng một lý do. Các dạng kết hợp được ưu tiên còn bao gồm Interleukin 4.

Các phác đồ liều lượng có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc phòng ngừa). ví dụ, tiêm nhanh liều đơn có thể được dùng, một vài liều lượng chia nhỏ có thể được dùng theo thời gian hoặc liều lượng có thể được giảm hoặc được tăng theo tỉ lệ như được chỉ định bởi tình trạng khẩn cấp của tình trạng trị liệu. Đặc biệt có lợi để tạo chế phẩm các hợp phần dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để dễ dùng và độ đồng đều của liều lượng. Dạng đơn vị liều lượng như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều lượng đơn vị cho đối tượng động vật có vú cần điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn khi kết hợp với chất mang dược cần thiết. Đặc tính của dạng đơn vị liều lượng theo sáng chế được minh họa bởi và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc điểm duy nhất của hoạt chất và tác dụng phòng ngừa hoặc trị liệu cụ thể cần đạt được, và (b) giới hạn vốn có trong lĩnh vực tạo hợp chất hoạt chất này để điều trị sự nhạy cảm ở các cá thể.

Cần lưu ý rằng giá trị liều lượng có thể khác nhau tùy theo loại và mức độ nghiêm trọng của điều kiện cần được giảm bớt. Cần hiểu thêm rằng đối với bất kỳ đối tượng cụ thể nào, các chế độ liều lượng cụ thể cần được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu cá nhân và sự đánh giá chuyên môn của người điều hành hoặc giám sát việc quản lý các

chế phẩm và các liều lượng được nêu ra ở đây là ví dụ chỉ và không có ý định giới hạn phạm vi hoặc thực tiễn của sáng chế được yêu cầu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế này đề cập đến phương pháp điều trị (ví dụ, chữa trị, kìm hãm, làm cho tốt hơn, trì hoãn hoặc ngăn ngừa sự khởi phát, hoặc ngăn ngừa sự xuất hiện trở lại hay tái phát) hoặc ngăn ngừa rối loạn, trong đó hoạt tính CD40 là có hại, ở đối tượng Phương pháp này bao gồm bước: cho đối tượng dùng chất liên kết CD40 (cụ thể là chất đối kháng), ví dụ, kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng như được mô tả ở đây, với lượng đủ để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn liên quan đến CD40. Chất đối kháng CD40, ví dụ, kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng, có thể được dùng cho đối tượng, một mình hoặc kết hợp với các phương thức điều trị khác như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của CD40 trong mẫu *in vitro* (ví dụ, mẫu sinh học, chẳng hạn như huyết thanh, huyết tương, mô, mảnh sinh thiết). Phương pháp này có thể được sử dụng để chẩn đoán rối loạn, ví dụ, rối loạn viêm. Phương pháp này bao gồm: (i) cho mẫu hoặc mẫu đối chứng tiếp xúc với kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng như được mô tả ở đây; và (ii) phát hiện sự tạo thành của phức hợp giữa kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng, và mẫu hoặc mẫu đối chứng, trong đó sự thay đổi đáng kể về mặt thống kê trong sự tạo thành của phức hợp trong mẫu tương quan với mẫu đối chứng là dấu hiệu của sự có mặt của CD40 trong mẫu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của CD40 *in vivo* (ví dụ, chụp ảnh *in vivo* ở đối tượng). Phương pháp này được sử dụng để chuẩn đoán rối loạn, ví dụ, rối loạn liên quan đến CD40. Phương pháp này bao gồm: (i) dùng kháng thể kháng CD40 hoặc mảnh của chúng như được mô tả ở đây cho đối tượng hoặc đối tượng đối chứng trong điều kiện cho phép liên kết kháng thể hoặc mảnh với CD40; và (ii) phát hiện sự tạo thành của phức hợp giữa kháng thể hoặc mảnh và CD40, trong đó sự thay đổi đáng kể về mặt thống kê trong sự tạo thành của phức hợp ở đối tượng tương quan với đối tượng đối chứng là dấu hiệu của sự có mặt của CD40.

Sự thay thế của các gốc axit amin trong phần Fc để thay đổi chức năng tác động kháng thể là đã biết đến trong lĩnh vực (Winter, *et al.* Patent Mỹ số 5,648,260; 5624821).

Phần Fc của kháng thể làm trung gian cho một số chức năng tác động quan trọng ví dụ cảm ứng xytokin, ADCC, sự thực bào, sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) và thời gian bán thải/ tốc độ thanh thải của kháng thể và phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Trong một số trường hợp, các chức năng tác động này là điều mong muốn đối với kháng thể trị liệu nhưng trong những trường hợp khác có thể không cần thiết hoặc thậm chí có hại, tùy thuộc vào mục đích điều trị. Các lớp IgG ở người nhất định, cụ thể là IgG1 và IgG3, lần lượt làm trung gian cho ADCC và CDC thông qua liên kết với FcγR và C1q bổ thể. Thụ thể Fc ở trẻ sơ sinh (FcRn) là các thành phần thiết yếu quyết định thời gian bán thải trong hệ tuần hòan của kháng thể. Theo một phương án khác nữa, ít nhất là một gốc axit amin được thay thế trong vùng không đổi của kháng thể, ví dụ vùng Fc của kháng thể, sao cho chức năng tác động của kháng thể được thay đổi.

Một phương án đề xuất kháng thể được gắn nhãn, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế được tạo dẫn xuất hoặc được liên kết với một hoặc nhiều phân tử chức năng (ví dụ, peptit hoặc protein khác). ví dụ, kháng thể được gắn nhãn, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thể được tạo dẫn xuất bằng cách liên kết chức năng kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế (bằng cách liên kết hóa học, dung hợp di truyền, kết hợp không cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều các thực thể phân tử khác, chẳng hạn như kháng thể khác (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép hoặc diabody), chất có thể phát hiện được, tác nhân dược, protein hoặc peptit mà có thể làm trung gian cho sự kết hợp của kháng thể hoặc phần kháng thể với phân tử khác (chẳng hạn như vùng lõi streptaviđin hoặc đuôi polyhistiđin) và/hoặc tác nhân gây độc tế bào hoặc trị liệu được chọn từ nhóm gồm có chất ức chế phân bào, kháng sinh kháng khối u, chất điều biến miễn dịch, vật truyền cho liệu pháp gen, chất alkyl hóa, chất chống tạo mạch mới, chất chống chuyển hóa, chất chứa boron, chất bảo vệ hóa học, hormon, chất kháng hormon, corticosteroit, tác nhân trị liệu quang hoạt, oligonucleotit, chất nuclit phóng xạ, chất ức chế topoisomeraza, chất ức chế tyrosin kinaza, chất nhạy cảm bức xạ, và dạng kết hợp của chúng.

Các tác nhân có thể phát hiện được hữu ích mà kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế có thể được tạo dẫn xuất với bao gồm các hợp chất huỳnh quang. Các chất có thể phát hiện được huỳnh quang ví dụ bao gồm fluoresxein, isothioxyanat fluoresxein, rhođamin, 5-đimetylamin-1-naptalensulfonyl clorua, phycoerythrin và các

chất tương tự. Kháng thể cũng có thể được tạo dẫn xuất bằng enzym có thể phát hiện được, như phosphataza kiềm, peroxiđaza cây cải ngựa, glucoza oxiđaza và các chất tương tự. Khi kháng thể được tạo dẫn xuất với enzym có thể phát hiện được, nó được phát hiện bằng cách bổ sung các chất phản ứng khác mà enzym này dùng để tạo ra sản phẩm phản ứng có thể phát hiện được. ví dụ, khi chất có thể phát hiện được peroxiđaza của cây cải ngựa có mặt, việc bổ sung hyđro peroxit và điaminobenziđin dẫn tới sản phẩm phản ứng có màu, mà có thể phát hiện được. Kháng thể cũng có thể được tạo dẫn xuất bằng biotin, và được phát hiện thông qua phép đo gián tiếp của liên kết của aviđin hoặc streptaviđin.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất kháng thể kết tinh, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Tốt hơn là sáng chế đề cập đến các tinh thể của các kháng thể kháng CD40 nguyên vẹn và mảnh của chúng như được bộc lộ ở đây và chế phẩm và hợp phần chứa tinh thể này. Theo một phương án kháng thể kết tinh, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, có thời gian bán thải lớn hơn *in vivo* so với các đối tác hòa tan của kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng. Theo phương án khác kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, giữ lại hoạt tính sinh học sau khi kết tinh.

Kháng thể kết tinh, hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực và như được bộc lộ trong WO 02072636, được kết hợp ở đây để tham khảo.

IV. Dược phẩm

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa kháng thể, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa "lượng hữu hiệu để điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu để phòng ngừa" của kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế. "Lượng hữu hiệu để điều trị" là lượng hữu hiệu, ở các liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng kháng thể hoặc phần kháng thể hữu hiệu để có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này và có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, tuổi tác, giới tính và cân nặng của cá thể, và khả năng gây ra đáp ứng mong muốn trong cá thể của kháng thể hoặc phần kháng

thể. Lượng hữu hiệu để điều trị còn là lượng trong đó tác dụng gây độc hoặc bất lợi bất kỳ của kháng thể, hoặc phần kháng thể, bị vượt qua bởi các hiệu quả điều trị có lợi. "Lượng hữu hiệu để phòng ngừa" là lượng hữu hiệu, ở các liều dùng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng ngừa mong muốn. Thông thường, vì liều lượng phòng ngừa được sử dụng cho các đối tượng ở thời điểm trước hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, lượng hữu hiệu để phòng ngừa sẽ thấp hơn lượng hữu hiệu để điều trị.

Dược phẩm chứa các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để, nhưng không giới hạn ở, chẩn đoán, phát hiện, hoặc theo dõi rối loạn, trong việc ngăn ngừa, điều trị, quản lý, hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, và/hoặc sử dụng trong nghiên cứu. Theo phương án cụ thể, dược phẩm có chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều chất phòng ngừa hoặc điều trị khác với kháng thể theo sáng chế để điều trị rối loạn trong đó hoạt tính CD40 là có hại. Tốt hơn là, các chất phòng ngừa hoặc điều trị được biết là có ích cho hoặc đã hoặc đang được sử dụng để ngăn ngừa, điều trị, quản lý, hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó. Theo các phương án này, dược phẩm còn có thể chứa chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược.

Các kháng thể và các phần kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp cho đối tượng sử dụng. Thông thường, dược phẩm chứa kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất mang dược dụng" chứa bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, các chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. ví dụ về các chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều trong số nước, nước muối, nước muối được tạo đệm phosphat, đextroza, glyxerol, etanol và các chất tương tự, cũng như tổ hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn nếu bao gồm các chất đẳng trương, ví dụ như đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Các chất mang dược dụng còn có thể chứa lượng nhỏ các chất phụ trợ như chất làm ướt hoặc chất nhũ hoá, chất bảo quản hoặc chất đệm, mà làm tăng tuổi thọ hoặc hiệu quả của kháng thể hoặc phần kháng thể.

Các hệ phân phối khác nhau đã biết và có thể được sử dụng để dùng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc dạng kết hợp của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và chất phòng ngừa hoặc chất điều trị hữu dụng để ngăn ngừa, kiểm soát, điều trị hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của chúng, ví dụ, bọc trong liposom, vi hạt, viên vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện kháng thể hoặc mảnh kháng thể, sự nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), tạo cấu trúc axit nucleic như là một phần của vật truyền retrovirus hoặc vật truyền khác, v.v. Các phương pháp sử dụng chất phòng ngừa hoặc điều trị theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), sử dụng qua màng cứng, sử dụng trong khối u, và sử dụng qua niêm mạc (ví dụ, đường trong mũi và miệng). Ngoài ra, có thể sử dụng qua đường phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng dụng cụ xông hoặc khí dung, và bào chế với chất tạo sol khí. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,019,968, 5,985, 320, 5,985,309, 5,934, 272, 5,874,064, 5,555,913, 5,290, 540 và 4,880,078; và Công bố PCT số WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, và WO 99/66903, mỗi tài liệu trong số này được kết hợp vào bản mô tả này để tham khảo. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế, liệu pháp kết hợp, hoặc dược phẩm theo sáng chế được dùng bằng cách sử dụng công nghệ phân phối thuốc qua đường phổi của Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.) Theo phương án cụ thể, chất phòng ngừa hoặc chất điều trị theo sáng chế được sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong khối u, qua miệng, trong mũi, qua đường phổi, hoặc dưới da. Các chất phòng ngừa hoặc điều trị có thể được dùng theo con đường tiện lợi bất kỳ, ví dụ bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được dùng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú.

Theo phương án cụ thể, có thể mong muốn sử dụng các chất phòng ngừa hoặc điều trị theo sáng chế khu trú ở khu vực cần được điều trị; điều này có thể đạt được bằng, ví dụ, và không làm giới hạn sáng chế, truyền tại chỗ, bằng cách tiêm, hoặc bằng phương thức mảnh cấy ghép, mảnh cấy ghép này là nguyên liệu xốp hoặc không xốp, bao gồm màng và chất nền, chẳng hạn như màng sialastic, polyme, chất nền dạng sợi (ví dụ, TISSUEL), hoặc chất nền colagen. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của một

hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế chất đối kháng được dùng khu trú cho khu vực bị ảnh hưởng cho đối tượng để ngăn ngừa, điều trị, kiểm soát và/hoặc cải thiện rối loạn hoặc triệu chứng của nó. Theo một phương án khác, lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế được dùng khu trú ở khu vực bị ảnh hưởng kết hợp với lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều liệu pháp (ví dụ, một hoặc nhiều chất phòng ngừa hoặc điều trị) khác ngoài kháng thể theo sáng chế cho đối tượng để ngăn ngừa, điều trị, kiểm soát và/hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó.

Theo một phương án khác, chất phòng ngừa hoặc điều trị theo sáng chế có thể được phân phối trong hệ giải phóng có kiểm soát hoặc kéo dài. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng để đạt được sự giải phóng có kiểm soát hoặc kéo dài (xem Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). Theo phương án khác, nguyên liệu polyme có thể được sử dụng để đạt được sự giải phóng có kiểm soát hoặc kéo dài của các liệu pháp theo sáng chế (xem ví dụ, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Biovailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; cũng xem Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); Patent Mỹ số 5,679,377; Patent Mỹ số 5, 916,597; Patent Mỹ số 5,912,015; Patent Mỹ số 5,989,463; Patent Mỹ số 5,128,326; Công bố PCT số WO 99/15154; và Công bố PCT số WO 99/20253. ví dụ về các polyme được sử dụng trong các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm, nhưng không giới hạn ở, poly(2-hyđroxy etyl metacrylat), poly(metyl metacrylat), poly(axit acrylic), poly(etylen-co-vinyl axetat), poly(axit metacrylic), polyglycolit (PLG), polyanhyđrit, poly (N-vinyl pyroliđon), rượu polyvinylic, polyacrylamit, poly(etylen glycol), polylactit (PLA), poly(lactit-co-glycolit) (PLGA) và polyorthoeste. Theo một phương án được ưu tiên, polyme được sử dụng trong chế phẩm giải phóng kéo dài là trơ, không chứa tạp chất có thể chiết được, ổn định khi lưu trữ, vô trùng và có thể phân huỷ sinh học. Theo một phương án khác, hệ giải phóng có kiểm soát hoặc kéo dài có thể được đặt gần đích phòng ngừa hoặc điều trị, do đó chỉ cần một phần của liều lượng toàn thân

(xem, ví dụ, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Hệ giải phóng có kiểm soát được thảo luận tổng quan bởi Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Kỹ thuật bất kỳ đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể được sử dụng để tạo ra chế phẩm giải phóng kéo dài chứa một hoặc nhiều chất điều trị theo sáng chế. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,526, 938, Công bố PCT WO 91/05548, Công bố PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, và Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760, mỗi tài liệu trong số này được kết hợp vào bản mô tả này để tham khảo.

Theo phương án cụ thể, trong đó dược phẩm theo sáng chế là axit nucleic mã hóa cho chất phòng ngừa hoặc điều trị, axit nucleic này có thể được dùng *in vivo* để thúc đẩy sự biểu hiện của chất phòng ngừa hoặc điều trị được mã hoá của nó, bằng cách tạo cấu trúc nó dưới dạng một phần của vật truyền biểu hiện axit nucleic thích hợp và sử dụng nó sao cho nó trở thành nội bào, ví dụ, bằng cách sử dụng vật truyền retrovirut (xem Patent Mỹ số 4,980,286), hoặc bằng cách tiêm trực tiếp, hoặc bằng cách sử dụng phương pháp bắn vi hạt (ví dụ, súng bắn gen; Biolistic, Dupont), hoặc bọc bằng lipit hoặc các thụ thể bề mặt tế bào hoặc các chất chuyển nhiễm, hoặc bằng cách sử dụng nó trong liên kết với peptit giống homeobox mà được biết là đi vào trong nhân (xem, ví dụ, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Theo cách khác, axit nucleic có thể được đưa vào nội bào và được kết hợp trong ADN tế bào chủ để biểu hiện bằng sự tái tổ hợp tương đồng.

Dược phẩm theo sáng chế được tạo chế phẩm để tương thích với đường dùng dự định của nó. ví dụ về các đường dùng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong tĩnh mạch, trong da, dưới da, qua miệng, trong mũi (ví dụ,

xông), qua da (ví dụ, tại chỗ), qua niêm mạc và trực tràng. Theo một phương án cụ thể, dược phẩm được tạo chế phẩm phù hợp với các quy trình thông thường dưới dạng dược phẩm được làm cho phù hợp với việc dùng trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, qua miệng, trong mũi, hoặc tại chỗ cho người. Thông thường, dược phẩm để dùng trong tĩnh mạch là dung dịch trong đệm chứa nước đẳng trương vô trùng. Khi cần thiết, dược phẩm này cũng có thể có chứa chất làm tan và gây tê cục bộ như lignocamne để giảm đau ở vị trí tiêm.

Nếu dược phẩm theo sáng chế được sử dụng tại chỗ, dược phẩm này có thể được tạo chế phẩm dưới dạng thuốc mỡ, kem, cao dán da, thuốc xức, gel, dầu gội đầu, thuốc xịt, sol khí, dung dịch, nhũ tương hoặc các dạng khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Đối với các dạng liều tại chỗ không phun được, thường sử dụng các dạng từ nhớt đến bán rắn hoặc rắn chứa chất mang hoặc một hoặc nhiều tá dược phù hợp với việc sử dụng tại chỗ và tốt hơn nếu có độ nhớt động học cao hơn so với nước. Các chế phẩm thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch, huyền phù, nhũ tương, kem, thuốc mỡ, bột, dầu xoa, dầu cao, và chế phẩm tương tự, mà nếu cần sẽ được khử trùng hoặc trộn với các chất phụ trợ (ví dụ, chất bảo quản, chất ổn định, chất làm ướt, chất đệm hoặc muối) để ảnh hưởng đến các tính chất khác nhau, ví dụ như áp suất thẩm thấu. Các dạng liều tại chỗ thích hợp khác bao gồm các chế phẩm sol khí có thể phun được, trong đó thành phần hoạt tính, tốt hơn là ở dạng kết hợp với chất mang trơ rắn hoặc lỏng, được đóng gói trong hỗn hợp với chất dễ bay hơi được nén (ví dụ, chất đẩy khí, chẳng hạn như freon) hoặc trong chai nén. Chất giữ ẩm hoặc chất làm ẩm cũng có thể được thêm vào dược phẩm và dạng liều lượng nếu muốn. ví dụ về các thành phần bổ sung này đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Nếu phương pháp theo sáng chế bao gồm việc sử dụng dược phẩm qua đường trong mũi, dược phẩm này có thể được bào chế dưới dạng sol khí, phun, sương hoặc ở dạng giọt. Cụ thể, các chất phòng ngừa hoặc điều trị để sử dụng theo sáng chế có thể được phân phối thuận tiện ở dạng trình bày phun sol khí từ các gói nén hoặc máy xông, có sử dụng chất đẩy phù hợp (ví dụ, điclođiflometan, tricloflometan, điclotetrafloetan, cacbon đioxit hoặc khí thích hợp khác). Trong trường hợp sol khí được tạo áp đơn vị

liều lượng có thể được xác định bằng cách bố trí van để phân phối lượng đã được đo. Viên nén và hộp chứa (được tạo thành từ, ví dụ, gelatin) để sử dụng trong ống xông hoặc khí cụ bơm có thể được pha chế có chứa hỗn hợp bột của hợp chất và bazơ bột thích hợp như lactoza hoặc tinh bột.

Nếu phương pháp theo sáng chế bao gồm việc sử dụng qua đường miệng, các hợp phần có thể được bào chế để dùng qua đường miệng ở dạng viên nén, viên nang, viên nhện, nắp gel, dung dịch, huyền phù, và dạng tương tự. Viên nén hoặc viên nang có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường với các tá dược dược dụng như các chất kết dính (ví dụ, tinh bột ngô được hồ hóa sơ bộ, polyvinylpyroliđon, hoặc hyđroxypropyl metylxenluloza); chất độn (ví dụ, lactoza, xenluloza vi tinh thể, hoặc canxi phosphat); chất làm trơn (ví dụ, magie stearat, bột talc, hoặc silic oxit); chất phân rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột glycolat); hoặc chất làm ướt (ví dụ, natri lauryl sulphat). Viên nén có thể được phủ bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Các chế phẩm dạng lỏng để sử dụng theo đường miệng có thể ở dạng, nhưng không giới hạn ở, dung dịch, xirô hoặc huyền phù, hoặc chúng có thể được trình bày dưới dạng sản phẩm khô để hòan nguyên bằng nước hoặc tá dược lỏng thích hợp khác trước khi sử dụng. Các chế phẩm lỏng này có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường với các chất phụ gia dược dụng chẳng hạn như chất tạo huyền phù (ví dụ, sirô sorbitol, dẫn xuất xenluloza, hoặc mỡ ăn được được hyđro hóa); chất nhũ hoá (ví dụ, lexithin hoặc acacia); tá dược lỏng không chứa nước (*ví dụ*dầu hạnh nhân, este dầu, rượu etyl, hoặc các loại dầu thực vật đã phân đoạn); và chất bảo quản (ví dụ, metyl hoặc propyl-p-hyđroxybenzoat hoặc axit sorbic). Các chế phẩm cũng có thể chứa muối đệm, chất tạo hương vị, chất tạo màu, và chất tạo ngọt nếu phù hợp. Các chế phẩm dùng qua đường miệng có thể được bào chế thích hợp để giải phóng chậm, giải phóng có kiểm soát, hoặc giải phóng kéo dài (các) chất phòng ngừa hoặc điều trị.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng theo đường phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng ống hít hoặc máy xông, của hợp phần được tạo chế phẩm với chất tạo sol khí. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,019, 968, 5,985, 320, 5, 985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,555,913, 5,290,540, và 4,880,078; và Công bố PCT số WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, và WO 99/66903, mỗi tài liệu trong số này được kết hợp vào bản mô tả này để tham khảo. Theo phương án cụ thể, kháng thể theo

sáng chế, liệu pháp kết hợp, và/hoặc dược phẩm theo sáng chế được sử dụng bằng cách sử dụng công nghệ phân phối thuốc qua đường phổi của Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm bước dùng hợp phần được tạo chế phẩm để dùng ngoài được tiêu hóa bằng cách tiêm (ví dụ, bằng cách tiêm nhanh liều đơn hoặc truyền liên tục). Chế phẩm để tiêm có thể được trình bày ở dạng liều đơn (ví dụ, trong ampun hoặc trong các vật chứa nhiều liều) với chất bảo quản bổ sung. Các hợp phần có thể có dạng bất kỳ chẳng hạn như huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong tá dược dầu hoặc nước, và có thể chứa các tác nhân điều chế chẳng hạn như chất tạo huyền phù, chất làm ổn định và/hoặc chất làm phân tán. Ngoài ra, thành phần hoạt tính có thể ở dạng bột để hòan nguyên với tá dược lỏng thích hợp (ví dụ, nước không gây sốt tiệt trùng) trước khi sử dụng.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn chứa bước dùng hợp phần được tạo chế phẩm dưới dạng chế phẩm vật chứa. Các chế phẩm tác động lâu này có thể được dùng bằng cách cấy ghép (ví dụ, dưới da hoặc trong cơ) hoặc tiêm trong cơ. Do đó, ví dụ, các hợp phần có thể được tạo chế phẩm bằng nguyên liệu polyme hoặc kỵ nước thích hợp (ví dụ, dưới dạng nhũ tương trong dầu có thể chất nhận được) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc dưới dạng dẫn xuất ít tan (ví dụ, dưới dạng muối ít tan).

Phương pháp theo sáng chế bao gồm bước dùng hợp phần được tạo chế phẩm dưới dạng trung tính hoặc muối. Các muối dược dụng bao gồm các muối được tạo thành với anion chẳng hạn như axit clohyđric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, v.v. và các muối được tạo thành với cation chẳng hạn như các muối được tạo dẫn xuất từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hyđroxit, isopropylamin, trietylamin, 2-etylamino etanol, histiđin, procain, v.v.

Nhìn chung, các thành phần của các hợp phần được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn với nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ như, dưới dạng bột được làm đông lạnh khô hoặc chất cô không chứa nước trong vật chứa kín khít chẳng hạn như ampun hoặc túi xác định lượng hoạt chất. Khi phương thức sử dụng là truyền, hợp phần có thể được làm phân tán bằng chai truyền có chứa nước hoặc nước muối loại dùng cho dược phẩm tiệt

trùng. Khi phương thức sử dụng là tiêm, ampun của nước tiệt trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi sử dụng.

Cụ thể, sáng chế cũng đề xuất một hoặc nhiều tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị, hoặc dược phẩm theo sáng chế được đóng gói trong vật chứa kín khít như ampun hoặc túi xác định lượng chất. Theo một phương án, một hoặc nhiều tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị, hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp dưới dạng bột đông khô tiệt trùng khô hoặc chất cô không chứa nước trong vật kín khít và có thể được hòan nguyên (ví dụ, với nước hoặc nước muối) đến nồng độ thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Tốt hơn là, một hoặc nhiều tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp dưới dạng bột đông khô tiệt trùng khô trong vật chứa kín khít ở liều lượng ít nhất là 5 mg, tốt hơn là ít nhất 10 mg, ít nhất 15 mg, ít nhất 25 mg, ít nhất 35 mg, ít nhất 45 mg, ít nhất 50 mg, ít nhất 75 mg, hoặc ít nhất 100 mg. Tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị đông khô hoặc dược phẩm theo sáng chế cần được lưu giữ ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu của chúng và các tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế phải được dùng trong vòng 1 tuần, tốt nhất là trong vòng 5 ngày, trong vòng 72 giờ, trong vòng 48 giờ, trong vòng 24 giờ, trong vòng 12 giờ, trong vòng 6 giờ, trong vòng 5 giờ, trong vòng 3 giờ hoặc trong vòng 1 giờ sau khi được hòan nguyên. Theo phương án thay thế, một hoặc nhiều tác nhân phòng ngừa hoặc điều trị hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp ở dạng lỏng trong vật chứa kín khít cho biết lượng và nồng độ của tác nhân này. Tốt hơn là, dạng lỏng của hợp phần được dùng được cung cấp trong vật chứa kín khít ít nhất là 0,25 mg/ml, tốt hơn là ít nhất 0,5 mg/ml, ít nhất 1 mg/ml, ít nhất 2,5 mg/ml, ít nhất 5 mg/ml, ít nhất là 8 mg/ml, ít nhất là 10 mg/ml, ít nhất là 15 mg/ml, ít nhất là 25 mg/ml, ít nhất là 50 mg/ml, ít nhất 75 mg/ml hoặc ít nhất 100 mg/ml. Dạng lỏng nên được lưu trữ ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu của nó.

Các kháng thể và các phần kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Tốt hơn là, kháng thể hoặc phần kháng thể được điều chế dưới dạng dung dịch có thể tiêm chứa 0,1-250 mg/ml kháng thể. Dung dịch có thể tiêm này có thể chứa dạng liều lượng lỏng hoặc đông khô trong lọ bằng đá lửa hoặc hổ phách, ampun hoặc ống tiêm nhồi sẵn. Chất đệm có thể là L-histiđin (1-50 mM), tối ưu là 5-10 mM, độ pH từ 5,0 đến 7,0 (tối ưu là pH 6,0). Chất đệm thích hợp

khác bao gồm nhưng không giới hạn ở, natri sucxinat, natri xitrat, natri phosphat hoặc kali phosphat. Natri clorua có thể được sử dụng để làm biến đổi độc tính của dung dịch ở nồng độ bằng 0-300 mM (tối ưu là 150 mM đối với dạng liều lượng lỏng). Chất bảo vệ lạnh có thể được bao gồm trong dạng liều lượng đông khô, chủ yếu là 0 đến 10% sucroza (tối ưu là từ 0,5 đến 1,0%). Chất bảo vệ lạnh thích hợp khác bao gồm trehaloza và lactoza. Chất tạo khối có thể được bao gồm trong dạng liều lượng đông khô, chủ yếu là manitol từ 1 đến 10% (tối ưu là từ 2 đến 4%). Chất làm ổn định có thể được sử dụng cả ở dạng liều lượng lỏng và đông khô, chủ yếu là L-Methionin từ 1 đến 50 mM (tối ưu là từ 5 đến 10 mM). Chất tạo khối thích hợp khác bao gồm glyxin, arginin, có thể được bao gồm dưới dạng polysorbat 80 từ 0 đến 0,05% (tối ưu là 0,005-0,01%). Các chất hoạt động bề mặt bổ sung bao gồm nhưng không giới hạn ở các chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 và BRIJ. Dược phẩm có chứa kháng thể và phần kháng thể theo sáng chế được điều chế dưới dạng dung dịch tiêm được để dùng ngoài đường tiêu hóa, có thể còn chứa tác nhân hữu dụng làm chất bổ trợ, như các chất được sử dụng để làm tăng độ hấp thụ, hoặc độ phân tán của protein trị liệu (ví dụ, kháng thể). Chất bổ trợ đặc biệt hữu dụng là hyaluroniđaza, như HYLENEX (hyaluroniđaza ở người tái tổ hợp). Việc bổ sung hyaluroniđaza trong dung dịch tiêm làm cải thiện sinh khả dụng ở người sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể là dùng dưới da. Nó cũng cho phép thể tích vị trí tiêm lớn hơn (*tức là* lớn hơn 1 ml) với ít đau đớn và khó chịu hơn, và tỉ lệ phản ứng tại vị trí tiêm giảm thiểu. (xem WO2004078140, US2006104968 được kết hợp trong bản mô tả này chỉ để tham khảo).

Theo một phương án, sáng chế bao gồm dược phẩm có chứa kháng thể theo sáng chế, ví dụ, kháng thể Ab102, histiđin và polysorbat, ví dụ, polysorbat 80. Theo một phương án, sáng chế bao gồm dược phẩm chứa kháng thể chứa chuỗi nặng có chứa các axit amin của SEQ ID NO: 41 và chuỗi nhẹ có chứa các axit amin của SEQ ID NO: 40, histiđin và polysorbat, ví dụ, polysorbat 80. Theo phương án nhất định, dược phẩm được làm đông khô.

Hợp phần theo sáng chế có thể có nhiều dạng khác nhau. Chúng bao gồm, ví dụ, dạng liều lượng lỏng, bán rắn và rắn, chẳng hạn như dung dịch lỏng (ví dụ, dung dịch tiêm được và truyền được), dịch phân tán hoặc huyền phù, viên nén, viên tròn, bột, liposom và thuốc đạn. Dạng được ưu tiên phụ thuộc vào phương thức sử dụng và việc

sử dụng để điều trị dự kiến. Các hợp phần được ưu tiên tiêu biểu ở dạng dung dịch tiêm được hoặc truyền được, chẳng hạn như hợp phần tương tự với hợp phần dùng để gây miễn dịch thụ động của người bằng các kháng thể khác. Phương thức sử dụng được ưu tiên là dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong màng bụng, trong cơ). Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể được dùng bằng cách tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch. Theo một phương án khác được ưu tiên, kháng thể được dùng bằng cách tiêm trong cơ hoặc dưới da.

Các hợp phần trị liệu thường phải tiệt trùng và ổn định trong điều kiện sản xuất và lưu trữ. Hợp phần này có thể được tạo chế phẩm dưới dạng dung dịch, vi nhũ tương, dịch phân tán, liposom hoặc các cấu trúc được sắp xếp theo thứ tự khác với nồng độ thuốc cao. Các dung dịch tiêm được tiệt trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp các hợp chất hoạt tính (*tức là*, kháng thể hoặc phần kháng thể) với lượng yêu cầu trong dung môi thích hợp với một hoặc dạng kết hợp của các thành phần được liệt kê ở trên, theo yêu cầu, sau đó là khử trùng lọc. Nhìn chung, dịch phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hoạt chất vào tá dược lỏng tiệt trùng mà chứa môi trường phân tán bazơ và các thành phần cần thiết khác từ các chất được liệt kê ở trên. Trong trường hợp của bột đông khô, tiệt trùng để điều chế dung dịch tiêm tiệt trùng, phương pháp điều chế được ưu tiên là làm khô trong chân không và phun khô mà tạo ra bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch đã được lọc tiệt trùng từ trước của chúng. Độ lỏng thích hợp của dung dịch có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất phủ chẳng hạn như lexithin, bằng cách duy trì cỡ hạt yêu cầu trong trường hợp của dịch phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Sự hấp thụ kéo dài của dược phẩm tiêm được có thể được tạo ra bằng cách bao gồm, trong dược phẩm, chất mà làm chậm sự hấp thụ, ví dụ như, muối monostearat và gelatin.

Kháng thể và phần kháng thể theo sáng chế có thể được dùng bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực, mặc dù đối với nhiều ứng dụng điều trị, đường dùng/phương thức dùng được ưu tiên là tiêm dưới da, tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng, đường dùng và/hoặc phương thức dùng sẽ thay đổi tùy thuộc vào kết quả mong muốn. Theo các phương án nhất định, hợp chất hoạt tính có thể được điều chế với chất mang mà bảo vệ hợp chất chống lại sự giải phóng nhanh, chẳng hạn như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm vật cấy ghép, miếng

dán qua da, và hệ phân phối được vi bao nang. Polyme sinh học có thể phân hủy sinh học, như etylen vinyl axetat, polyanhyđrit, axit polyglycolic, colagen, polyorthoeste và axit polylactic. Nhiều phương pháp để điều chế các chế phẩm này được cấp bằng sáng chế hoặc đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, ví dụ với chất pha loãng trơ hoặc chất mang ăn được có thể đồng hóa. Hợp chất (và các thành phần khác, nếu muốn) cũng có thể được bao trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, nén thành viên nén, hoặc kết hợp trực tiếp vào chế độ ăn của đối tượng. Để dùng để trị liệu theo đường miệng, các hợp chất này có thể được kết hợp với tá dược và được sử dụng ở dạng viên nén tiêu hóa được, viên nén má, viên ngậm dẹp, viên nang, cồn ngọt, nhũ tương, sirô, viên nhện, và dạng tương tự. Để dùng hợp chất theo sáng chế bằng cách khác ngoài cách dùng ngoài đường tiêu hóa, có thể cần phải phủ hỗn hợp bằng, hoặc đồng sử dụng hợp chất này với, nguyên liệu để ngăn chặn sự bất hoạt của nó.

Trong các phương án khác, kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với các loại dựa trên polyme sao cho các loại dựa trên polyme này có thể tạo ra kích thước đủ đối với kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế sao cho kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế hưởng lợi từ tính thẩm thấu và tác dụng duy trì được tăng cường (tác dụng EPR) (Xem thêm Công bố PCT số WO2006/042146A2 và Công bố Mỹ Số 2004/0028687A1, 2009/0285757A1, và 2011 / 0217363A1, và Patent Mỹ số 7,695,719 (mỗi tài liệu được kết hợp ở đây chỉ để tham khảo).

Các hợp chất có hoạt tính bổ sung cũng có thể được kết hợp vào các hợp phần này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phần kháng thể theo sáng chế được tạo chế phẩm với và/hoặc được đồng sử dụng với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung mà hữu dụng để điều trị rối loạn, trong đó hoạt tính CD40 là có hại. ví dụ, kháng thể kháng hCD40 hoặc phần kháng thể theo sáng chế có thể được tạo chế phẩm và/hoặc đồng sử dụng với một hoặc nhiều kháng thể bổ sung mà liên kết với các đích khác (ví dụ, các kháng thể liên kết xytokin hoặc liên kết các phân tử bề mặt tế bào). Hơn nữa, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với hai hoặc nhiều

hơn hai chất trị liệu nói trên. Các liệu pháp kết hợp như vậy có thể sử dụng theo cách có lợi các liều lượng thấp hơn của các thuốc trị liệu được dùng, do đó tránh được các độc tính có thể có hoặc các biến chứng liên quan đến các liệu pháp đơn trị liệu khác nhau.

Theo các phương án nhất định, kháng thể đối với CD40 hoặc mảnh của chúng được liên kết với tá dược lỏng kéo dài thời gian bán thải đã biết trong lĩnh vực. Các tá dược lỏng này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, miền Fc, polyetylen glycol, và đextran. Tá dược lỏng này được mô tả, ví dụ, trong Đơn Mỹ số 09 / 428,082 và Đơn PCT đã công bố số WO 99/25044, được đưa vào đây để tham khảo cho bất kỳ mục đích nào.

Theo một phương án cụ thể, các trình tự axit nucleic chứa các trình tự nucleotit mã hóa cho kháng thể theo sáng chế hoặc chất phòng ngừa hoặc điều trị khác theo sáng chế được sử dụng để điều trị, ngăn ngừa, kiểm soát hoặc làm cho tốt hơn rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó bằng liệu pháp gen. Liệu pháp gen là phương pháp điều trị được thực hiện bằng cách dùng cho đối tượng axit nucleic có thể biểu hiện hoặc đã được biểu hiện. Theo phương án này của sáng chế, các axit nucleic tạo ra kháng thể được mã hoá của chúng hoặc các chất phòng ngừa hoặc điều trị theo sáng chế nhằm làm trung gian cho tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị.

Bất kỳ phương pháp nào đối với liệu pháp gen có sẵn trong lĩnh vực cũng có thể được sử dụng theo sáng chế. Tổng quan chung về các phương pháp liệu pháp gen, xem Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993); và Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Các phương pháp phổ biến trong lĩnh vực công nghệ tái tổ hợp ADN mà có thể được sử dụng được mô tả trong Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley &Sons, NY (1993); và Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Mô tả chi tiết về các phương pháp liệu pháp gen khác nhau được cung cấp trong US20050042664 A1 được kết hợp ở đây chỉ để tham khảo.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng các sửa đổi và sự thích ứng thích hợp khác của các phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây là hiển nhiên và có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các dạng tương đương thích hợp mà không nằm

ngoài phạm vi của sáng chế hoặc các phương án được bộc lộ ở trong bản mô tả này. Sáng chế đã được mô tả một cách chi tiết, bây giờ sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo các ví dụ sau đây, mà được kết hợp chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1:Kháng thể đơn dòng kháng CD40 ở người (hCD40) đối kháng

Để xác định kháng thể đối kháng đặc hiệu CD40, công nghệ thể lai được sử dụng để phân lập kháng thể kháng CD40 đơn dòng ở chuột.

Một cách vắn tắt, chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên CD40 ở người và chất bổ trợ. Sau khi gây miễn dịch, mà bao gồm một vài lần sử dụng kháng nguyên trong một vài tuần, huyết thanh từ mỗi con vật được gây miễn dịch được thu lấy. Sau đó, huyết thanh được thử nghiệm bằng cách sử dụng các thử nghiệm ELISA tiêu chuẩn và đếm tế bào theo dòng để xác định huyết thanh có kháng thể mà có khả năng phát hiện CD40. Khi sự có mặt của kháng thể đặc hiệu CD40 được phát hiện trong huyết thanh chuột dựa trên các thử nghiệm liên kết, lách chuột được thu lấy và tế bào sản xuất kháng thể được phân lập theo các kỹ thuật tiêu chuẩn. Sau đó tế bào lách được dung hợp bằng các kỹ thuật đã biết để tạo thành tế bào u tủy sản xuất kháng thể. Sau khi dung hợp, thể lai được sàng lọc bằng ELISA và đếm tế bào theo dòng để xác định các đặc tính phong bế và trung hòa CD40 kháng thể khác nhau.

Sau khi sàng lọc, trong khi phần lớn các kháng thể được xác định là có hoạt tính chủ vận, ba kháng thể đơn dòng chuột (Ab1, Ab2 và Ab3) được xác định là có hoạt tính đối kháng đối với CD40 mà không có hoạt tính chủ vận đáng kể. Trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ba kháng thể chuột này được mô tả dưới đây trong các Bảng từ 7 đến 9. CDR trong các chuỗi nặng biến đổi (VH) và chuỗi nhẹ biến đổi (VL) được thể hiện bằng chữ in đậm (lần lượt là CDR1, CDR2, và CDR3).

BẢNG 7: Trình tự axit amin VH và VL của kháng thể chuột 1 (Ab1)

SEQ ID NO.	Tên dòng	Vùng Kháng Thể	Mô tả gốc	Trình tự axit amin
5	Ab1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLK VSCAAS**GFTFSDYGMN**WV RQAPEKGLEWIA**YISSGRS NIYYADTVKG**RFTISRDNA KNTLFLQMTSLRSEDTAMY YCAR**SWGYFDV**WGTGTTV TVSS
6	Ab1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:5	**GFTFSDYGMN**
7	Ab1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:5	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	Ab1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:5	**SWGYFDV**
9	Ab1	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEMV TMSC**KSSQSLLNSGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIYW **ASTRES**GVPDRFAGSGSGT DFTLTISSVQAEDLAVYYC **QNDYTYPLT**FGAGTKLEIK
10	Ab1	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:9	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	Ab1	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:9	**WASTRES**

12	Ab1	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:9	**QNDYTYPLT**

Bảng 8: Trình tự axit amin VH và VL của kháng thể chuột 3 (Ab3)

SEQ ID NO.	Tên dòng	Vùng Kháng Thể	Mô tả gốc	Trình tự axit amin
44	Ab3	VH		QVQLQQSGAELARPGASVK MSCKAF**GYTFTSYTMH**WVK QRPGQGLEWIG**YINPSSDYP NYNQKFKD**KATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCAR **WGYSFDY**WGQGTTLTVSS
45	Ab3	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:44	**GYTFTSYTMH**
46	Ab3	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:44	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	Ab3	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:44	**WGYSFDY**
48	Ab3	VL		DIVMTQAAPSVSVIPGESVSIS C**RSSKSLLHSNGNTYLY**WFL QRPGQSPQYLIY**RMSTLAS**G VPDRFSGSGSGTAFTLRISRV EAEDVGVYYC**MQHLEYPLT** FGAGTKLELK
49	Ab3	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:48	**RSSKSLLHSNGNTYLY**

50	Ab3	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:48	**RMSTLAS**
51	Ab3	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:48	**MQHLEYPLT**

Bảng 9: Trình tự axit amin VH và VL của kháng thể chuột 2 (Ab2)

SEQ ID NO.	Tên dòng	Vùng Kháng Thể	Mô tả gốc	Trình tự axit amin
75	Ab2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLK VSCAAS**GFTFSDYGMN**WV RQSPEKGLEWIA**YISSGRG NIYYADTVKG**RFTISRDNA KNTLFLQMTSLRSEDTAMY YCAR**SWGYFDV**WGTGTTV TVSS
6	Ab2	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:75	**GFTFSDYGMN**
42	Ab2	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:75	**YISSGRGNIYYADTVKG**
8	Ab2	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:75	**SWGYFDV**

SEQ ID NO.	Tên dòng	Vùng Kháng Thể	Mô tả gốc	Trình tự axit amin
76	Ab2	VL V		DIVMTQSPSSLTVTAGEKVT MSC**KSSQSLLNSGNQKNY LT**WFQQKPGQPPKLLIYW**A STRES**GVPDRFTGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAVYYC**QN DYTYPLT**FGAGTKLELK
10	Ab2	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:76	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	Ab2	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:76	**WASTRES**
12	Ab2	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:76	**QNDYTYPLT**

Các trình tự liên ứng của các vùng CDR từ ba kháng thể đơn dòng ở chuột đối kháng kháng CD40 (Ab1, Ab2 và Ab3) được xác định và được nêu ở trên trong Bảng 5. Sự sắp xếp thẳng hàng các trình tự axit amin vùng biến đổi của ba kháng thể chuột cũng được cung cấp trên Hình 4A (chuỗi nhẹ) và Hình 4B (chuỗi nặng).

Các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của chuột (VH và VL) của ba kháng thể được tách dòng bằng cách sử dụng PCR transcriptaza ngược (RT-PCR). Các vùng VH và VL này (được mô tả ở trên trong các Bảng từ 7 đến 9) sau đó được tách dòng vào các vật truyền có chứa các vùng không đổi globulin miễn dịch (Ig) của người và sau đó được biểu hiện trong các tế bào chủ động vật có vú dưới dạng kháng thể khảm. Kháng thể khảm ở người (vùng biến đổi ở chuột và không đổi ở người) sau đó được xác định đặc điểm bằng cách sử dụng thử nghiệm *in vitro* để xác định liệu mỗi kháng thể này có tác dụng đối kháng và/hoặc chủ vận hay không.

Phân tích FACS được sử dụng để xác định liệu ba kháng thể kháng CD40 khảm có thể liên kết với huCD40 hoặc CD40 ở cyno được biểu hiện trên tế bào Thận Phôi Người (HEK) hay không. Trong khi mỗi một trong ba kháng thể khảm này có thể liên kết với CD40 của người được biểu hiện trên các tế bào HEK, chỉ có hai kháng thể khảm nhận ra Kháng thể khảm cyno 3 (chAb3) không liên kết với CD40 của cyno. Kết quả của nghiên cứu liên kết FACS được tóm tắt trong Bảng 10.

Phân tích FACS cũng được sử dụng để xác định liệu ba kháng thể khảm có thể ức chế sự liên kết của phối tử CD40 hòa tan (sCD40L) với CD40 hay không. Bằng cách sử dụng tế bào HEK biểu hiện CD40, đo được giá trị IC50. Như được mô tả trong Bảng 10, mỗi kháng thể khảm có thể phong bế CD40 liên kết với phối tử của nó.

Ngoài các thử nghiệm liên kết, hoạt tính đối kháng và chủ vận được đo bằng cách sử dụng dòng tế bào báo cáo biểu hiện CD40 biểu hiện CD40 của người được liên kết với phosphataza kiềm (AP) qua trung gian NFkB. Trong thử nghiệm dòng tế bào báo cáo biểu hiện CD40, khi tín hiệu được tiếp nhận thông qua CD40, sự hoạt hóa NFkB dẫn đến sự tiết AP mà được đo bằng chất nền đo màu. Để xác định hoạt tính đối kháng, dòng tế bào báo cáo CD40 (HEK) được nuôi cấy với dòng tế bào Jurkat biểu hiện CD40L (để tạo ra tương tác phối tử sinh lý) hoặc với CD40L hòa tan*ví dụ,* His-CD40L được viện dẫn trong Bảng 10). Khả năng của kháng thể kháng CD40 để phong bế tín hiệu NFkB được đo. Để đo hoạt tính chủ vận, dòng tế bào báo cáo CD40 của người được xử lý trực tiếp bằng kháng thể kháng CD40 và tín hiệu NFkB được đo. Dữ liệu thử nghiệm đối kháng và chủ vận CD40 đại diện đối với ba kháng thể khảm được tóm tắt trong Bảng 10 và các Hình 1A và 1B.

BẢNG 10: Tóm tắt các đặc tính chức năng của kháng thể khảm kháng CD40

Kháng Thể CD40 Khảm (hCg1-LALA)	Liên kết HEK huCD40 FACS	Liên kết HEK cyCD40 FACS	Phong bế HEK CD40 FACS IC50 nM	Chất chủ vận: Thử nghiệm báo cáo	Chất đối kháng: Thử nghiệm báo cáo His-CD40L	Chất đối kháng: Thử nghiệm Jurkat/ Báo Cáo IC50 nM

				HEK huCD40	IC50 nM	
Ab1 khảm (chAb1)	Có	Có	2,3	Không	0,4	51
Ab3 khảm (chAb3)	Có	Không	1,4	Không	0,2	0,9
Ab2 khảm (chAb2)	Có	Có	1,4	Không	0,3	3,4

Như được mô tả trong Bảng 10 và Hình 1, kháng thể khảm kháng CD40 thể hiện hoạt tính đối kháng không có hoạt tính chủ vận có thể phát hiện được. Dựa trên kết quả từ các thí nghiệm trên, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ các kháng thểđối kháng kháng CD40 Ab1, và Ab3 được chọn để làm cho giống người.

Ví dụ 2:Sự làm cho giống người đối với các kháng thể kháng CD40 đối kháng Ab1 và Ab3

Sự làm cho giống người đối với kháng thể kháng CD40 đối kháng Ab1

Các kháng thể được làm cho giống như của người được tạo ra dựa trên trình tự CDR nặng biến đổi (VH) và nhẹ biến đổi (VL) của Ab1. Cụ thể, trình tự dòng mầm ở người được chọn để tạo cấu trúc kháng thể Ab1 được làm cho giống như của người, được ghép CDR, trong đó các miền CDR của các chuỗi VH và VL của Ab1 được ghép lên các trình tự chất nhận chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người khác nhau. Dựa trên sự sắp xếp thẳng hàng với các trình tự VH và VL của kháng thể đơn dòng Ab1, các trình tự ở người sau đây được chọn làm chất nhận:

1. IGHV3-21*01 và IGHJ6*01 để tạo cấu trúc trình tự chất nhận chuỗi nặng

2. IGHV3-48*01 và IGHJ6*01 làm chất nhận khác để tạo cấu trúc chuỗi nặng

3. IGKV4-1*01 và IGKJ2*01 để tạo cấu trúc trình tự chất nhận chuỗi nhẹ

4. IGKV2-40*01 và IGKJ2*01 làm chất nhận khác để tạo cấu trúc chuỗi nhẹ

Sau đó các kháng thể được ghép CDR được điều chế bằng cách ghép các CDR VH và VL tương ứng của Ab1 vào các trình tự chất nhận được mô tả trong 1-4 ở trên.

Để tạo ra kháng thể giống người với (các) đột biến ngược khung, đột biến khung được nhận dạng và được đưa vào kháng thể ghép CDR. Các đột biến này được đưa vào bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm phương pháp tổng hợp *de novo* của miền biến đổi với (các) đột biến ngược và các đoạn mồi oligonucleotit đột biến trong các phản ứng chuỗi polymeraza. Các dạng kết hợp khác nhau của đột biến ngược và các đột biến khác được tạo cấu trúc đối với mỗi kháng thể ghép CDR (chứa CDR của kháng thể Ab1) như sau. (Lưu ý: Số lượng gốc của các đột biến được đề cập dưới đây dựa trên hệ thống đánh số Kabat.)

Đối với các chuỗi nặng của kháng thể ghép CDR, một hoặc nhiều gốc phân cách Vernier và VH/VL sau đây được đột biến ngược: V48I và/hoặc S49A.

Đối với chuỗi nhẹ của kháng thể ghép CDR, các gốc phân cách Vernier và VH/VL sau đây được đột biến ngược: Y36F.

Mô tả về các vùng biến đổi của kháng thể được làm cho giống như của người có nguồn gốc từ Ab1 đơn dòng được cung cấp dưới đây:

- Ab1 (huAb1VH.1) được làm cho giống như của người là VH Ab1 được ghép CDR chứa các trình tự khung IGHV3-21*01 và IGHJ6*01;
- Ab1VH.1a (huAb1VH.1A) được làm cho giống như của người là chuỗi nặng được làm cho giống như của người có chứa các trình tự axit amin của huAb1VH.1 có hai đột biến ngược khung sau đây: V48I, S49A;
- Ab1VL.1 (huAb1VL.1) được làm cho giống như của người là VL Ab1 được ghép CDR chứa các trình tự khung IGKV4-1*01 và IGKJ2*01; và

- Ab1VL.1a (huAb1VL.1A) được làm cho giống giống người là chuỗi nhẹ được làm cho giống như của người dựa trên huAb1VL.1 và chứa 1 đột biến ngược khung được đề xuất: Y36F.

Lưu ý: IGHV3-21_IGHJ6 dùng để chỉ kháng thể chứa các trình tự biến đổi tương ứng với

IGHV3-21*01 và IGHJ6*01.

Các vùng biến đổi được làm cho giống như của người sau đó được tách dòng vào vật truyền biểu hiện IgG để xác định chức năng của bốn kháng thể được làm cho giống như của người khác nhau dựa trên các dạng kết hợp vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ sau đây:

A. huAb1VH.1/VL.1

B. huAb1VH.1A/VL.1

C. huAb1VH.1/VL.1A

D. huAb1VH.1A/VL.1A

Vùng biến đổi và các trình tự axit amin CDR của các kháng thể được làm cho giống như của người nêu trên được mô tả trong Bảng 11 dưới đây.

BẢNG 11: Các trình tự VH và VL của các phiên bản được làm cho giống như của người của kháng thể 1 (huAb1)

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
13	huAb1VH.1/VL.1 VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWVS**YISSG RSNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**SWGYFDV**WGQ GTTVTVSS

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
6	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.: 13	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.: 13	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.: 13	**SWGYFDV**
14	huAb1VH.1/VL .1 VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNSGNQKN YLT**WYQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
10	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.: 14	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.: 14	**WASTRES**
12	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:14	**QNDYTYPLT**

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
15	huAb1VH.1A/VL.1 VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWIA**YISSGR SNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**SWGYFDV**WGQG TTVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:15	**GFTFSDYGMN**
7	huAb15VH.1A/VL.1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:15	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:15	**SWGYFDV**
14	huAb1VH.1A/VL.1 VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNSGNQKN YLT**WYQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
10	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:14	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
11	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:14	**WASTRES**
12	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:14	**QNDYTYPLT**
13	huAb1VH.1/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWVS**YISSG RSNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**SWGYFDV**WGQ GTTVTVSS
6	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:13	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:13	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:13	**SWGYFDV**

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
16	huAb1VH.1/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNSGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
10	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:16	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:16	**WASTRES**
12	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:16	**QNDYTYPLT**
15	huAb1VH.1A/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWIA**YISSGR SNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**SWGYFDV**WGQG TTVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:15	**GFTFSDYGMN**

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
7	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:15	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:15	**SWGYFDV**
16	huAb1VH.1A/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNSGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
10	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:16	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:16	**WASTRES**
12	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:16	**QNDYTYPLT**

Như mô tả ở trên, CDR của các phiên bản được làm cho giống như của người của các vùng VH và VL của Ab1 giống với kháng thể Ab1 ở chuột.

Sự làm cho giống người đối với kháng thể kháng CD40 đối kháng 3 (Ab3)

Các kháng thể được làm cho giống như của người cũng được tạo ra dựa trên trình tự CDR nặng biến đổi (VH) và nhẹ biến đổi (VL) của Ab3. Các trình tự dòng mầm của người được chọn để tạo cấu trúc kháng thể Ab3 được làm cho giống như của người, được ghép CD3, trong đó các miền CDR của chuỗi VH và VL của Ab3 được ghép vào các trình tự chất nhận chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người khác nhau. Dựa trên sự sắp xếp thẳng hàng với các trình tự VH và VL của kháng thể đơn dòng Ab3, các trình tự ở người sau đây được chọn làm chất nhận:

1. IGHV3-69*06 và IGHJ6*01 để tạo cấu trúc trình tự chất nhận chuỗi nặng

2. IGHV1-18*01 và IGHJ6*01 làm chất nhận khác để tạo cấu trúc chuỗi nặng

3. IGKV2-29*02 và IGKJ2*01 để tạo cấu trúc trình tự chất nhận chuỗi nhẹ

4. IGKV2-28*01 và IGKJ2*01 làm chất nhận khác để tạo cấu trúc chuỗi nhẹ

Các kháng thể được ghép CDR được điều chế bằng cách ghép các CDR VH và VL tương ứng của Ab3 vào các trình tự chất nhận được mô tả trong 1-4 ở trên.

Để tạo ra kháng thể giống người với (các) đột biến ngược khung, một số lượng của các đột biến khung được nhận dạng và được đưa vào kháng thể ghép CDR. Các đột biến này được đưa vào bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm kỹ thuật tổng hợp *de novo* của miền biến đổi với (các) đột biến ngược và các đoạn mồi oligonucleotit đột biến trong các phản ứng chuỗi polymeraza. Các dạng kết hợp khác nhau của đột biến, bao gồm đột biến ngược, được tạo cấu trúc đối với mỗi kháng thể ghép CDR (chứa CDR của kháng thể Ab3). (Lưu ý: Số lượng gốc của các đột biến được đề cập dưới đây dựa trên hệ thống đánh số Kabat.)

Đối với các chuỗi nặng Ab3, một hoặc nhiều gốc phân cách Vernier và VH/VL sau đây được đột biến ngược: M48I, V67A, I69L. Ngoài ra, các thay đổi đối với Q1E được xem xét. Đột biến Q1E được đưa vào để ngăn ngừa sự tạo thành pyroglutamat.

Đối với các chuỗi nhẹ Ab3, một hoặc nhiều gốc phân cách Vernier và VH/VL sau đây được đột biến ngược: Y36F, L46Y.

Mô tả về các vùng biến đổi của kháng thể được làm cho giống như của người có nguồn gốc từ Ab3 đơn dòng được mô tả dưới đây:

- huAb3VH.1z là VH Ab3 được làm cho giống như của người, được ghép CDR chứa các trình tự khung IGHV1-69*06 và IGHJ6*01.
- huAb3VH.1 dựa trên huAb3VH.1z với sự thay đổi Q1E để ngăn ngừa sự tạo thành pyroglutamat
- huAb3VH.1A là thiết kế được làm cho giống như của người dựa trên huAb3VH.1 và chứa 3 đột biến ngược khung khác: M48I, V67A, I69L.
- huAb3VH.1b là thiết kế trung gian giữa huAb3VH.1 và huAb3VH.1A và chứa 1 đột biến ngược khung được đề xuất: I69L.
- huAb3VL.1 là VL Ab3 được làm cho giống như của người, được ghép CDR chứa các trình tự khung IGKV2-28*01 và IGKJ2*01.
- huAb3VL.1A là thiết kế được làm cho giống như của người dựa trên huAb3VL.1 và chứa 2 đột biến ngược khung: Y36F, L46Y.
- huAb3VL.1B là thiết kế trung gian giữa huAb3VL.1 và huAb3VL.1A. Nó chứa 1 đột biến ngược khung được đề xuất: L46Y.

Cũng lưu ý rằng * IGHV1-69_IGHJ6 được tạo thành từ các trình tự dòng mầm IGHV1-69*06 và IGHJ6*01.

Các vùng biến đổi được làm cho giống như của người được tách dòng vào vật truyền biểu hiện IgG để xác định chức năng của chín kháng thể được làm cho giống như của người khác nhau dựa trên các dạng kết hợp sau đây của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ:

A. huAb3VH.1/VL.1

B. huAb3VH.1B/VL.1

C. huAb3VH.1A/VL.1

D. huAb3VH.1/VL.1A

E. huAb3VH.1B/VL.1A

F. huAb3VH.1A/VL.1A

G. huAb3VH.1/VL.1B

H. huAb3VH.1B/VL.1B

I. huAb3VH.1A/VL.1B

Vùng biến đổi và các trình tự axit amin CDR của các kháng thể được làm cho giống như của người nêu trên được mô tả trong Bảng 12 dưới đây.

BẢNG 12. Trình tự axit amin của các vùng VH và VL của kháng thể Ab3 được làm cho giống như của người

SEQ ID NO:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
52	huAb3VH.1/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFTSYT****MH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNYNQKFK****D**RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**W****GYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:52	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:52	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:52	**WGYSFDY**

53	huAb3VH.1/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT YLY**WYLQKPGQSPQLLI Y**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:53	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
SEQ ID NO:	**Dòng**	**Vùng Kháng Thể**	**Gốc**	**Trình tự axit amin**
50	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:53	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:53	**MQHLEYPLT**
54	huAb3VH.1B/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT MH**WVRQAPGQGLEWM G**YINPSSDYPNYNQKFK D**RVTLTADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARW **GYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:54	**GYTFTSYTMH**

46	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:54	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:54	**WGYSFDY**
53	huAb3VH.1B/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT YLY**WYLQKPGQSPQLLI **YRMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:53	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:53	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:53	**MQHLEYPLT**

55	huAb3VH.1A/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFTSYT****MH**WVRQAPGQGLEWIG**YINPSSDYPNYNQKFKD**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WG****YSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:55	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:55	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:55	**WGYSFDY**
53	huAb3VH.1A/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGNT****YLY**WYLQKPGQSPQLLI**YRMSTLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:	**Dòng**	**Vùng Kháng Thể**	**Gốc**	**Trình tự axit amin**
49	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:53	**RSSKSLLHSNGNTYLY**

50	huAb37VH.1A/VL.1	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:53	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:53	**MQHLEYPLT**
52	huAb3VH.1/VL.1A	VL		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT** **MH**WVRQAPGQGLEWM **GYINPSSDYPNYNQKFK** **D**RVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARW **GYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H1	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:53	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:52	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:52	**WGYSFDY**

56	huAb3VH.1/VL .1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT YLY**WFLQKPGQSPQYLI Y**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL .1A	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:56	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1/VL .1A	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:56	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1/VL .1A	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:56	**MQHLEYPLT**
54	huAb3VH.1B/VL.1 A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT MH**WVRQAPGQGLEWM **GYINPSSDYPNYNQKFK D**RVTLTADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARW **GYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:54	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:54	**YINPSSDYPNYNQKFKD**

47	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:54	**WGYSFDY**
56	huAb3VH.1B/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT YLY**WFLQKPGQSPQYLI **YRMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:56	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:56	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:56	**MQHLEYPLT**
SEQ ID NO:	**Dòng**	**Vùng Kháng Thể**	**Gốc**	**Trình tự axit amin**

55	huAb3VH.1A/VL.1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT** **MH**WVRQAPGQGLEWIG **YINPSSDYPNYNQKFKD** RATLTADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAR**WG** **YSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:55	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:55	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:55	**WGYSFDY**
56	huAb3VH.1A/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT** **YLY**WFLQKPGQSPQYLI **YRMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:56	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb37VH.1A/VL.1A	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:56	**RMSTLAS**

51	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:56	**MQHLEYPLT**
52	huAb3VH.1/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT** **MH**WVRQAPGQGLEWM G**YINPSSDYPNYNQKFK** **D**RVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARW **GYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:52	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:52	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:52	**WGYSFDY**
57	huAb3VH.1/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT** **YLY**WYLQKPGQSPQYLI Y**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK

49	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:57	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:57	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:57	**MQHLEYPLT**
54	huAb3VH.1B/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT** **MH**WVRQAPGQGLEWM **GYINPSSDYPNYNQKFK** **D**RVTLTADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARW **GYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:54	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:54	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
SEQ ID NO:	**Dòng**	**Vùng Kháng Thể**	**Gốc**	**Trình tự axit amin**

47	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:54	**WGYSFDY**
57	huAb3VH.1B/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT YLY**WYLQKPGQSPQYLI **YRMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:57	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:57	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:57	**MQHLEYPLT**
55	huAb3VH.1A/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKAS**GYTFTSYT MH**WVRQAPGQGLEWIG **YINPSSDYPNYNQKFKD** RATLTADKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAR**WG YSFDY**WGQGTTVTVSS

45	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:55	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:55	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:55	**WGYSFDY**
57	huAb3VH.1A/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISC**RSSKSLLHSNGNT YLY**WYLQKPGQSPQYLI Y**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC**MQHLEYPLT**FG QGTKLEIK
49	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-L1	Các gốc 24-39 của SEQ ID NO.:57	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb37VH.1A/VL.1B	CDR-L2	Các gốc 55-61 của SEQ ID NO.:57	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-L3	Các gốc 94-102 của SEQ ID NO.:57	**MQHLEYPLT**

Như mô tả ở trên, CDR của các phiên bản được làm cho giống như của người của các vùng VH và VL của Ab3 giống với kháng thể Ab3 ở chuột.

Vì Ab3 không liên kết với CD40 của cyno (xem ví dụ 1), các phiên bản được làm cho giống như của người của Ab1 được chọn để phân tích thêm.

Ví dụ 3: Sự cải biến CDR1 VL của kháng thể Ab1 được làm cho giống như của người

Việc kiểm tra các trình tự kháng thể VH và VL Ab1 được làm cho giống như của người được mô tả trên đây đã xác định được motif trình tự khử amit tiềm năng (motif "NS") lộ ra trong CDR1 của chuỗi nhẹ. Vị trí motif "NS" đã được xác định có thể dẫn đến sự khử amit và sự thủy phân, và dẫn đến hợp chất trung gian sucxinimit và aspartyl ASP hoặc iso-ASP. Vì vậy, motif trình tự được thiết kế từ các trình tự CDR1 VL Ab1 được làm cho giống như của người. Việc loại bỏ motif "NS" sẽ cho phép sự sản xuất kháng thể được cải thiện.

Việc thiết kế thêm của Ab được làm cho giống như của người tạo ra sáu kháng thể khác nhau. Đáng chú ý là, bốn kháng thể giữ lại hoạt tính đối kháng, trong khi hai kháng thể trở thành kháng thể chủ vận (huAb1v4 và huAb1v3). Như được thể hiện trong Bảng 14, huAb1v4 và huAb1v3 thể hiện hoạt tính chủ vận như được xác định bởi thử nghiệm báo cáo huCD40, trong khi không thể hiện hoạt tính đối kháng như được xác định trong thử nghiệm Jurkat/Báo Cáo. Các trình tự axit amin VH và VL, cũng như là các CDR, của các kháng thể Ab1 được làm cho giống như của người biến thể (huAb1v1 đến huAb1v6) được mô tả dưới đây trong Bảng 13.

BẢNG 13. Các trình tự axit amin VH và VL của biến thể kháng thể Ab1 được làm cho giống như của người (huAb1v #)

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
13	huAb1v3	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWVS**YISSG RSNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**SWGYFDV**WGQ GTTVTVSS
6	huAb1v3	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:13	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v3	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:13	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v3	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:13	**SWGYFDV**
43	huAb1v3	VL VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNLGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
17	huAb1v3	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:43	**KSSQSLLNLGNQKNYLT**
11	huAb1v3	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:43	**WASTRES**
12	huAb1v3	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:43	**QNDYTYPLT**
15	huAb1v4	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMNW** VRQAPGKGLEWIA**YISSGR SNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**SWGYFDV**WGQG TTVTVSS
6	huAb1v4	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:15	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v4	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:15	**YISSGRSNIYYADTVKG**

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
8	huAb1v4	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:15	**SWGYFDV**
77	huAb1v4	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNPGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
74	huAb1v4	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:77	**KSSQSLLNPGNQKNYLT**
11	huAb1v4	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:77	**WASTRES**
12	huAb1v4	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:77	**QNDYTYPLT**

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
15	huAb1v5	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWIA**YISSGR SNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**SWGYFDV**WGQG TTVTVSS
6	huAb1v5	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:15	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v5	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:15	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v5	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:15	**SWGYFDV**
18	huAb1v5	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNTGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
19	huAb1v5	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:18	**KSSQSLLNTGNQKNYLT**
11	huAb1v5	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:18	**WASTRES**
12	huAb1v5	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:18	**QNDYTYPLT**
15	huAb1v6		VH	EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMNW** VRQAPGKGLEWIA**YISSGR SNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**SWGYFDV**WGQG TTVTVSS
6	huAb1v6	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:15	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v6	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:15	**YISSGRSNIYYADTVKG**

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
8	huAb1v6	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:15	**SWGYFDV**
43	huAb1v6	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNLGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
17	huAb1v6	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:43	**KSSQSLLNLGNQKNYLT**
11	huAb1v6	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:43	**WASTRES**
12	huAb1v6	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:43	**QNDYTYPLT**

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
15	huAb1v1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWIA**YISSGR SNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAR**SWGYFDV**WGQG TTVTVSS
6	huAb1v1	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:15	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v1	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:15	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v1	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:15	**SWGYFDV**
20	huAb1v1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNRGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
21	huAb1v1	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:20	**KSSQSLLNRGNQKNYLT**
11	huAb1v1	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:20	**WASTRES**
12	huAb1v1	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:20	**QNDYTYPLT**
13	huAb1v2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAAS**GFTFSDYGMN**W VRQAPGKGLEWVS**YISSG RSNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**SWGYFDV**WGQ GTTVTVSS
6	huAb1v2	CDR-H1	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:13	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v2	CDR-H2	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:13	**YISSGRSNIYYADTVKG**

SEQ ID NO.:	Dòng	Vùng Kháng Thể	Gốc	Trình tự axit amin
8	huAb1v2	CDR-H3	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:13	**SWGYFDV**
18	huAb1v2	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINC**KSSQSLLNTGNQKN YLT**WFQQKPGQPPKLLIY **WASTRES**GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVY YC**QNDYTYPLT**FGQGTKL EIK
19	huAb1v2	CDR-L1	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:18	**KSSQSLLNTGNQKNYLT**
11	huAb1v2	CDR-L2	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:18	**WASTRES**
12	huAb1v2	CDR-L3	Các gốc 95-103 của SEQ ID NO.:18	**QNDYTYPLT**

Ngoài sự cải biến của motif "NS" trong CDR1 VL, các biến thể huAb1v2 và huAb1v3 được mô tả ở trên trong Bảng 13 có các đột biến khung bổ sung trong các miền VH của chúng.

Bảng 14 dưới đây cung cấp tóm tắt về các hoạt tính liên kết, chủ vận, và đối kháng biến thể. Mô tả về các thử nghiệm có thể tìm thấy ở trên trong ví dụ 2. Motif "NS" mà đã được đột biến trong CDR1 VL được gạch chân trong Bảng 14 dưới đây. Như được mô tả trong Bảng 14, các kháng thể huAb1v4 (có đột biến "P" trong miền CDR1 VL) và huAb1v3 (chứa đột biến "L" trong miền CDR1 VL và các đột biến khung trong vùng VH) thể hiện hoạt tính chủ vận bất chấp việc có nguồn gốc từ kháng thể mẹ có hoạt tính đối kháng.

BẢNG 14: Tóm tắt trình tự và chức năng đối với các kháng thể được làm cho giống như của người dạng biến thể

Biến thể 163-2.1F2.2B5 được làm cho giống như của người	LCDR1 VL Trình tự (KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10))	Phong bế sCD40L	Chất chủ vận: thử nghiệm báo cáo huCD40 IC50 nM	Chất đối kháng: Thử nghiệm Jurkat/Báo Cáo IC50 nM
huAb1v4	KSSQSLL**NP**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 74)	Có	49	Không
huAb1v6	KSSQSLL**NL**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	Có	Không	85,0
huAb1v1	KSSQSLL**NR**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 21)	Có	Không	55
huAb1v2*	KSSQSLL**NT**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	Có	Không	>100
huAb1v5	KSSQSLL**NT**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	Có	Không	>100
huAb1v3*	KSSQSLL**NL**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	Có	79	Không

* Sự khác biệt khung khác trong VH

Kháng thể kháng CD40 huAb1v1 được làm cho giống như của người được chọn để nghiên cứu và cải tiến thêm.

Ví dụ 4: Thiết kế CDR2 HC của kháng thể kháng CD40 huAb1v1

Từ các biến thể được mô tả trong ví dụ 3, kháng thể huAb1v1 được chọn để phân tích thêm. Để cải thiện thêm hiệu lực khác của kháng thể này, biến thể của chuỗi nặng (HC) huAb1v1 được sản xuất có chứa đột biến trong miền CDR2 HC. Mười bảy biến thể bổ sung được tạo ra (được gọi là từ huAb1v1CDR2v1 đến v17). Các vùng HC biến thể được ghép cặp với LC huAb1v1 (SEQ ID NO: 20) để nghiên cứu hoạt tính để xác định hoạt tính chủ vận và đối kháng. Mười bảy chuỗi nặng biến thể được tạo ra, và các nghiên cứu hoạt tính *in vitro* cho thấy rằng nhìn chung các biến thể giữ lại hoạt tính đối kháng và hiệu lực đa dạng của chúng so với huAb1v1. Bảng 15 cho thấy mặc dù các biến thể kháng thể duy trì hoạt tính đối kháng, hiệu lực của mỗi biến thể khác nhau.

BẢNG 15: Tóm tắt chức năng đối với biến thể CDR2 HC huAb1v1.

Biến thể huAb1v1CDR2 được thiết kế	Chất đối kháng: Thử nghiệm Jurkat/Báo Cáo (IC50 nM)
huAb1v1CDR2v17	503,8
huAb1v1CDR2v16	30,15
huAb1v1CDR2v15	339,7
huAb1v1CDR2v14	21,86
huAb1v1CDR2v13	62,44
huAb1v1CDR2v12	236,1
huAb1v1CDR2v11	>1000
huAb1v1CDR2v10	23,04
huAb1v1CDR2v9	7,06

huAb1v1CDR2v8	>1000
huAb1v1CDR2v7	2,69
huAb1v1CDR2v6	>1000
huAb1v1CDR2v5	>1000
huAb1v1CDR2v4	563,4
huAb1v1CDR2v3	218,7
huAb1v1CDR2v2	>1000
huAb1v1CDR2v1	>1000

Tất cả các biến thể HC huAb1v1 bị đột biến tại vị trí S55, như được mô tả dưới đây trong Bảng 16 (vị trí 55 được gạch chân).

BẢNG 16: Trình tự axit amin của các vùng VH khác (biến thể của huAb1v1VH)

SEQ ID NO:	Dòng	VH
15 25	huAb1v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRSNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Dòng	VH
22	huAb1v1CDR2v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRTNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
23	huAb1v1CDR2v2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRDNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
24	huAb1v1CDR2v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRENIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
25	huAb1v1CDR2v4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRRNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
26	huAb1v1CDR2v5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRVNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
27	huAb1v1CDR2v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRLNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Dòng	VH
28	huAb1v1CDR2v7	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
29	huAb1v1CDR2v8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRINIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
30	huAb1v1CDR2v9	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRQNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
31	huAb1v1CDR2v10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRWNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
32	huAb1v1CDR2v11	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRMNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
33	huAb1v1CDR2v12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRKNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Dòng	VH
34	huAb1v1CDR2v13	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRHNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
35	huAb1v1CDR2v14	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRFNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
36	huAb1v1CDR2v15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRYNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
37	huAb1v1CDR2v16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRANIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
38	huAb1v1CDR2v17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRPNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

Bảng 17 dưới đây cung cấp sự so sánh của vùng CDR2 HC của các biến thể huAb1v1 được mô tả ở trên, sau khi thiết kế gốc S55 (bôi đậm/gạch chân). Vùng CDR2 VH của huAb1v1 tương ứng với các gốc axit amin 50-66 của SEQ ID NO: 15.

BẢNG 17: Sự sắp xếp thẳng hàng của các biến thể CDR2 HC huAb1v1 ở vị trí 55

Biến thể CDR2 VH	CDR2 HC SEQ ID NO:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
huAb1v1	7	Y	I	S	S	G	R	S	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v1	58	Y	I	S	S	G	R	T	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v2	59	Y	I	S	S	G	R	D	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v3	60	Y	I	S	S	G	R	E	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v4	61	Y	I	S	S	G	R	R	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v5	62	Y	I	S	S	G	R	V	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v6	63	Y	I	S	S	G	R	L	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v7	*42*	*Y*	*I*	*S*	*S*	*G*	*R*	*G*	*N*	*I*	*Y*	*Y*	*A*	*D*	*T*	*V*	*K*	*G*
huAb1v1CDR2v8	64	Y	I	S	S	G	R	I	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v9	65	Y	I	S	S	G	R	Q	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v10	66	Y	I	S	S	G	R	W	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v11	67	Y	I	S	S	G	R	M	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v12	68	Y	I	S	S	G	R	K	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v13	69	Y	I	S	S	G	R	H	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v14	70	Y	I	S	S	G	R	F	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v15	71	Y	I	S	S	G	R	Y	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v16	72	Y	I	S	S	G	R	A	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G

huAb1v1CDR2v17	**73**	**Y**	**I**	**S**	**S**	**G**	**R**	**P**	**N**	**I**	**Y**	**Y**	**A**	**D**	**T**	**V**	**K**	**G**

Vùng biến đổi chuỗi nặng huAb1v1CDR2v7 được chọn có đặc tính đặc biệt có lợi so với các biến thể khác mà được sản xuất và được mô tả ở trên trong các Bảng 15-17. Đáng chú ý là, huAb1v1CDR2v7 có đột biến trong CDR2 HC của nó được xác định là S55G.

Cụ thể, kháng thể chứa VL của kháng thể huAb1v1 (SEQ ID NO: 20; xem Bảng 13) và VH huAb1v1CDR2v7 được xác định là có hoạt tính đối kháng tăng 20X so với kháng thể huAb1v1.

VL của huAbv1 và VH của huAb1v1CDR2v7 được biểu hiện trong trường hợp của hai vùng không đổi IgG1 ở người khác nhau. Một vùng không đổi IgG1 được chọn vì chức năng tác động của nó bị giảm đi (hCg1, z, không phải là L234A, L235A hoặc LALA) và vùng không đổi IgG1 khác được chọn bởi vì cả chức năng tác động của nó bị giảm đi và nó có một bộ các đột biến làm tăng cường liên kết FcRn (hCg1, z, không phải là L234A, L235A - T250Q, M428L hoặc LALA-QL). Bảng 18 và Bảng 19 dưới đây cung cấp thông tin trình tự axit amin cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng CD40 ở người Ab101 (VL huAbv1 / VH huAb1v1CDR2v7 / hCg1/k-LALA) và Ab102 (VL huAbv1 / VH huAb1v1CDR2v7 / hCg1/k-LALA-QL). Các gốc axit amin của các CDR riêng lẻ của mỗi trình tự VH hoặc VL được chỉ ra bằng cách bôi đậm. Các vùng không đổi được gạch chân trong Bảng 19.

BẢNG 18 Trình tự axit amin VH và VL của kháng thể kháng hCD40 Ab101 và Ab102.

SEQ ID NO	Vùng protein			Trình tự
28	Ab101	**VH**		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAAS**GFTFSDYGMN**WVRQA PGKGLEWIA**YISSGRGNIYYA DTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR**SWG YFDV**WGQGTTVTVSS
6		**CDR-H1**	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:28	GFTFSDYGMN
42		**CDR-H2**	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:28	YISSGRGNIYYADTVKG
8		**CDR-H3**	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:28	SWGYFDV
20	Ab101	**VL**		DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN C**KSSQSLLNRGNQKNYLT**WF QQKPGQPPKLLIY**WASTRES**G VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIK
21		**CDR-L1**	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		**CDR-L2**	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:20	WASTRES
12		**CDR-L3**	Các gốc 85-93 của SEQ ID NO.:20	QNDYTYPLT

SEQ ID NO	Vùng protein			Trình tự
28	Ab102	**VH**		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAAS**GFTFSDYGMN**WVRQA PGKGLEWIA**YISSGRGNIYYA DTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR**SWG YFDV**WGQGTTVTVSS
6		**CDR-H1**	Các gốc 26-35 của SEQ ID NO.:28	GFTFSDYGMN
42		**CDR-H2**	Các gốc 50-66 của SEQ ID NO.:28	YISSGRGNIYYADTVKG
8		**CDR-H3**	Các gốc 99-105 của SEQ ID NO.:28	SWGYFDV
20	Ab102	**VL**		DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN C**KSSQSLLNRGNQKNYLT**WF QQKPGQPPKLLIY**WASTRES**G VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIK
21		**CDR-L1**	Các gốc 24-40 của SEQ ID NO.:20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		**CDR-L2**	Các gốc 56-62 của SEQ ID NO.:20	WASTRES
12		**CDR-L3**	Các gốc 85-93 của SEQ ID NO.:20	QNDYTYPLT

BẢNG 19. Trình tự axit amin của kháng thể kháng hCD40 Ab101 và Ab102 Chuỗi Nặng (HC) và Chuỗi Nhẹ (LC).

Dòng	SEQ ID NO:	VH
Ab101-HC	39	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTF** **SDYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRG** **NIYYADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab101-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL** **NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WA** **STRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Dòng	**SEQ ID NO:**	**VH**
Ab102-HC	41	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTF SDYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRG NIYYADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
Ab102-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WA STRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Ví dụ 5:Sự xác định đặc điểm chức năng của các kháng thể kháng hCD40 đối kháng được làm cho giống như của người Ab101 và Ab102

Phân tích in vitro

Các kháng thể kháng CD40 được làm cho giống như của người Ab101 và Ab102 đều thể hiện hoạt tính đối kháng tương tự như phát hiện trong thử nghiệm báo cáo được mô tả trong ví dụ 1. Vì hoạt tính chủ vận còn lại có liên quan đến rủi ro tiềm ẩn, thử nghiệm chủ vận tế bào B được phát triển. Trong thử nghiệm này, các kháng thể được đánh giá về sự ức chế của sự điều hòa tăng CD86 trong tế bào B ở người. Các tế bào B ở người chủ yếu biểu hiện CD40 và truyền tín hiệu qua CD40 dẫn đến sự hoạt hóa tế bào B như đo được bằng sự điều hòa tăng của CD86 trên bề mặt. Các tế bào B được hoạt hóa bằng liều lượng thấp kháng IgM và kháng thể IL4 và CD40 được thêm vào. Sự tăng cường của sự hoạt hóa tế bào B được đo dưới dạng sự điều hòa tăng của CD86, mà được quan sát thấy trong sự có mặt của CD40 chủ vận chứ không phải là Ab CD40 đối kháng gợi ý hoạt tính chủ vận không thể phát hiện được của ứng viên đứng đầu *in vitro*. Để đo hoạt tính đối kháng, các tế bào B ở người sơ cấp được nuôi cấy với dòng tế bào T ở người biểu hiện CD40L mà dẫn đến sự hoạt hóa tế bào B và sự điều hòa tăng của sự biểu hiện CD86 thông qua tương tác CD40/CD40L. Khả năng của CD40 đối kháng để ức chế sự điều hòa tăng CD86 của các tế bào B ở người sơ cấp được đo và thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh của kháng thể kháng CD40 Ab101, như thể hiện trên Hình 2B. Hình 2A cho thấy rằng kháng thể Ab101 không có hoạt tính chủ vận. Đáng chú ý là, như được mô tả trên Hình 2B, kháng thể Ab101 có giá trị IC_{50} bằng 1,337 so với kháng thể đối kháng Blb (Boehringer Ingelheim) có giá trị IC_{50} bằng 4,213 và kháng thể chủ vận AD11 (Astellas) mà có giá trị IC_{50} bằng 0,1906. Do đó, kháng thể Ab101 (và Ab102 cho các vùng biến đổi giống nhau) là chất đối kháng mạnh của CD40 và cho thấy không có hoạt tính đối kháng *in vitro* .

Phân tích in vivo

Để thử nghiệm hoạt tính *in vivo* của kháng thể Ab101, mô hình tạo ra kháng thể người và sự sống sót của tế bào B được thiết lập. Một cách vắn tắt, khi các PBMC của người được phân lập từ người cho khỏe mạnh được chuyển vào con chuột bị suy giảm miễn dịch *scid*, việc tạo ra IgG của người đáp ứng lại các kháng nguyên chuột có thể đo được vào 14 ngày sau đó. Ngoài ra, phân tích FACS của tế bào lách từ những con chuột này chỉ ra sự ghép và sự sống sót của tế bào B ở người. Đáp ứng đặc hiệu kháng nguyên được đo bằng cách bao gồm thử thách với vắc xin tetanus toxoid (TetTox) và đo IgG đặc hiệu kháng TetTox (Naito, 2000; Jeurissen, 2004).

Việc điều trị các con chuột hu*scid* bằng liều lượng hàng tuần của kháng CD40 ở người (Ab101, 5 mg/kg IP) dẫn đến sự ức chế > 85% của sự sản xuất IgG ở người (Hình 3A) và sự sống sót của tế bào B (Hình 3B), chứng tỏ một cách rõ ràng kháng thể này có hoạt tính *in vivo*. Cụ thể, Hình 3A cho thấy rằng kháng thể Ab101 có thể ức chế sự sản xuất IgG so với đối chứng Ig, và Hình 3B chỉ ra rằng việc sử dụng kháng thể Ab101 trong mô hình hu*scid* nêu trên ức chế sự sống sót của tế bào B.

Ví dụ 6:Phân tích Epitop của Fab Ab102

Bằng cách sử dụng Fab Ab102, các nghiên cứu tinh thể được thực hiện để xác định epitop mà Fab Ab101 liên kết với. Như mô tả ở trên, các trình tự VH và VL của các kháng thể Ab101 và Ab102 đều giống nhau, và do đó, việc sử dụng Fab Ab102 trong nghiên cứu cấu trúc tinh thể sau đây là đại diện cho các đặc tính liên kết của cả hai kháng thể Ab101 và Ab102.

Các cấu trúc tinh thể được xác định cho Fab Ab102 một mình và cho Ab101 Fab phức hợp với kháng nguyên CD40. Đã thu được tinh thể và dữ liệu được thu thập ở chùm dòng IMCA-CAT 17ID. Cấu trúc tinh thể của Fab Ab102 được phân giải đến độ phân giải 1,74 Å và cấu trúc phức hợp Fab/CD40 Ab102 được phân giải đến độ phân giải 2,84 Å. Cấu trúc tinh thể tạo ra nhận dạng của các epitop cấu hình 3D của Fab Ab102.

Nhận dạng của epitop cấu hình 3D của Fab Ab102

Sự tiếp xúc giữa Fab Ab102 và CD40 bao gồm cả hai liên kết hydro thiết yếu và tương tác kị nước mà làm ổn định mặt phân cách. Danh sách các tiếp xúc phân tử (đo dưới 4,0 Å) được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình NCONT trong bộ chương trình CCP4. Sự tiếp xúc được đo giữa hai monome CD40 tinh thể riêng rẽ và các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương ứng của Fab Ab102. Các tiếp xúc khác được quan sát giữa Fab Ab102 và đime CD40 kết tinh (đime tạo ra bởi sự tiếp xúc tinh thể). Dựa trên thông tin này, epitop của liên kết Fab Ab102 có chứa vùng định hình được xác định bởi Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99, Thr24-Cys37 của CD40.

Nguyên Liệu và Phương Pháp

Điều chế và tinh chế kháng nguyên CD40:

Trình tự ADN mã hóa cho miền ngoại bào CD40 của người (các axit amin 1-193) được tách dòng vào vật truyền pHybE sau đó là vị trí phân cắt Tev proteaza ở đầu tận cùng C trong khung và đuôi hexahistiđin (SEQ ID NO: 115). Plasmit được chuyển vào tế bào HEK293 6e (MRL) ở 1x10e6 tế bào/ml bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nạp Polyetylenimin (PEI, Polysciences Inc) ở tỷ lệ PEI: ADN bằng 4:1. Nuôi cấy tế bào được chuyển nạp với trypton-N1 (đến 0,5%) ở 24 giờ sau khi chuyển nạp. Vào ngày 7 sau khi chuyển nạp, môi trường nuôi cấy tế bào đã chuyển nạp được làm sạch bằng ly tâm sau đó lọc qua bộ lọc PES 0,2u (Corning). Môi trường đã được làm sạch được trao đổi đệm với PBS, độ pH 7,4 bằng cách sử dụng hệ thống Kvick TFF được lắp với màng 10 kDa (GE Healthcare) và tải lên cột HisTrap FF 5 ml (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng PBS, độ pH 7,4. Cột được rửa bằng imiđazol 25 mm trong PBS, pH 7,4 và protein đã được liên kết được rửa giải bằng 250 mM imiđazol trong PBS, độ pH 7,4. Protein đã rửa giải được cô bằng cách sử dụng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15 (Millipore) với sự cắt khối lượng phân tử 10kDa và tinh chế thêm bằng SEC trên cột 26/60 Superdex(GE Healthcare) được cân bằng và được chạy với PBS, độ pH 7,4. Các phân đoạn chứa CD40 được gom lại, nồng độ đo bằng độ hấp thụ ở 280 nm, và các mẫu được phân tích bằng SEC, SDS-PAGE, và quang phổ khối. [CD40(h)(21-193)]-Tev-His6 ("His6" được bộc lộ dưới dạng SEQ ID NO: 115) được lưu trữ trong các phần phân ước ở nhiệt độ – 80° C.

Điều chế và tinh chế mảnh Fab Ab102 CD40:

Mảnh Fab của Ab102 CD40 được điều chế bằng cách phân cắt bằng papain của mAb mẹ như được mô tả chi tiết dưới đây. Papain được hoạt hóa bằng 50mM xystein trong PBS, chất đệm 7,4. mAb CD40 Ab102 [hu IgG1/k] LALA QL trong PBS, chất đệm pH 7,4 được trộn với papain ở tỉ lệ khối lượng 1:100 của papain so với mAb và được ủ trong 1 giờ ở 37° C. Phản ứng được làm dừng bằng 5 mM iođoaxetamit. Hỗn hợp được tinh chế trên 10 ml nhựa Mab SelectSure (GE Healthcare), nơi mà mảnh Fab được thu lấy khi dòng chảy đi qua. Dòng chảy đi qua được cô bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm Ultrafree-15 Biomax cắt khối lượng phân tử 10kDa (MWCO) (Millipore). Hỗn hợp đã cô được tinh chế trên cột 2,6 cm x 60 cm Sephacryl 200 HiPrep (GE Healthcare) được cân bằng trước trong 50mM HEPES, 50mM NaCl, chất đệm pH 7,5. Các phân đoạn có chứa mảnh Fab (được theo dõi bằng độ hấp thụ UV ở 280 nm) được gom lại và

làm đông lạnh ở -80° C. Độ tinh khiết mẫu được đánh giá SEC phân tích, SDS-PAGE và quang phổ khối.

Điều chế phức hợp CD40/CD40 Fab Ab102:

CD40 của người tái tổ hợp được biểu hiện trong hệ thống biểu hiện của động vật có vú và sau đó được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Protein CD40 và CD40 Ab102 của người tái tổ hợp được trộn ở tỉ lệ mol 1,1:1 và ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C. Mẫu phức tạp được tải lên cột 2,6 cm x 60 cm Sephacryl 200 HiPrep (GE Healthcare) được cân bằng trước trong 50mM HEPES, 50mM NaCl, chất đệm pH 7,5 ở 1 ml/phút. Các phân tử chứa phức hợp (được theo dõi bằng độ hấp thụ UV ở 280 nm) được gom lại và được cô thành 18 mg/ml bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm Ultrafree-15 Biomax cắt khối lượng phân tử 10kDa (MWCO) (Millipore). Độ tinh khiết mẫu được đánh giá bằng SEC phân tích và SDS-PAGE.

Sự kết tinh Fab Ab102:

Một mình Fab được cung cấp ở 22,5 mg/ml trong 50mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7,5. Tinh thể phát triển bằng cách khuếch tán hơi ở nhiệt độ 23°C. Vật chứa chứa 25% (khối lượng/thể tích) PMME 550, 0,1M MES pH 6,5, 0,01M kẽm sulfat. Giọt được tạo ra bằng cách bổ sung lượng ngang bằng của protein và dung dịch dự trữ. Tinh thể phát triển dưới dạng lăng trụ dày và được bảo vệ lạnh bằng cách sử dụng dung dịch dự trữ có bổ sung 10% (thể tích/thể tích) propylen glycol. Tinh thể được thu hoạch, quét qua dung dịch cryo và làm lạnh cryo trực tiếp trong nitơ lỏng. Dữ liệu nhiễu xạ đến 1,74 Å được thu thập dưới khí nitơ tại 100 K ở chùm dòng 17ID ở Nguồn Photon Cao cấp tại Phòng Thí Nghiệm Quốc Gia Argonne (Argonne IL).

Fab Ab102 tạo phức với kết tinh kháng nguyên CD40:

Phức hợp Fab được cung cấp ở 18mg/ml trong 50mM HEPES, 50mM NaCl, pH 7,5. Cấu trúc kháng nguyên được sử dụng là [CD40 (h) (21-193)]-TEV-6His ("His6" được bộc lộ dưới dạng SEQ ID NO: 115). Tinh thể phát triển bằng cách khuếch tán hơi ở nhiệt độ 23°C. Vật chứa chứa 2M amoni sulfat, 0,1M phosphat-xitrat pH 4,2. Giọt được tạo ra bằng cách bổ sung lượng ngang bằng của protein và dung dịch dự trữ. Các tinh thể mọc thành thanh mỏng và được bảo vệ lạnh bằng cách sử dụng 2,5M lithi sulfat. Tinh thể được thu hoạch, quét qua dung dịch cryo và làm lạnh cryo trực tiếp trong nitơ

lỏng. Dữ liệu nhiễu xạ đến 2,84Å được thu thập dưới khí nitơ tại 100 K ở chùm dòng 17ID ở Nguồn Photon Cao cấp tại Phòng Thí Nghiệm Quốc Gia Argonne (Argonne IL).

Xác định cấu trúc của phức hợp Fab Ab102 và CD40 Fab Ab102

Dữ liệu nhiễu xạ đối với cả hai cấu trúc tinh thể được xử lý bằng cách sử dụng chương trình autoPROC của hãng Global Phasing Ltd.

Bộ dữ liệu Fab Ab102 được xử lý trong nhóm không gian $C222_1$ với kích thước ô đơn vị như sau: a = 64,65 b = 130,4 c = 132,6. Dung dịch thay thế phân tử có khả năng xảy ra lớn nhất được xác định bằng cách sử dụng chương trình PHASER bằng cách sử dụng mô hình tìm kiếm Fab được báo cáo trước đây (Ngân hàng Dữ liệu Protein mục nhập 3Q0S). Tọa độ đối với 1 phân tử Fab được tạo ra dựa trên dung dịch thay thế phân tử. Sự lọc sơ bộ của dung dịch thu được được tiến hành bằng cách sử dụng REFMAC và chương trình BUSTER. Việc xây dựng mô hình protein lặp lại được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình COOT và kiểm tra các bản đồ mật độ điện tử 2Fo-Fc và Fo-Fc. Sự lọc cho kết thúc bằng việc bổ sung phân tử nước bằng cách sử dụng BUSTER. Thống kê lọc cuối cùng báo cáo các giá trị $R_{tự\ do}/R_{làm\ việc}$ bằng 0,23/0,19

Bộ số liệu phức hợp Fab Ab102 CD40 được xử lý trong nhóm không gian $P2_12_12$ với kích thước ô đơn vị sau đây: a = 173,3 b = 76,0 c = 126,1. Dung dịch thay thế phân tử có khả năng xảy ra lớn nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình PHASER bằng cách sử dụng Fab Ab102 đã phân giải từ trước được báo cáo ở trên. Tọa độ đối với 2 phân tử Fab được tìm thấy dựa trên dung dịch thay thế phân tử. Sự lọc sơ bộ của dung dịch thu được được tiến hành bằng cách sử dụng REFMAC và chương trình BUSTER. Mô hình đối với CD40 được xây dựng bằng tay bằng cách sử dụng chương trình COOT và kiểm tra các bản đồ mật độ điện tử 2Fo-Fc và Fo-Fc. Sự lọc cho kết thúc bằng việc bổ sung phân tử nước bằng cách sử dụng BUSTER. Thống kê lọc cuối cùng báo cáo các giá trị $R_{tự\ do}/R_{làm\ việc}$ bằng 0,25/0,20

Ví dụ 7: Hiệu lực trung hòa và hoạt tính chủ vận của Ab102 trong thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân

Các phương pháp sau đây được sử dụng trong ví dụ này để kiểm tra hoạt tính đối kháng và chủ vận của Ab102 *in vitro*.

Thử nghiệm đối kháng: Khả năng của Ab102 để phong bế sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân qua trung gian CD40 được đánh giá trong thử nghiệm đối kháng. Các bạch cầu đơn nhân đã tinh chế được trộn với 1 µg/ml MEGACD40L (Enzo) với sự có mặt của 80 ng/ml GM-CSF và 80 ng/ml IFNγ ở nồng độ $2x10^6$/ml. Bổ sung 50 µl cho mỗi giếng trong đĩa nuôi cấy mô (TC) đáy hình chữ U có 96 giếng. Dịch pha loãng của nguyên liệu thử nghiệm được điều chế trong môi trường nuôi cấy, và 50 µl dịch pha loãng được bổ sung vào bạch cầu đơn nhân người thu được từ người cho. Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C, CO_2 5% trong hai ngày trước khi dịch nổi bề mặt được thu lấy để phân tích xytokin (TNF) bằng cách sử dụng nền tảng thử nghiệm miễn dịch Meso Scale Discovery (MSD).

Thử nghiệm chủ vận: Khả năng của Ab102 để hoạt hóa bạch cầu đơn nhân qua CD40 được đánh giá. MEGACD40L (Enzo) được sử dụng như làm đối chứng dương cho sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân. Tế bào đơn nhân đã tinh chế được pha loãng đến $2x10^6$/ml trong môi trường nuôi cấy trong sự có mặt của 80 ng/ml GM-CSF và 80 ng/ml IFNγ, và 50 µl/giếng được bổ sung vào đĩa TC có đáy hình chữ U 96 giếng. Dịch pha loãng của nguyên liệu thử nghiệm được điều chế trong môi trường nuôi cấy, và 50 µl dịch pha loãng được bổ sung vào bạch cầu đơn nhân. Các tế bào được nuôi cấy ở 37°C, CO_2 5% trong hai ngày trước khi dịch nổi bề mặt được thu lấy để phân tích xytokin (TNF) bằng cách sử dụng nền tảng thử nghiệm miễn dịch Meso Scale Discovery (MSD).

Khi các tế bào dạng tủy đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh của bệnh Crohn, các thử nghiệm dựa trên bạch cầu đơn nhân nói trên được phát triển để đánh giá hoạt động chức năng của Ab102. Sự truyền tín hiệu CD40 gây hoạt hóa bạch cầu đơn nhân và do đó sản xuất ra xytokin viêm như TNF. Thử nghiệm đối kháng và chủ vận bạch cầu đơn nhân điển hình đối với Ab102 lần lượt được thể hiện trên Hình 5A và trên Hình 5B. Như thể hiện trên Hình 5A, Ab102 phong bế sự biểu hiện của TNF theo phương thức phụ thuộc nồng độ. Trong định dạng thử nghiệmchủ vận, CD40L hòa tan gây cảm ứng sản xuất TNF từ bạch cầu đơn nhân với EC_{50} bằng 1,9 nM, trong khi Ab102 không gây ra sự sản xuất TNF ở nồng độ lên đến 200 nM. Như được mô tả trên Hình 5B, hàm lượng Ab102 của TNF tương tự như đối chứng âm (IgG không liên quan) thể hiện sự sản xuất TNF từ ít đến không thể phát hiện. Các kết quả nhất quán thu được từ ba người cho khác nhau với các giá trị IC50 thể hiện trong Bảng 20 dưới đây.

Bảng 20. Tóm Tắt Đánh Giá Chức Năng Của Ab102 Trong Thử Nghiệm Hoạt hóa Bạch Cầu Đơn nhân

Chất phản ứng	Thí nghiệm	Chất đối kháng IC_{50} (nM)
Ab102	1	0,06
	2	0,23
	3	0,11
	± SD trung bình	0,13 ± 0,08

Tóm lại, kết quả từ việc thử nghiệm Ab102 ở cả thử nghiệm kháng và chủ vận mô tả ở trên cho thấy Ab102 là kháng thể kháng CD40 đối kháng mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận với hoạt tính chủ vận không có thể đo được.

Ví dụ 8: Khả năng phản ứng chéo của Ab102

Khả năng phản ứng chéo của Ab102 với CD40 từ các loài khác nhau được thử nghiệm. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn, Ab102 được gắn nhãn Alexa 647 chứng tỏ động học liên kết tương tự với cả CD40 ở người và ở khỉ cynomolgus trên bề mặt tế bào B với giá trị EC50 bằng 0,89 ± 0,17 nM trên tế bào người và 1,4 ± 0,15 nM trên tế bào khỉ cynomolgus, như thể hiện trong Bảng 21 dưới đây. Không thể phát hiện được liên kết của Ab102 với CD40 ở chuột nhắt, chuột, và thỏ ở nồng độ lên tới 30 µg/ml (200 nM).

Bảng 21. Tóm Tắt Liên Kết của Ab102 Với CD40 khác nhau trên Bề Mặt của Tế Bào B

Chất phản ứng	Loài	EC_{50} (nM)
Ab102	Người	0,89 ± 0,17
	Khỉ	1,4 + 0,15
	Chuột nhắt	Không phát hiện được
	Chuột	Không phát hiện được
	Thỏ	Không phát hiện được

Tóm lại, Ab102 liên kết với CD40 ở khỉ cynomolgous và ở người, nhưng không thể hiện liên kết có thể phát hiện được với CD40 chuột nhắt, chuột, hoặc thỏ bằng cách sử dụng các thử nghiệm liên kết tiêu chuẩn.

Ví dụ 9: Sử dụng kháng thể kháng CD40 138 ở chuột để điều trị bệnh viêm ruột kết truyền tế bào T

Các phương pháp sau được sử dụng trong nghiên cứu *in vivo* để xác định khả năng của kháng thể kháng CD40 ở chuột (kháng thể 138) để điều trị bệnh viêm ruột kết. Kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 có các đặc điểm tương tự với Ab102, ví dụ, kháng thể 138 là kháng thể đối kháng không có hoạt tính chủ vận đáng kể giống như Ab102. Như vậy, kháng thể 138 là đại diện của hoạt tính Ab102 trong mô hình chuột của ví dụ 9. Phần sau đây mô tả mô hình truyền tế bào T *in vivo* của bệnh viêm ruột kết.

Phân lập và Tiêm tế bào T nguyên bản

Vào ngày 0, lách được lấy từ chuột balb/c và đặt trong môi trường RPMI có bổ sung 4% huyết thanh thai bò (môi trường đầy đủ) trên nước đá. Thu được huyền phù tế bào đơn lẻ bằng cách phá vỡ cơ học và cho đi qua dụng cụ nhuộm tế bào 100 µm vào môi trường RPMI có bổ sung 4% huyết thanh thai bò (môi trường đầy đủ). Các tế bào được thu lấy bằng cách ly tâm (1250 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C) và tái tạo huyền phù trong Đệm Robosep (Stem Cell Technologies). Nồng độ tế bào được đo bằng cách sử dụng Thiết Bị Đếm Tế Bào Moxi Mini (Orflo) và được điều chỉnh đến 1 x 10^8 tế bào/ml trong đệm Robosep. Các tế bào T CD4+ được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit hạt từ tính chọn lọc âm tính (Stem Cell Technologies) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được tinh chế thêm bằng FACS để thu được quần thể $CD4^+CD45RB^{cao}$ VÀ$CD4^+CD45RB^{thấp}$ mà lần lượt được thu lấy dưới dạng các tế bào sáng nhất 42% và các tế bào đục nhất 12%. Tế bào được đếm và được điều chỉnh đến 1 x 10^6 tế bào/ml, và 0,5 ml (1 x 10^5 tế bào) được tiêm trong màng bụng (IP) vào chuột SCID.

Điều trị

Sau đó, các kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 được tiêm ở các liều IP khác nhau trong PBS hai lần/tuần cho chuột SCID (mô tả ở trên) bắt đầu vào lúc tiêm tế bào (điều trị phòng ngừa) hoặc sau khi bệnh được xác nhận bằng nội soi (điều trị trị liệu).

Ngoài ra, một số nhóm đối chứng được bao gồm. Các nhóm tiếp nhận 1) 15 mg/kg IP kháng thể 951 (IgG không liên quan) trong PBS hai lần/tuần, hoặc 2) kháng thể 138 (kháng thể phong bế CD40L) IP trong PBS, hai lần/tuần. Ngoài ra, trong nghiên cứu truyền tế bào T (TCT), kháng thể kháng p40 (IL-12/23) hoặc kháng thể đơn dòng kháng TNF được sử dụng làm các đối tượng so sánh đối chứng có liên quan về mặt lâm sàng.

Nội soi

Vào các thời điểm khác nhau sau khi tiêm tế bào vào chuột, bệnh được đánh giá bằng nội soi ruột kết. Sau khi gây mê bằng isofluran, kim thông linh động được đưa vào hậu môn từ từ và 300 µl PBS được tiêm từ từ để loại bỏ các cục phân. Con vật được để cho hồi phục từ gây mê và đi dạo để làm thuận tiện cho việc đi ra của cục còn lại bất kỳ (xấp xỉ năm phút). Chuột được gây mê lại bằng isofluran và mẫu dò nội soi (Karl Storz) được đưa vào hậu môn đến độ sâu 3 cm. Ảnh chụp được chụp ở 3, 2 và 1 cm từ mép hậu môn. Ảnh được ghi lại vào một thời điểm muộn hơn bằng cách sử dụng thang đo được nêu chi tiết trong Bảng 22 dưới đây. Điểm cho mỗi tham số ở mỗi trong ba khoảng cách được kết hợp để đưa ra Tổng Điểm Chỉ Số Hoạt Động Bệnh Nội Soi Ở chuột (MEDAI), được thể hiện trong Bảng 22. Điểm lớn nhất mà có thể thu được bằng cách sử dụng Tổng Điểm MEDAI là 24.

Trong trường hợp dùng liều lượng để trị liệu, điểm nội soi ba tuần sau khi tiêm tế bào được sử dụng để xác nhận bệnh và nhóm động vật để điều trị.

Bảng 22. Điểm Nội Soi MEDAI

Tham số	Điểm	Mô tả
Tiết dịch	0	Bình thường
	1	bao phủ <50% chu vi ruột kết
	2	bao phủ > 50% chu vi ruột kết
Tình trạng có mạch	0	Bình thường
	1	mạch không kết nối, mạch nhỏ không nhìn thấy
	2	mạch lớn không nhìn thấy, mô hình starburst

	3	chảy máu bề mặt rõ ràng, mạch dường như bị rò rỉ
Tình Trạng Có Hạt Niêm Mạc	0	Bình Thường
	1	bề ngoài có cục nhẹ
	2	bề ngoài có cục rõ rệt và rộng rãi
	3	lồi niêm mạc, lumen giảm

Mô học

Các mẫu GI được đưa vào băng theo hướng toàn bộ ruột kết được phân đoạn kéo căng, mà cho phép phân tích toàn bộ chiều dài ruột kết và xử lý để gắn formalin nhúng parafin (FFPE). Các khối được cắt ở 5 micromet, và gắn trên các lam kính trước khi thực hiện hóa mô miễn dịch để phát hiện canxi được ion hóa liên kết phân tử phối hợp 1 (IBA1) bằng cách sử dụng kháng thể kháng IBA1 (Cat. No. 019-19741; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Chỉ thị IBA1 được sử dụng để xác định đại thực bào trong các phần mô. Lam kính được nhuộm đối màu bằng màu xanh lá cây metyl, khử nước, và gắn với nắp đậy bằng thủy tinh.

Sau đó, các lam kính được quét ở 4x bằng hệ thống chụp ảnh Vectra và ảnh khảm độ phóng đại thấp 4x được xem xét trước khi lựa chọn khu vực để chụp ảnh ở 20x.

Máy chụp ảnh Vectra quét lại lam kính và bắt giữ ảnh có độ phân giải cao độ phóng đại cao 20x được chọn mà sau đó được đưa vào thuật toán phân tích hình ảnh trong phần mềm inForm (Perkin Elmer). Bộ thuật toán inForm được sử dụng có ba thuật toán: các ngưỡng thứ nhất của việc nhuộm đối với IBA1 và CD3 trong các tệp hình ảnh quang phổ, để loại bỏ màu nền/ngoại lai. Các thuật toán tiếp theo phân mảnh mô thành các mô được quan tâm (màng mô liên kết, biểu mô, lớp cơ, lớp dưới niêm mạc và nền), và định lượng CD3 hoặc IBA1 trong các ảnh RGB được tạo ra từ thuật toán thứ nhất.

Dữ liệu InForm được xuất sang các tệp văn bản mà được dung hợp vào các tệp dữ liệu đơn nhất cho dữ liệu phân mảnh mô hoặc phân mảnh tế bào.

Dựa trên sự phê chuẩn của hoạt tính đối kháng trong các mô hình cấp tính, mô hình viêm ruột kết mãn tính được sử dụng để thiết lập chứng minh khái niệm. Ba nghiên cứu được tiến hành để kiểm tra tác dụng của việc phong bế bệnh viêm ruột kết sau khi truyền các tế bào T nguyên bản vào vật chủ suy giảm miễn dịch (chuột SCID). Mức liều lượng đơn lẻ được khảo sats trong cả phương thức điều trị phòng ngừa và điều trị trị liệu trong khi đáp ứng liều lượng đầy đủ được đánh giá ở phương thức phòng ngừa.

Đáp ứng liều lượng của kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 được dùng vào thời gian truyền tế bào

Đáp ứng liều lượng kháng thể kháng CD40 ở chuột được dùng để phòng ngừa 138 được xác định bằng cách sử dụng mô hình truyền tế bào T của bệnh viêm ruột kết. Việc điều trị mà bao gồm khoảng giá trị liều lượng(0,5, 1,5, 5 và 15 mg/kg) được bắt đầu vào thời gian truyền tế bào. Liều lượng giảm xuống 1,5 mg/kg dẫn đến sự ức chế tối đa của tổng điểm MEDAI, trong khi 0,5 mg/kg không có tác dụng đáng kể. Hoạt tính của kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 tương đương với liều lượng chuẩn của phương pháp điều trị kháng p40IL-12/23 dùng làm đối chứng dương. Phân tích mô học của các phần đại tràng cho thấy sự giảm đi của đại thực bào (phép đo chứng viêm thông thường) mà tương quan tốt với đánh giá nội soi của bệnh, như được mô tả trên Hình 6 và Hình 7. Cụ thể là, Hình 6 mô tả sự ức chế đáp ứng liều lượng của điểm nội soi với việc dùng để phòng ngừa của kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 vào ngày 39 (điểm cuối). trên Hình 6, RBlow dùng để chỉ nhóm đối chứng âm. Các tế bào CD45RBlow không phải làm trung gian cho bệnh. Trong mô hình viêm ruột kết này, bệnh được làm trung gian bởi tế bào CD45RBhi mà được truyền cho động vật. Hình 7 thể hiện số lượng đại thực bào IBA1+ trong đại tràng của chuột (được xác định về mô học) và mô tả hàm lượng thấp của đại thực bào ở liều lượng lớn hơn 0,5 mg/kg và thấp hơn so với đối chứng p40 dương.

Hàm lượng của kháng thể kháng CD40 ở chuột tuần hoàn 138 được đo 96 giờ sau liều cuối cùng (tương đương với $C_{lõm}$) và được chứng minh là đáp ứng liều lượng như mô tả trên Hình 8. Mức liều lượng thấp nhất (0,5 mg/kg) dẫn đến nồng độ < giới hạn dưới (LLOQ) ở tất cả chứ không chỉ ở một con vật trong nhóm đó.

Đáp ứng liều lượng của kháng thể kháng CD40 138 ở chuột-được dùng 3 tuần sau khi truyền tế bào

Khi việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 được bắt đầu 3 tuần sau khi tiêm tế bào, các xác nhận sau đây về bệnh nội soi, sự ức chế đáp ứng liều lượng của tổng điểm MEDAI được quan sát với liều cao nhất (15 mg/kg) đạt được ý nghĩa thống kê (Hình 9A). Phân tích mô học của đại thực bào $IBA1^+$ trong đại tràng dưới dạng số đo của viêm tủy mang lại kết quả tương tự, như mô tả trên Hình 9B. Nồng độ trong huyết thanh trung bình của kháng thể 138 đo được 72 giờ sau liều cuối cùng là 191,9 μg/ml ở động vật tiếp nhận 15 mg/kg.

Ví dụ 10: Đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T ở khỉ Cynomolgus

Thử nghiệm đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T (TDAR) được thực hiện ở khỉ

cynomolgus. Hai/giới tính/nhóm được dùng Ab102 ở liều lượng bằng 0 (chỉ có tá dược lỏng) hoặc

10 mg/kg dưới da (SC) trong 5 tuần. Keyoxyanin limoxenoxyanin (KLH) được dùng cho tất cả các con vật vào Ngày 8. Mẫu huyết thanh được lấy từ mỗi con vật vào –11, –7, 0, 4, 7, 10,

14 và 21 ngày từ khi dùng KLH. Tất cả các con vật được đưa trở lại nhóm con vật phương tiện thử nghiệm sau khi hoàn thành việc lấy máu theo lịch trình cuối cùng (Hình 10).

Đã phát hiện ra rằng Ab102 kìm chế cả đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T kháng thể IgM và IgG kháng KLH, so với các con vật được điều trị chỉ bằng tá dược lỏng, như được thể hiện trên Hình 10.

Các phát hiện trong nghiên cứu này thống nhất với sự kìm chế dược lý của sự sản xuất kháng thể IgM và IgG phụ thuộc CD40 sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa của protein ngoại lai nguyên mẫu. Kết quả cho thấy việc sử dụng Ab102 có thể liên quan đến việc điều trị luput, trong đó sự sản xuất tự kháng thể là một phần của bệnh. Các phát hiện này cũng ủng hộ cho sự liên quan sinh học của khỉ cynomolgus như là một loài thích hợp cho nghiên cứu độc tính tiền lâm sàng. Hơn nữa, nghiên cứu này chứng minh

phản ứng chéo với CD40 ở khỉ cynomolgus, và cho thấy hoạt tính *in vivo* của Ab102 trong cơ chế (đáp ứng kháng thể phụ thuộc T) mà được biết là cần CD40.

Ví dụ 11: Sử dụng kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 để điều trị luput ban đỏ hệ thống (SLE)

Do hoạt tính đối kháng của kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 mà được thể hiện trong các mô hình cấp tính nêu trên và trong mô hình bệnh viêm ruột kết (xem ví dụ 9), hiệu quả của kháng thể kháng CD40 ở chuột này được kiểm tra trong các mô hình chuột của luput ban đỏ hệ thống (SLE). Hai mô hình SLE được sử dụng: MRL/lpr và NZB/W-F1 (được mô tả trong Theofilopoulos and Kono. 1999. *Các mô hình luput ở chuột : các nghiên cứu về gen cụ thể và toàn hệ gen.* Trong Lahita R. G., ed., Systemic Lupus Erythematosus, 3rd edn, p. 145). Lý do cơ bản để đánh giá hiệu quả của việc điều trị kháng CD40 ở chuột MRL/lpr và NZB/W-F1 là hai lần. Trước hết, các mô hình này khác nhau ở các biểu hiện của SLE. Chuột NZB/W-F1 tự phát triển bệnh viêm thận do luput và viêm tuyến nước bọt, trong khi đó chuột MRL/lpr phát triển các biểu hiện ở khớp và da ngoài viêm thận và viêm tuyến nước bọt (Andrews et al. J. Exp. Med. 148: 1198-1215. 1978). Vì các bệnh nhân khác nhau về biểu hiện SLE, nên việc sử dụng cả hai mô hình này cho phép đánh giá hiệu quả tiềm tàng ở đa số bệnh nhân SLE. Thứ hai, chuột MRL/lpr và NZB/W-F1 khác nhau về cơ sở di truyền của bệnh (Perry et al. J. Biomed. Biotech. 2011, Article ID 271694), và do đó hiệu quả giữa các mô hình làm tăng độ tin cậy trong việc chuyển sang người không đồng nhất về mặt di truyền.

11.1. Mô hình MRL/lpr của SLE

Để xác định tính hiệu quả, chuột được dùng kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 bằng cách tiêm vào trong màng bụng (i.p.) bắt đầu từ 10 tuần tuổi ở liều lượng được chỉ ra trong Bảng 23 dưới đây. Tiêm PBS được sử dụng làm đối chứng âm, và prednisolon được sử dụng làm đối chứng dương trong nghiên cứu này.

Bảng 23.

Nhóm	n	Điều trị	Liều lượng
1	18	PBS	2 lần/tuần i.p.

2	18	Kháng thể 138	15 mg/kg 2 lần/tuần i.p.
3	18	Kháng thể 138	5 mg/kg 2 lần/tuần i.p.
4	18	Kháng thể 138	1,5 mg/kg 2 lần/tuần i.p.
5	18	Kháng thể 138	15 mg/kg 1 lần/tuần i.p.
6	18	prednisolon	10 mg/kg PO sid

Protein niệu được theo dõi hàng tuần bằng Albustix (một nhãn hiệu que nhúng nước tiểu dùng để kiểm tra protein trong nước tiểu). Protein niệu cao, được định nghĩa là ≥300 mg/dl, bắt đầu phát triển ngay sau khi bắt đầu điều trị, như thể hiện trên Hình 11A. Như được mô tả trên Hình 11A, khi hoàn thành nghiên cứu vào ngày 63, 50-60% chuột đối chứng PBS không được điều trị và chuột được điều trị bằng 1,5 mg/kg kháng thể kháng CD40 đã phát triển protein niệu cao. Ngược lại, gần như tất cả các con chuột trong các nhóm điều trị khác đều duy trì protein niệu thấp trong suốt nghiên cứu. Nhóm điều trị 15 mg/kg 1x mỗi tuần có sự khác biệt đáng kể so với đối chứng PBS. Sự sống sót cũng được theo dõi và phát hiện ra rằng liều 15 mg/kg 1x mỗi tuần và 5 mg/kg 2x mỗi tuần kéo dài đáng kể sự sống sót so với các con vật đối chứng PBS không được điều trị, như trên Hình 11B. Cần lưu ý rằng nhiều con chuột đã bị giết êm ái do đau đớn gây ra bởi bệnh hạch bạch huyết gây ra bởi đột biến Faslpr trước khi chúng phát triển viêm thận. Do đó, sự giảm đi quan sát được của sự sống sót không thể chỉ quy cho viêm thận. Tuy nhiên, những dữ liệu này chỉ ra rằng liều lượng kháng thể kháng CD40 ngăn chặn một cách phụ thuộc protein niệu và kéo dài sự sống sót của chuột MRL/lpr dễ mắc luput.

Hiệu quả của kháng thể kháng CD40 để điều trị SLE cũng được đánh giá trong các phần mô được nhúng parafin được cố định formalin (FFPE) được nhuộm màu bằng màu hematoxylin và eosin (H & E) từ thận, tuyến nước bọt, và khớp mắt cá chân ở chuột từ các nhóm điều trị khác nhau. Mức độ nghiêm trọng của bệnh ở tất cả các cơ quan ở con chuột PBS không được điều trị đối chứng tăng lên trong suốt 9 tuần nghiên cứu khi con chuột MRL có tuổi từ 10 tuần tuổi khi bắt đầu đến 19 tuần khi kết thúc.

Ở thận, việc điều trị kháng thể kháng CD40 hữu hiệu để khi dùng 15 mg/kg để làm giảm bệnh cầu thận ở cả hai ngày 29 và 63 ngày điều trị, như được thể hiện trên

Hình 12A. Khi mức độ nghiêm trọng của bệnh cầu thận trở nên tồi tệ hơn ở những con chuột MRL lão hóa, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 duy trì hiệu quả trong việc làm giảm thiểu bệnh cầu thận ở 5 và 15 mg/kg. Kháng thể kháng CD40 được dùng ở liều lượng 15 mg/kg một lần mỗi tuần hữu hiệu để như dùng liều lượng hai lần một tuần. Kháng thể kháng CD40 được dùng ở liều lượng 5 mg/kg hai lần một tuần cũng gần đạt cùng hiệu quả như vậy. Kháng thể kháng CD40 được dùng ở liều lượng 5 và 15 mg/kg hữu hiệu để trong việc làm giảm sự rò rỉ quanh mạch (PV) ở thận vào 29 và 63 ngày, như được thể hiện trên Hình 12B, với xu hướng làm giảm bệnh thận (TI) sớm ở bệnh, như được thể hiện trên Hình 12C.

Trong tuyến nước bọt, kháng thể kháng CD40 được dùng ở liều lượng 1,5, 5 và 15 mg/kg hữu hiệu để trong việc làm giảm viêm tuyến nước bọt vào ngày 29, trong khi 15 mg/kg duy trì hiệu quả ở ngày điều trị 63 (Hình 13A). Sự xâm rò rỉ tuyến nước bọt không thay đổi đáng kể ở chuột không được điều trị sau ngày 29.

Trong mô khớp cổ chân, kháng thể kháng CD40 được dùng ở liều lượng 1,5, 5 và 15 mg/kg hữu hiệu để trong việc làm giảm viêm xung quanh khớp vào ngày 29, trong khi 15 mg/kg duy trì hiệu quả ở ngày 63 của liệu pháp (Hình 13B). Ở khớp, viêm có xu hướng giảm đi ở chuột 19 tuần so với chuột 10 tuần. Tuy nhiên, việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 làm giảm đáng kể viêm đến gần bằng 0 ở 15 mg/kg vào 63 ngày điều trị.

Sự tạo thành trung tâm mầm (GC) đòi hỏi sự tương tác của tế bào B và T qua sự ăn khớp của CD40 trên tế bào B GC với CD40L trên tế bào T trợ giúp nang (Tfh). GC là cấu trúc giải phẫu nơi mà các tương bào và các tế bào B ghi nhớ được tạo ra, và là nơi xảy ra sự trưởng thành ái lực và sự chuyển đổi lớp Ig. Chúng có vai trò thiết yếu đối với sự phát triển của các tự kháng thể ái lực cao và gây bệnh ở SLE.

Kháng thể kháng CD40 ở chuột 138 phá vỡ sự tương tác của tế bào B và T và ngăn chặn sự tạo thành GC. Để đánh giá mức độ ngăn chặn sự tạo thành GC, số lượng tế bào B GC và tế bào Tfh ở lách được xác định bằng cách đếm tế bào theo dòng (Hình 14). Số lượng tế bào Tfh thấp hơn đáng kể so với đối chứng ở ngày 29 ở tất cả các con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 được điều trị bất kể liều lượng nào. Trong số các liều được thử nghiệm, nhóm liều lượng 5 mg/kg vẫn thấp hơn đáng kể so

với đối chứng vào ngày 63 (Hình 14, xem bảng (i) và (ii)). Các tế bào B GC cũng thấp hơn đối chứng vào ngày 29 ở tất cả các liều kháng thể kháng CD40, và chúng vẫn thấp hơn vào ngày 63 ở chuột nhận kháng thể kháng CD40 ở liều lượng 5 và 15 mg/kg. Tuy nhiên, các khác biệt so với đối chứng không được điều trị không đáng kể về mặt thống kê. Bất kể kết quả thế nào, có một xu hướng chung trong dữ liệu hướng tới hiệu quả trị liệu ở tất cả các nhóm liều lượng. Hơn nữa, trong các thí nghiệm này, kháng thể kháng CD40 ở chuột chứng tỏ hoạt tính chủ vận từ ít đến không có.

Tổng hàm lượng IgG tuần hòa, ngoài hàm lượng kháng thể tự hoạt tính, tăng lên theo thời gian ở SLE ở chuột và ở người. Do đó, để đánh giá tác dụng của kháng thể kháng CD40 138 lên sự sản xuất kháng thể, tổng hàm lượng IgM và IgG tuần hoàn được kiểm tra. Ngoài ra, các kháng thể kháng dsADN, là tự kháng thể liên quan đến luput thông thường, cũng được kiểm tra. Kết quả cho thấy tổng hàm lượng IgG ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 ở liều lượng 15 và 1,5 mg/kg thấp hơn đáng kể so với tổng hàm lượng IgG ở đối chứng không được điều trị vào ngày 29, như được mô tả trên Hình 15A. Sự giảm đáng kể của tổng hàm lượng IgG vẫn còn dai dẳng đến ngày 63 ở những con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 ở 15 mg/kg, như được mô tả trên Hình 15B. Ngoài ra, hàm lượng thấp hơn đáng kể được quan sát thấy ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 ở 5 mg/kg vào thời điểm này. Không phát hiện thấy sự khác biệt ở hàm lượng IgM tuần hoàn.

Các độ chuẩn kháng dsADN không khác biệt đáng kể ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 và chuột đối chứng không được điều trị chuột vào ngày 29, như được mô tả trên Hình 16A. Tuy nhiên, vào ngày 63 các độ chuẩn kháng dsADN tăng lên đáng kể ở các con chuột đối chứng không được điều trị, nhưng lại giảm đi ở các con chuột được điều trị bằng 15 và 5 mg/kg kháng thể kháng CD40 138, mặc dù sự khác biệt là không đáng kể, như được mô tả trên Hình 16B.

Các kết quả thu được từ nghiên cứu trên (Ví dụ 11.1) chỉ ra rằng kháng thể kháng CD40 138 hữu hiệu để trong việc ngăn ngừa sự phát triển của viêm thận ở chuột MRL/lpr dễ mắc luput. Ngoài ra, kháng thể kháng CD40 138 ngăn ngừa sự phát triển của viêm tuyến nước bọt và viêm khớp. Nghiên cứu này cho thấy kháng thể kháng CD40 ở chuột đối kháng 138, có đặc tính tương tự như Ab102, hữu hiệu để trong việc điều trị SLE ở người.

11.2. Mô Hình Chuột NZB/W-F_1 của SLE

Mô hình chuột thứ hai đối với SLE cũng được thử nghiệm để xác định kháng thể kháng CD40 ở chuột đối kháng 138 hữu hiệu để điều trị bệnh. Cụ thể, để xác định hiệu quả của kháng thể kháng CD40 138, kháng thể được thử nghiệm ở chuột NZB/W-F1, trong đó cả hai phác đồ phòng ngừa và trị liệu được sử dụng theo kế hoạch liều lượng được mô tả trong Bảng 24 dưới đây. Như trong nghiên cứu 11.1, PBS đóng vai trò làm đối chứng âm và prednisolon là đối chứng dương.

Bảng 24

Phòng ngừa			
Nhóm	n	Điều trị	Liều lượng
1	20	PBS	i.p 2 lần/tuần
2	20	Kháng thể 138	15 mg/kg i.p. 2 lần/tuần
3	20	Kháng thể 138	1,5 mg/kg i.p. 2 lần/tuần
4	20	Kháng thể 138	15 mg/kg i.p. 1 lần/tuần
5	20	Prednisolon	10 mg/kg PO sid
Trị liệu			
6	13	PBS	i.p. 2 lần/tuần
7	12	Kháng thể 138	15 mg/kg i.p. 2 lần/tuần
8	12	Prednisolon	10 mg/kg PO sid

Đối với phác đồ phòng ngừa, chuột bắt đầu điều trị vào 26 tuần tuổi. Tất cả chuột được xác nhận là có protein <300 mg/dl. Đối với phác đồ trị liệu, sự kết nạp mở được sử dụng; các con chuột không được điều trị được theo dõi hàng tuần về protein niệu và được kết nạp vào một trong ba nhánh của phác đồ phòng ngừa khi họ phát triển protein niệu ≥300 mg/dl.

Điều trị phòng ngừa

Protein niệu được theo dõi hàng tuần và như thể hiện trên Hình 17A, trong đó khoảng 50% chuột đối chứng không được điều trị có protein niệu vào 32 tuần tuổi. Ngược lại, chỉ có 1 trong số các con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 và không con chuột nào trong số các con chuột được điều trị bằng prednisolon phát triển protein niệu cao. Những kết quả này là đáng kể so với các đối chứng không được điều trị. Sự sống sót, như được thể hiện trên Hình 17B, phản ánh phát hiện protein niệu với tất cả các lần điều trị khác biệt đáng kể so với đối chứng PBS. Do đó, cả hai liều lượng điều trị 15 và 1,5 mg/kg đều ngăn ngừa protein niệu và kéo dài sự sống sót.

Điều trị trị liệu

Điều trị trị liệu bằng kháng thể kháng CD40 138 cũng hữu hiệu để trong mô hình SLE chuột thứ hai này. Như được thể hiện trên Hình 18A và Hình 18B, chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 phát triển protein niệu thấp theo thời gian, trong khi cả chuột đối chứng không được điều trị và chuột được điều trị bằng prednisolon đều không phát triển protein niệu thấp. Dựa trên tốc độ hồi phục từ protein niệu, như được thể hiện trên Hình 18B, ước tính thời gian trung bình để hồi phục protein niệu là 23±7 ngày. Điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 cũng kéo dài đáng kể sự sống sót, như được mô tả trên Hình 18C.

Sản lượng nước bọt

Sự sản xuất nước bọt được đo ở cả chuột được điều trị để phòng ngừa và để điều trị để đánh giá chức năng tuyến nước bọt. Các con chuột đã được gây mê được tiêm pilocarpin nitrat và trong thời gian 8 phút nước bọt được thu lấy trên gạc bông. Sản lượng nước bọt được đo bằng sự tăng khối lượng tịnh của gạc bông. Trong nghiên cứu phòng ngừa, đã phát hiện ra rằng sự sản xuất nước bọt bởi chuột đối chứng không được điều trị biến thiên lớn, nhưng khác biệt đáng kể so với sự sản xuất nước bọt bởi các con chuột ít tuổi hơn không mắc bệnh NZBWF-1, như được mô tả trên Hình 19A và Hình 19B. Sự biến thiên có thể là do mức độ của bệnh vì đa số chuột đối chứng dùng tá dược lỏng có sự sản xuất nước bọt thấp nhất bị protein niệu (Hình 19A và Hình 19B, màu tím so với màu đen trong nhóm tá dược lỏng). Tuy nhiên, quan trọng là, sự sản xuất nước bọt bởi chuột được điều trị bởi kháng thể kháng CD40 138 tương đối đồng nhất (Hình 19A) và lớn hơn đáng kể so với chuột đối chứng không được điều trị. Mặc dù tất cả các

đoàn hệ được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 có sự sản xuất nước bọt cao hơn, chỉ có đoàn hệ được điều trị bằng 1,5 mg/kg giữ lại sự đáng kể khi được đo dưới dạng hàm số của khối lượng cơ thể (Hình 19B). Tuy nhiên, những dữ liệu này chỉ ra rằng việc điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 để phòng ngừa có thể ngăn ngừa sự mất chức năng tuyến nước bọt.

Ở các con chuột được điều trị để trị liệu, phát hiện ra rằng chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 138 có sự sản xuất nước bọt cao hơn đáng kể so với các đối chứng không được điều trị (Hình 20A và Hình 20B). Hình 20A và Hình 20B thể hiện sự sản xuất nước bọt được bảo toàn bằng cách dùng liều lượng để trị liệu của kháng thể kháng CD40. Đây là bằng chứng cho việc xem xét tổng lượng nước bọt hay nước bọt được chuẩn hóa đối với khối lượng cơ thể. Đáng chú ý là, các con chuột không được điều trị đều bị protein niệu, trong khi không có con chuột được điều trị bằng kháng thể kháng CD40 nào bị protein niệu. Do đó có thể kết luận rằng liều lượng để trị liệu của kháng thể kháng CD40 đối kháng mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận, ngăn ngừa hoặc làm đảo ngược sự suy giảm của chức năng tuyến nước bọt.

Nghiên cứu này chỉ ra rằng kháng thể kháng CD40 đối kháng 138 hữu hiệu để trong việc ngăn ngừa sự phát triển của viêm thận ở chuột nhắt NZB/W-F1 dễ mắc luput và trong việc cứu chữa các con chuột khỏi bị viêm thận. Ngoài ra, kháng thể kháng CD40 ngăn ngừa sự phát triển của viêm tuyến nước bọt và viêm khớp. Nghiên cứu này ủng hộ giả thuyết rằng kháng thể kháng CD40 đối kháng mà về cơ bản không có hoạt tính chủ vận sẽ hữu hiệu để trong SLE ở người.

Các phương pháp được sử dụng trong các ví dụ 11.1 và 11.2 gồm có:

Chuột MRL/lpr

MRL/lpr: Kháng thể kháng CD40 (kháng thể 138) được sử dụng i.p. cho chuột MRL/lpr 10 tuần tuổi ở một trong 4 liều; 15 mg/kg, 5 mg/kg, hoặc 1,5 mg/kg hai lần mỗi tuần, hoặc 15 mg/kg một lần mỗi tuần. Chuột được điều trị bằng PBS (tá dược lỏng) i.p. hai lần mỗi tuần được bao gồm làm đối chứng âm, và các con chuột được điều trị bằng prednisolon PO 10 mg/kg được bao gồm làm đối chứng dương.

NZB/W-F1: Kháng thể kháng CD40 138 được dùng cho chuột NZB/W-F_1 trong cả phác đồ phòng ngừa và điều trị. Đối với phác đồ phòng ngừa, chuột được dùng kháng

CD40 i.p. bắt đầu từ 26 tuần tuổi ở một trong hai liều lượng, hai lần mỗi tuần ở liều lượng 15 mg/kg hoặc 1,5 mg/kg. Chuột được dùng prednisolon ở liều lượng 10 mg/kg PO sid hoặc dùng PBS lần lượt làm đối chứng dương và đối chứng âm. Chuột được kiểm tra protein niệu ngay từ khi bắt đầu và bất kỳ con chuột nào có ≥300 mg/dl đều được loại trừ khỏi nghiên cứu phòng ngừa. Đối với phác đồ trị liệu, chuột bắt đầu điều trị khi chúng phát triển protein niệu ≥300 mg/dl. Chuột nhận kháng CD40 i.p ở liều lượng 15 mg/kg hai lần mỗi tuần. Chuột dùng prednisolon ở liều lượng 10 mg/kg PO, hoặc PBS lần lượt làm đối chứng dương và đối chứng âm.

Protein niệu

Nước tiểu được thử nghiệm hàng tuần về hàm lượng protein bằng cách sử dụng dải chất thử Albustix (Siemens 2191, Pittsburgh, PA). Chuột được coi là bị protein niệu khi nồng độ protein trong nước tiểu tăng lên ≥300 mg/dl trong ít nhất 2 lần kiểm tra liên tiếp hoặc trước khi chết hoặc giết êm ái.

Đếm tế bào theo dòng

Huyền phù tế bào đơn lẻ từ lách được tạo ra trong dung dịch muối đệm Hanks (Invitrogen) với 1% huyết thanh thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt (Invitrogen) và 1x penixilin/streptomyxin (Sigma, St Louis, MO). Hồng cầu được loại bỏ bằng cách ly tâm và các tế bào được tái tạo huyền phù trong chất đệm nhuộm màu (PBS (Invitrogen) với 1,5% huyết thanh thai bò bị bất hoạt bằng nhiệt và 0,02% natri azit (Sigma)). Các tế bào được nhuộm màu bằng các kháng thể chống lại CD3 (145-2011, BD), CD4 (GK1.5 eBioSciences), ICOS (C398.4A, Biolegend), CXCR5 (L138D7, Biolegend), PD-1 (29F.1A12, Biolegend) GL7 (A488, Biolegend), CD19 (BUV395, BD), CD95 (Jo2, Biolegend). Các kháng thể kết hợp trực tiếp với isothixyanat fluoresxein, phycoerythrin, phycoerythrin và xyanin 5, allophycoxyanin, periđinin chlorophylla và xyanin 5.5, hoặc biotin. Tổng số tế bào B được xác định là CD19 +; tế bào B GC như CD19 +, CD95 +, và $GL7^+$; tế bào Tfh như CD3+, CD4, ICOS +, CXCR5+, và PD-1+. Tế bào được phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng FACSCalibur (BD Biosciences) và được phân tích bằng phần mềm FlowJo (phiên bản 8.5, Treestar Inc.).

Mô học

Khi các con chuột đối chứng tá dược lỏng trở nên hấp hối, các mô thận, mắt cá chân và tuyến nước bọt được thu lấy và được cố định trong formalin đệm trung tính 10%. Ngoài ra, vào các thời điểm trung gian cụ thể cùng các mô và máu này được thu lấy từ các con chuột đại diện của mỗi nhóm. Mô được cố định trong formalin đệm trung tính 10% trong 8 giờ, được xử lý và được nhúng parafin đối với H&E. Sự thâm nhiễm viêm được đánh giá ở thận, tuyến nước bọt, và mắt cá chân trên cơ sở đánh giá các phần nhúng parafin được cố định formalin (FFPE) được nhuộm màu H&E thông thường. Đối với thận, nhà nghiên cứu bệnh học chấm điểm các phần H&E 3um trên thang điểm từ 0 đến 4 đối với bệnh cầu thận, sự thâm nhiễm quanh mạch và sự thâm nhiễm viêm thận dựa trên các tiêu chí cho điểm sau: Bệnh cầu thận: 0 = không có bệnh; 1 = sự đặc lại thành từng đoạn của màng nâng cuộn mao mạch trong các cầu thận ngẫu nhiên; 2 = sự đặc lại thành từng đoạn đến phân tán của màng nâng cuộn mao mạch trong hầu hết các tiểu cầu; 3 = sự đặc lại phân tán của màng nâng cuộn mao mạch, tăng lượng tế bào, tế bào có chân mở rộng, không dính; 4 = sự đặc lại phân tán của màng nâng cuộn mao mạch với các khu vực tối tệ hơn các khu vực khác ở một hoặc nhiều yếu tố sau: protein đông tụ, xơ hóa, giảm lượng tế bào, tế bào có chân mở rộng, dính và hình liềm của nang Bowman. Viêm thận quanh mạch: 0 = lên đến một vài tế bào lympho bào hiếm; 1 = một vài tế bào lympho tạo thành khối kết tụ lỏng lẻo; 2 = tế bào lympho tạo thành các khối kết tụ nhỏ rời rạc; 3 = khối kết tụ phân cực của tế bào lympho mà phình ra trong lumen của tĩnh mạch liền kề nhưng không bao quanh hoàn toàn động mạch cung; 4 = khối kết tụ tế bào lympho bao quanh hoàn toàn động mạch cung mà không phân cực. Sự thâm nhiễm viêm thận (TI): 0 = không thâm nhiễm; 1 = thâm nhiễm TI từ tối thiểu đến nhẹ; 2 = thâm nhiễm nhẹ giữa 20% ống; 3 = thâm nhiễm từ nhẹ đến trung bình giữa 50% ống; 4 = thâm nhiễm trung bình giữa và xung quanh > 50% ống trong toàn bộ vỏ thận. Điểm viêm nước bọt và khớp được dựa trên cùng nguyên tắc với các điểm từ 0 đến 4 của sự thâm nhiễm tăng lên trong mô.

Sản lượng nước bọt

Để đo sản lượng tuyến nước bọt, chuột trước hết được làm dịu bằng oxy/isofluran trong buồng cách ly nhỏ. Sau khi làm dịu chuột được dùng i.p. 30 ul (60 ug) pilocarpin nitrat (Sigma). Hai phút sau khi tiêm, gạc an toàn cho trẻ em đã được cân từ trước (được cắt đến ~1,5 cm, bông cộng với que) được đặt trong miệng con vật phía sau răng phía

trước. Chuột được đặt nằm nghiêng để cho phép gom nước bọt trong má và hấp phụ bằng gạc bông. Sau 8 phút gạc được lấy ra và cân để tính khối lượng nước bọt tịnh.

ELISA

Tổng hàm lượng IgG và IgM tuần hoàn được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng bộ kit eBioscience (cat # 88-50400, 88-50470) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TÓM TẮT TRÌNH TỰ

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:1	CD40 ở người	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPT ACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRE THCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSE TDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHR SCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVG FFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVV QQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVI PIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNK APHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPV QETLHGCQPVTQEDGKESRISVQER Q

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:2	Vùng không đổi gamma-1 Ig ở người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
SEQ ID NO:3	Đột biến vùng không đổi gamma-1 Ig ở người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:4	Vùng không đổi kappa Ig của người	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:5	Chuỗi nặng biến đổi của: Ab1 (ở chuột) (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPEKGLEWI A**YISSGRSNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCA R**SWGYFDV**WGTGTTVTVSS
SEQ ID NO:6	CDR1 chuỗi nặng của: Ab1 (ở chuột) Ab2(ở chuột) từ huAb1v1CDR2v1 đến huAb1v1CDR2v17 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v4 huAb1v3 Ab101 Ab102	GFTFSDYGMN

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:7	CDR2 chuỗi nặng của: Ab1 (ở chuột) huAb1VH.1/VL.1 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v3 huAb1v4	YISSGRSNIYYADTVKG

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:8	CDR3 chuỗi nặng của: Ab2 (ở chuột) Ab1 (ở chuột) huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 từ huAb1v1CDR2v1 đến huAb1v1CDR2v17 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v2 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	SWGYFDV
SEQ ID NO:9	Chuỗi nhẹ biến đổi của: Ab1 (ở chuột)	DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSC**KS** **SQSLLNSGNQKNYLT**WFQQKPGQP PKLLIY**WASTRES**GVPDRFAGSGSG TDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYT** **YPLT**FGAGTKLEIK

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:10	CDR1 chuỗi nhẹ của: Ab2 (ở chuột) Ab1 (ở chuột) huAb1VH1/VL.1 huAb1VH1A/VL.1 huAb1VH1A/VL.1A	KSSQSLLNSGNQKNYLT
SEQ ID NO:11	CDR2 chuỗi nhẹ của: Ab1 (ở chuột) Ab2 (ở chuột) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	WASTRES

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:12	CDR3 chuỗi nhẹ của: Ab1 (ở chuột) Ab2 (ở chuột) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	QNDYTYPLT
SEQ ID NO:13	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1/VL.1A huAb1v2 huAb1v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYGMNWVRQAPGKGLEWVSYISSG RSNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQ GTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:14	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGT KLEIK
SEQ ID NO:15	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v5 huAb1v4 huAb1v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSG RSNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO:16	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGT KLEIK
SEQ ID NO:17	CDR1 chuỗi nhẹ của: huAb1v6 huAb1v3	KSSQSLLNLGNQKNYLT

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:18	VL huAb1v5 huAb1v2 (CDR in đậm)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSS** **QSLLNTGNQKNYLT**WFQQKPGQP PKLLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYT** **YPLT**FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:19	CDR1 chuỗi nhẹ của: huAb1v5 huAb1v2	KSSQSLLNTGNQKNYLT
SEQ ID NO:20	Chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của: huAb1v1 Ab101 Ab102 (CDR in đậm)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQ** **SLLNRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLI Y**WASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FGQGT KLEIK
SEQ ID NO:21	CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb1v1 Ab101 Ab102	KSSQSLLNRGNQKNYLT
SEQ ID NO:22	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v1 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRTNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:23	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v2 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRDNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:24	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v3 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRENIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:25	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v4 (CDR in đậm) (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRRNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:26	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v5 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRVNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:27	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v6 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRLNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:28	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:29	VH huAb1v1CDR2v8 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRINIYYADTVKG**RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:30	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v9 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRQNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:31	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v10 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRWNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:32	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v11 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRMNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:33	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v12 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRKNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:34	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v13 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRHNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:35	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v14 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRFNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:36	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v15 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRYNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:37	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb1v1CDR2v16 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI **AYISSGRANIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA **RSWGYFDV**WGQGTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:38	Chuỗi nặng biến đổi (VH) của: huAb1v1CDR2v17 (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRPNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:39	Trình tự chuỗi nặng Ab101 (vùng không đổi được gạch chân, CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:40	Trình tự chuỗi nhẹ Ab101 Trình tự chuỗi nhẹ Ab102 Được làm cho giống như của người (vùng không đổi được gạch chân, CDR in đậm)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSS** **QSLLNRGNQKNYLT**WFQQKPGQP PKLLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYT** **YPLT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:41	Trình tự chuỗi nặng Ab102 Được làm cho giống như của người (vùng không đổi được gạch chân, CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQAPGKGLEWI A**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R**SWGYFDV**WGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD QLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:42	CDR2 chuỗi nặng của: Ab2 huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102	YISSGRGNIYYADTVKG
SEQ ID NO:43	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb1v6 huAb1v3 (CDR in đậm)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSS QSLLNLGNQKNYLT**WFQQKPGQP PKLLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYT YPLT**FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:44	Chuỗi nặng biến đổi của: Ab3 (ở chuột) (CDR in đậm)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKA F**GYTFTSYTMH**WVKQRPGQGLEW IG**YINPSSDYPNYNQKFKD**KATLTA DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA R**WGYSFDY**WGQGTTLTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:45	Chuỗi nặng CDR1 của: Ab3 (ở chuột) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	GYTFTSYTMH

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:46	Chuỗi nặng CDR2 của: Ab3 (ở chuột) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	YINPSSDYPNYNQKFKD

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:47	Chuỗi nặng CDR3 của: Ab3 (ở chuột) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	WGYSFDY
SEQ ID NO:48	Chuỗi nhẹ biến đổi của: Ab3 (ở chuột) (CDR in đậm)	DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISC**RSS KSLLHSNGNTYLY**WFLQRPGQSPQ YLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGSGSGTA FTLRISRVEAEDVGVYYC**MQHLEY PLT**FGAGTKLELK

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:49	Chuỗi nhẹ CDR1 của: Ab3 (ở chuột) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RSSKSLLHSNGNTYLY

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:50	Chuỗi nhẹ CDR2 của: Ab3 (ở chuột) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RMSTLAS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:51	Chuỗi nhẹ CDR3 của: Ab3 (ở chuột) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	MQHLEYPLT
SEQ ID NO:52	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPS SDYPNYNQKFKDRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARWGYSFDYWGQ GTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:53	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 (CDR in đậm)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSS KSLLHSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQ LLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEY PLT**FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:54	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B (CDR in đậm)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA S**GYTFTSYTMH**WVRQAPGQGLEW MG**YINPSSDYPNYNQKFKD**RVTLT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:55	Chuỗi nặng biến đổi của: huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B (CDR in đậm)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA S**GYTFTSYTMH**WVRQAPGQGLEW IG**YINPSSDYPNYNQKFKD**RATLTA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA R**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:56	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A (CDR in đậm)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSS KSLLHSNGNTYLY**WFLQKPGQSPQ YLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEY PLT**FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:57	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B (CDR in đậm)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSS KSLLHSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQ YLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEY PLT**FGQGTKLEIK
SEQ ID NO:58	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v1	YISSGRTNIYYADTVKG
SEQ ID NO:59	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v2	YISSGRDNIYYADTVKG
SEQ ID NO:60	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v3	YISSGRENIYYADTVKG
SEQ ID NO:61	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v4	YISSGRRNIYYADTVKG
SEQ ID NO:62	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v5	YISSGRVNIYYADTVKG

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:63	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v6	YISSGRLNIYYADTVKG
SEQ ID NO:64	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v8	YISSGRINIYYADTVKG
SEQ ID NO:65	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v9	YISSGRQNIYYADTVKG
SEQ ID NO:66	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v10	YISSGRWNIYYADTVKG
SEQ ID NO:67	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v11	YISSGRMNIYYADTVKG
SEQ ID NO:68	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v12	YISSGRKNIYYADTVKG
SEQ ID NO:69	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v13	YISSGRHNIYYADTVKG
SEQ ID NO:70	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v14	YISSGRFNIYYADTVKG
SEQ ID NO:71	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v15	YISSGRYNIYYADTVKG
SEQ ID NO:72	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v16	YISSGRANIYYADTVKG
SEQ ID NO:73	CDR2 chuỗi nặng của: huAb1v1CDR2v17	YISSGRPNIYYADTVKG

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:74	CDR1 chuỗi nhẹ của: huAb1v4	KSSQSLLNPGNQKNYLT
SEQ ID NO:75	Chuỗi nặng biến đổi của: Ab2 (ở chuột) (CDR in đậm)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS **GFTFSDYGMN**WVRQSPEKGLEWIA **YISSGRGNIYYADTVKG**RFTISRDN AKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR **SWGYFDV**WGTGTTVTVSS
SEQ ID NO:76	Chuỗi nhẹ biến đổi của: Ab2 (ở chuột) (CDR in đậm)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC**KS SQSLLNSGNQKNYLT**WFQQKPGQP PKLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYT YPLT**FGAGTKLELK
SEQ ID NO:77	Chuỗi nhẹ biến đổi của: huAb1v4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLLNPGNQKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTY PLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:78	Trình tự liên ứng của CDR1 chuỗi nặng biến đổi	G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)
SEQ ID NO:79	Trình tự liên ứng của CDR2 chuỗi nặng biến đổi	YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S)(D/S/G)(N/Y)(I/P)(Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K)(V/F)K (G/D)

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:80	Trình tự liên ứng của CDR3 chuỗi nặng biến đổi	(S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV
SEQ ID NO:81	Vùng không đổi lambda Ig ở người	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:82	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH1-18&JH6 FR1 21/28&JH4 FR1	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytft
SEQ ID NO:83	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH1-18&JH6 FR2	wvrqapgqglewmg
Ký hiệu nhận dạng trình tự	**Protein**	**Trình tự**
SEQ ID NO:84	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH1-18&JH6 FR3	rvtmttdtststaymelrslrsddtavyycar
SEQ ID NO:85	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH1-18&JH6 FR4 VH2-26&JH6 FR4 VH1-46&JH6 FR4	wgqgttvtvss

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:86	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người 21/28&JH4 FR2	wvrqapgqrlewmg
SEQ ID NO:87	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người 21/28&JH4 FR3	rvtitrdtsastaymelsslrsedtavyycar
SEQ ID NO:88	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người 21/28&JH4 FR4 M60&JH4 FR4	wgqgtlvtvss
SEQ ID NO:89	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH2-26&JH6 FR1	qvtlkesgpvlvkptetltltctvsgfsls
SEQ ID NO:90	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH2-26&JH6 FR2	wirqppgkalewlah
SEQ ID NO:91	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH2-26&JH6 FR3	rltiskdtsksqvvltmtnmdpvdtatyycar
SEQ ID NO:92	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người M60&JH4 FR1	qvtlresgpalvkptqtltltctlygfsls

Ký hiệu nhận dạng trình tự	Protein	Trình tự
SEQ ID NO:93	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người M60&JH4 FR2	wirqppgkalewla
SEQ ID NO:94	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người M60&JH4 FR3	rltiskdtsknqvvltmtnmdpvdtatyycar
Ký hiệu nhận dạng trình tự	**Protein**	**Trình tự**

SEQ ID NO:95	Trình tự chất nhận chuỗi nặng ở người VH1-46&JH6 FR3	rvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycar
SEQ ID NO:96	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A20&JK4 FR1	diqmtqspsslsasvgdrvtitc
SEQ ID NO:97	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A20&JK4 FR2	wyqqkpgkvpklliy
SEQ ID NO:98	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A20&JK4 FR3	gvpsrfsgsgsgtdftltisslqpedvatyyc

SEQ ID NO:99	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A20&JK4 FR4 III-3R&JK4 FR4 A1&JK4 FR4	fgggtkveikr
SEQ ID NO:100	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người III-3R&JK4 FR3	gvpsrisgsgsgtdftftisslqpediatyyc
SEQ ID NO:101	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A1&JK4 FR1	dvvmtqsplslpvtlgqpasisc
SEQ ID NO:102	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A1&JK4 FR2	wfqqrpgqsprrliy
SEQ ID NO:103	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người A1&JK4 FR3 01&JK2 FR3	gvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyyc
SEQ ID NO:104	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người 01&JK2 FR1	divmtqtplslpvtpgepasisc
SEQ ID NO:105	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người 01&JK2 FR2	wylqkpgqspqlliy
Ký hiệu nhận dạng trình tự	**Protein**	**Trình tự**

SEQ ID NO:106	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người 01&JK2 FR4	fgqgtkleikr
SEQ ID NO:107	Miền ngoại bào CD40 ở người	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRE THCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETD TICTCEEGWHCTSEACESCV
SEQ ID NO:108	Trình tự liên ứng của CDR1 chuỗi nhẹ biến đổi	(K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)
SEQ ID NO:109	Trình tự liên ứng của CDR2 chuỗi nhẹ biến đổi	(W/R)(A/M)ST(R/L)(E/A)S
SEQ ID NO:110	Trình tự liên ứng của CDR3 chuỗi nhẹ biến đổi	(Q/M)(N/Q)(D/H)(Y/L)(T/E)YPLT
SEQ ID NO: 111	CDR2 chuỗi nặng	YISSGRXNIYYADTVKG Trong đó "X" là axit amin bất kỳ không phải là T, D, V, L, I, M
SEQ ID NO: 112	CDR2 chuỗi nặng	YISSGRXNIYYADTVKG Trong đó "X" là axit amin bất kỳ
SEQ ID NO: 113	CDR1 chuỗi nhẹ	KSSQSLLNXGNQKNYLT trong đó "X" không phải là gốc axit amin Pro
SEQ ID NO: 114	Trình tự chất nhận chuỗi nhẹ ở người III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
SEQ ID NO: 115	Đuôi histiđin	His His His His His His

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD40 đối kháng có chiều dài đầy đủ chứa CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:6, CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:42, CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:8, CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:21, CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:11, và CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:12.

2. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1, trong đó kháng thể này được làm cho giống như của người.

3. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này về cơ bản là không có hoạt tính chủ vận.

4. Kháng thể kháng CD40 đối kháng có chiều dài đầy đủ chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, và miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 20.

5. Kháng thể kháng CD40 chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 41, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 40.

6. Kháng thể kháng CD40 chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 39, và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 40.

7. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 20.

8. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 28.

9. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là lớp IgG.

10. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 9, trong đó lớp IgG là IgG1.

11. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 9, trong đó lớp IgG là IgG4.

12. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 10, trong đó kháng thể này chứa miền không đổi IgG1 ở người chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:2.

13. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 10, trong đó kháng thể này chứa miền không đổi IgG1 ở người chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:3.

14. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa miền không đổi kappa Ig ở người trong chuỗi nhẹ.

15. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa miền không đổi lambda Ig ở người trong chuỗi nhẹ.

16. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 14, trong đó miền không đổi kappa Ig ở người chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:4.

17. Kháng thể kháng CD40 theo điểm 15, trong đó miền không đổi lambda Ig ở người chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:81.

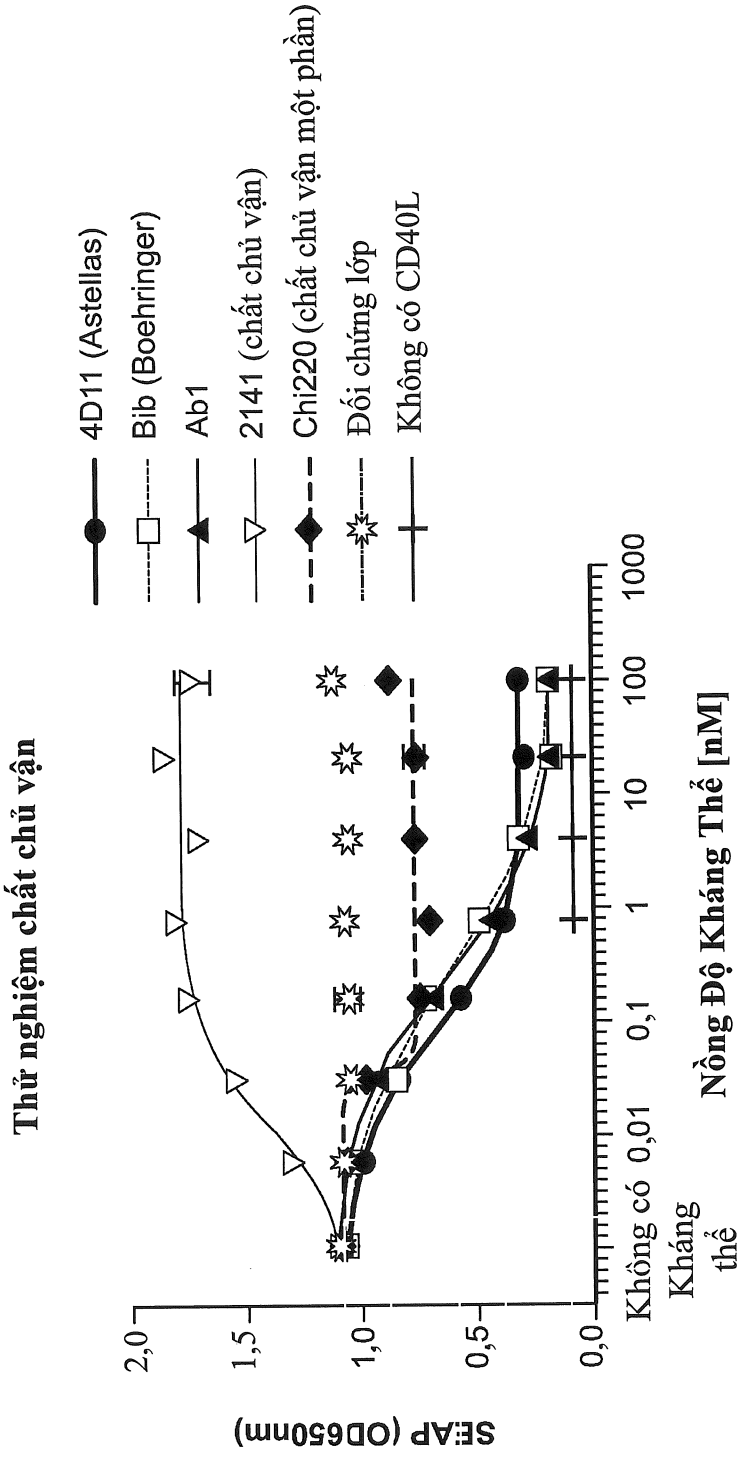
18. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

19. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 theo điểm 4 và chất mang dược dụng.

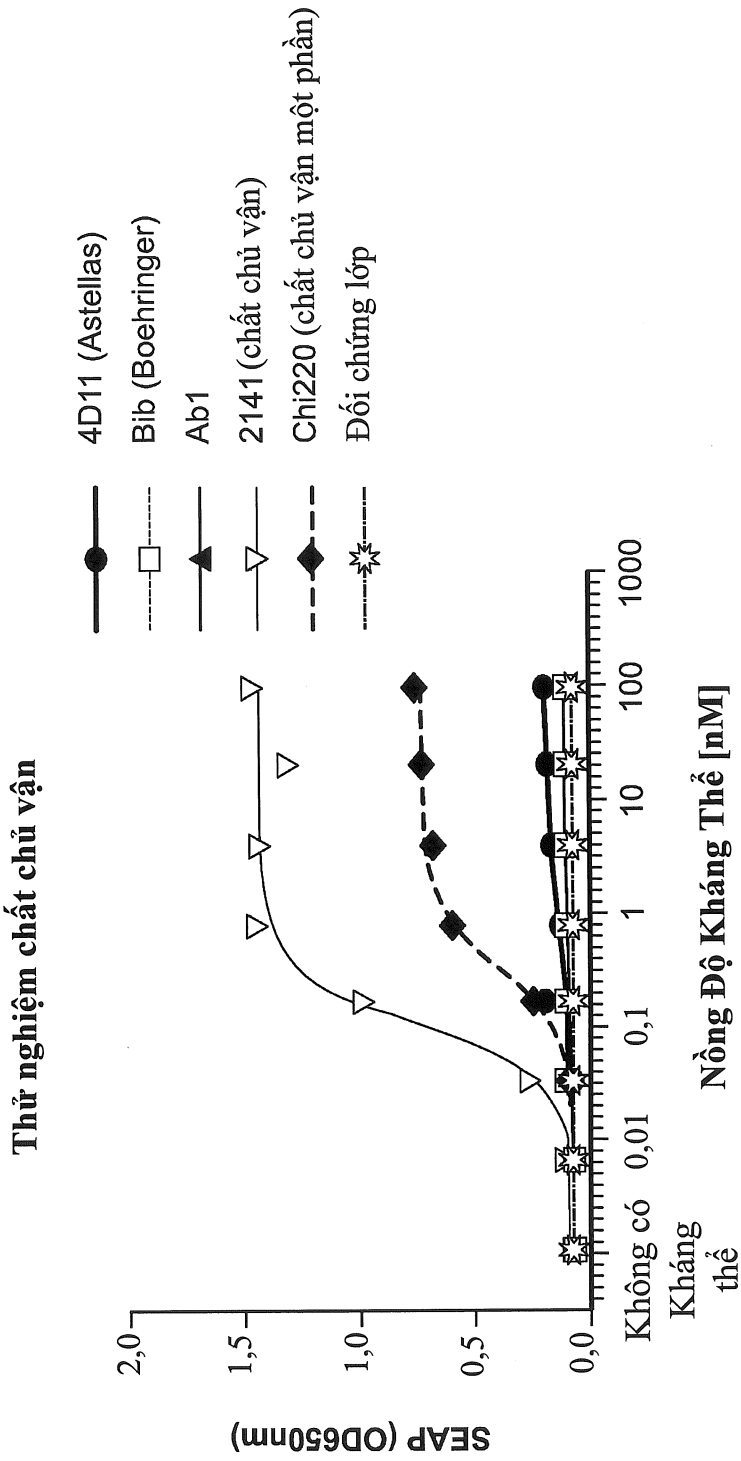
20. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 theo điểm 5 và chất mang dược dụng.

21. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD40 theo điểm 6 và chất mang dược dụng.

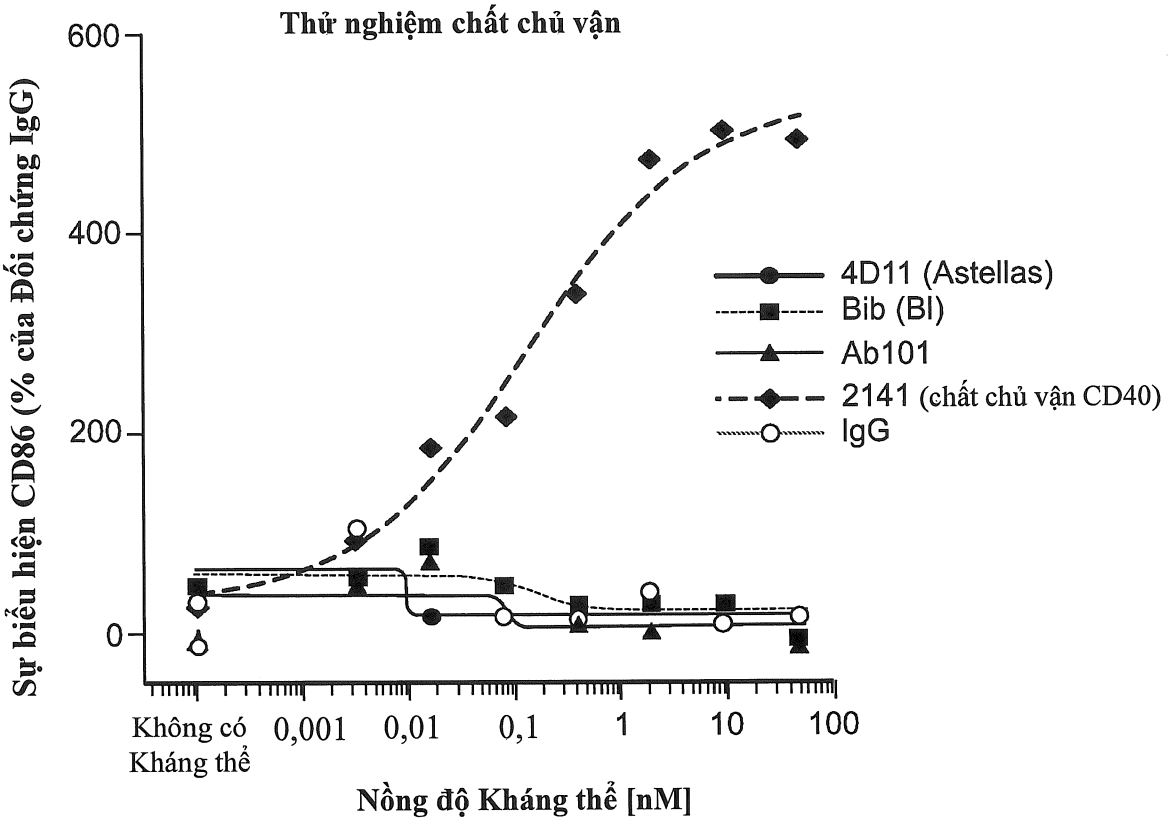
HÌNH 1A


Thử nghiệm chất chủ vận
4D11 (Astellas)
Bib (Boehringer)
Ab1
2141 (chất chủ vận)
Chi220 (chất chủ vận một phần)
Đối chứng lớp
Không có CD40L
SEAP (OD650nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Không có Kháng thể
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng Độ Kháng Thể [nM]

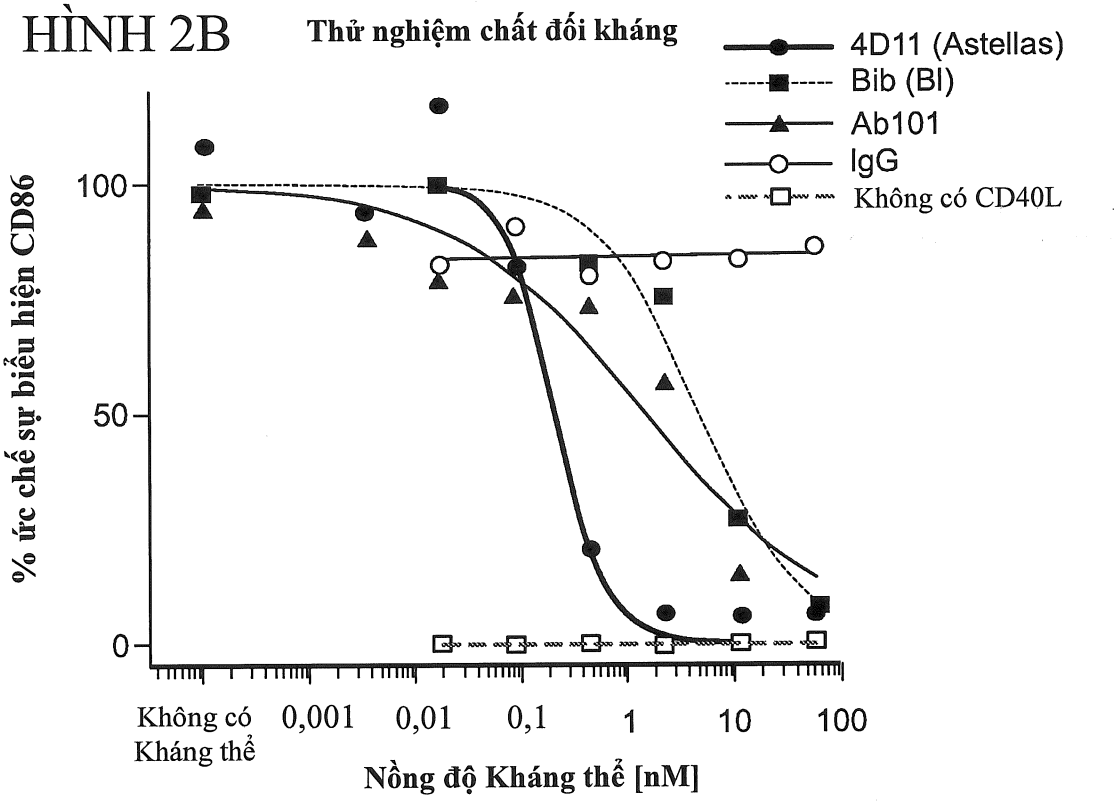
HÌNH 1B


Thử nghiệm chất chủ vận
4D11 (Astellas)
Bib (Boehringer)
Ab1
2141 (chất chủ vận)
Chi220 (chất chủ vận một phần)
Đối chứng lớp
SEAP (OD650nm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Không có
Kháng thể
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng Độ Kháng Thể [nM]

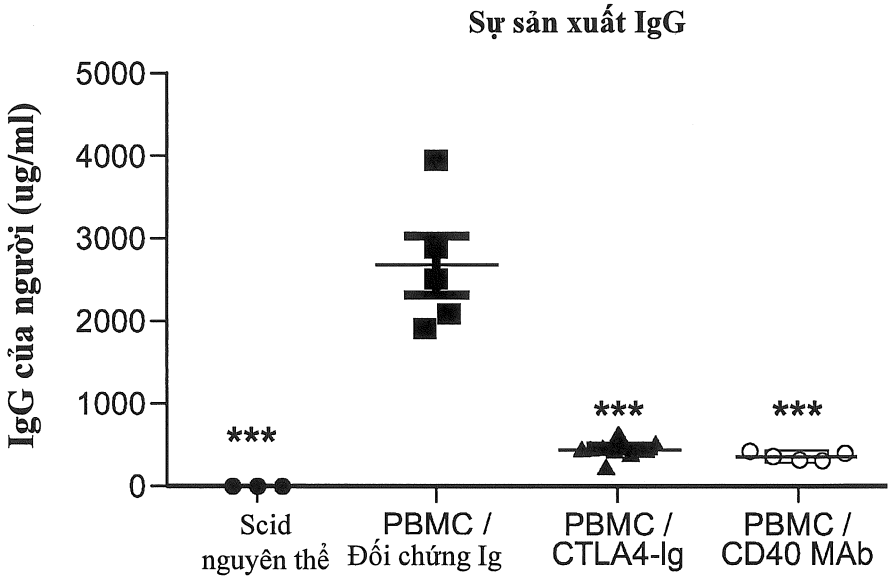
HÌNH 2A



HÌNH 2B

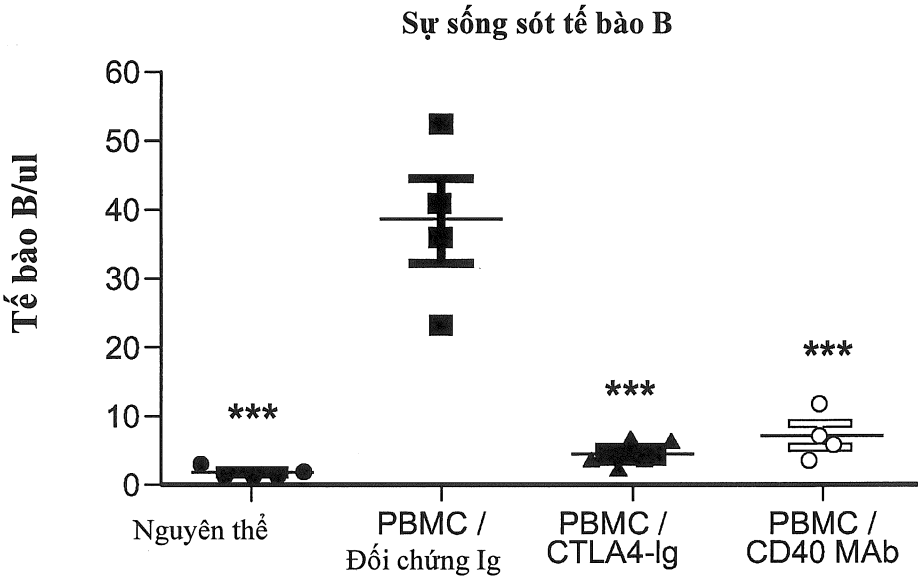


HÌNH 3A



*** p<,001 so với Ig
ANOVA/Dunnett's

HÌNH 3B



*** p<,001 so với Ig
ANOVA/Dunnett's

HÌNH 4A

```
                                  1                                                 50
Ab3 SEQ ID NO:48          (1)  DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISCRSSKSLLHS-NGNTYLYWFLQRPGQSP
Ab1 SEQ ID NO:9           (1)  DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPP
Ab2 SEQ ID NO:76          (1)  DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPP
     Liên ứng             (1)  DIVMTQSPSSLTVTAGE VTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPP
                                                R  K   H - GNT  Y

                                 51                                             100
 Ab3                      (50)  QYLIYRMSTLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEY
 Ab1                      (51)  KLLIYWASTRESGVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYTY
 Ab2                      (51)  KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYTY
     Liên ứng             (51)  KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYTY
                                     RM  LA                                  MQHLE

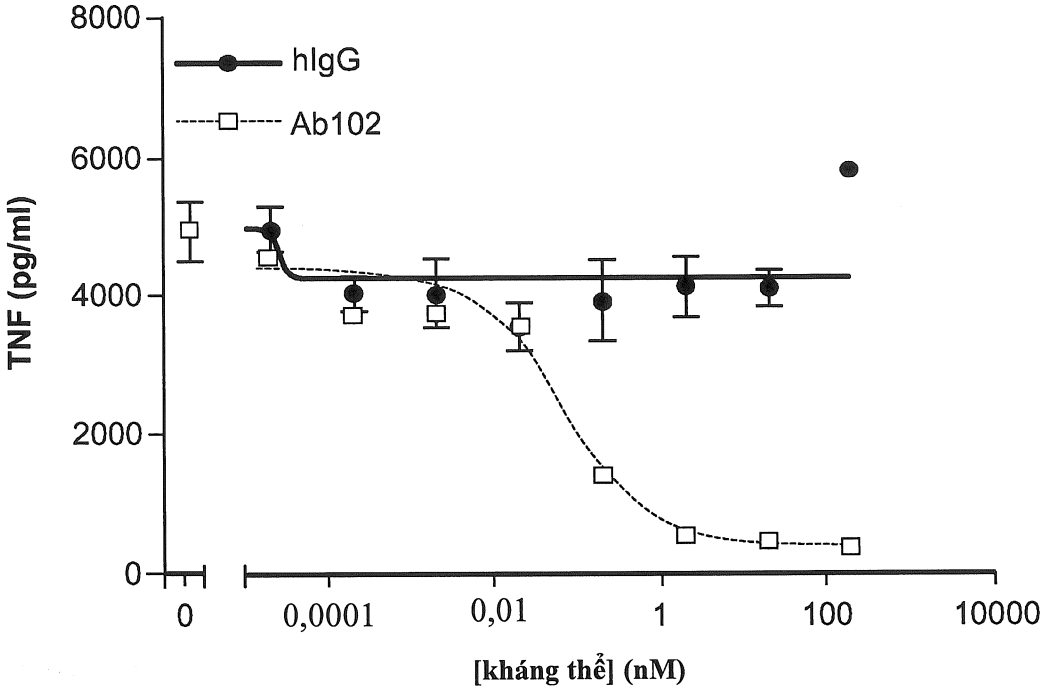
                                 101
 Ab3                      (100) PLTFGAGTKLELK
 Ab1                      (101) PLTFGAGTKLEIK
 Ab2                      (101) PLTFGAGTKLELK
     Liên ứng             (101) PLTFGAGTKLELK
```

HÌNH 4B

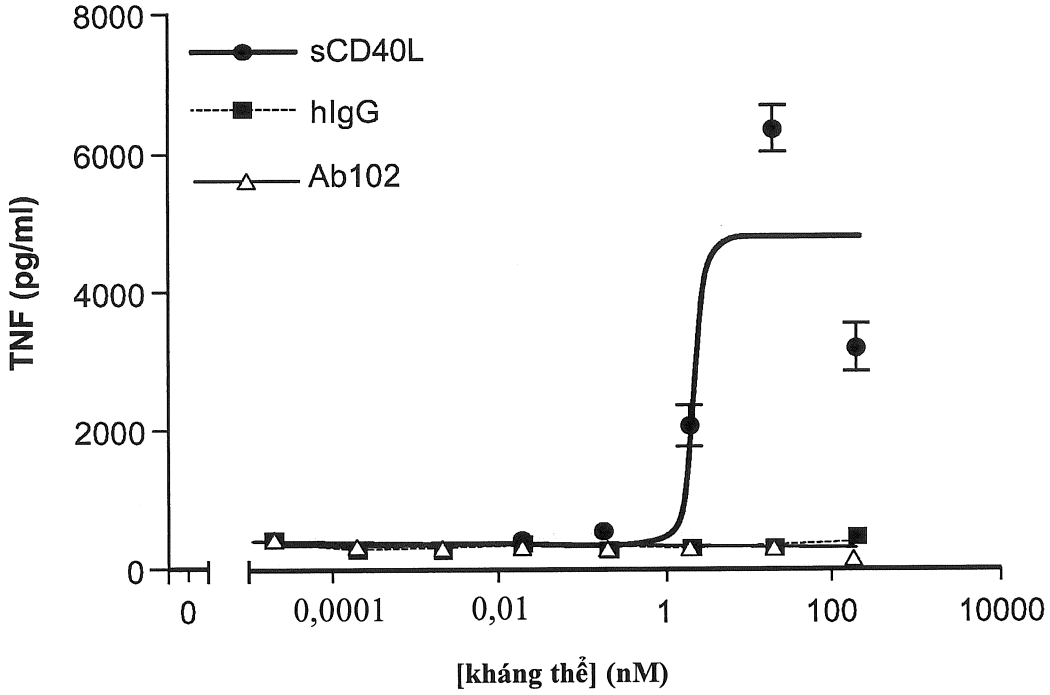
```
                                  1                                                 50
Ab3 SEQ ID NO:44 (100)  QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAFGYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGY
Ab1 SEQ ID NO:5  (101)  EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPEKGLEWIAY
Ab2 SEQ ID NO:75 (101)  EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSDYGMNWVRQSPEKGLEWIAY
     Liên ứng    (101)  EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPEKGLEWIAY
                                             Y  TS T H

                                  51                                          100
Ab3                 (150)  INPSSDYPNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWG
Ab1                 (151)  ISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW
Ab2                 (151)  ISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW
     Liên ứng       (151)  ISSGR NIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW
                             NPSS YPN NQKF D                                  WG
                                  101
Ab3                 (200)  YSFDYWGQGTTLTVSS
Ab1                 (201)  GYFDVWGTGTTVTVSS
Ab2                 (201)  GYFDVWGTGTTVTVSS
     Liên ứng       (201)  GYFDVWGTGTTVTVSS
                            YS
```

HÌNH 5A

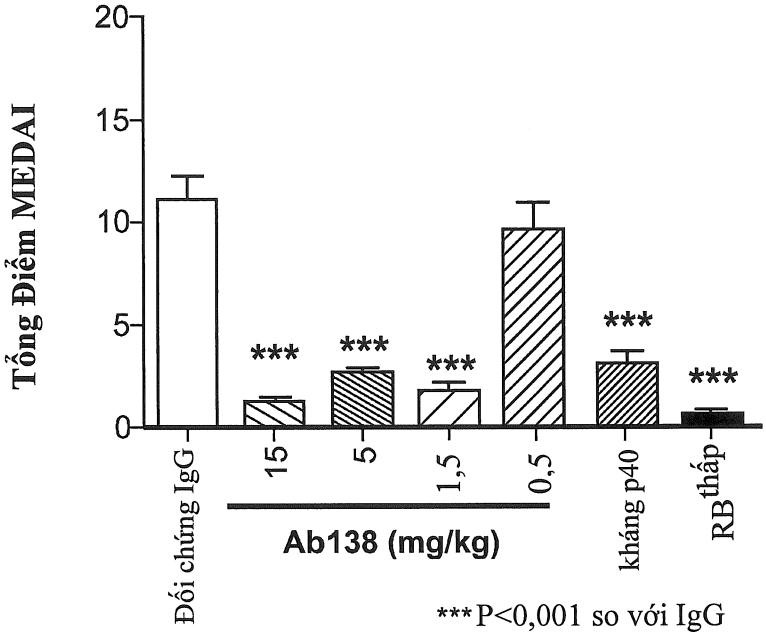


HÌNH 5B



HÌNH 6

Đáp Ứng Liều Lượng Phòng Ngừa của MAb CD40 ở TCT Điểm Kết Thúc Ngày 39

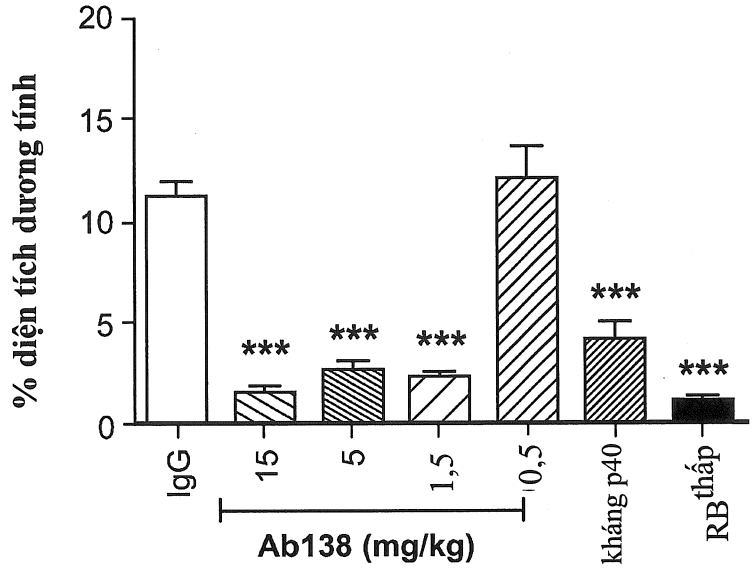


***P<0,001 so với IgG

ANOVA 1 thành phần/Sau Thử nghiệm Dunnett

HÌNH 7

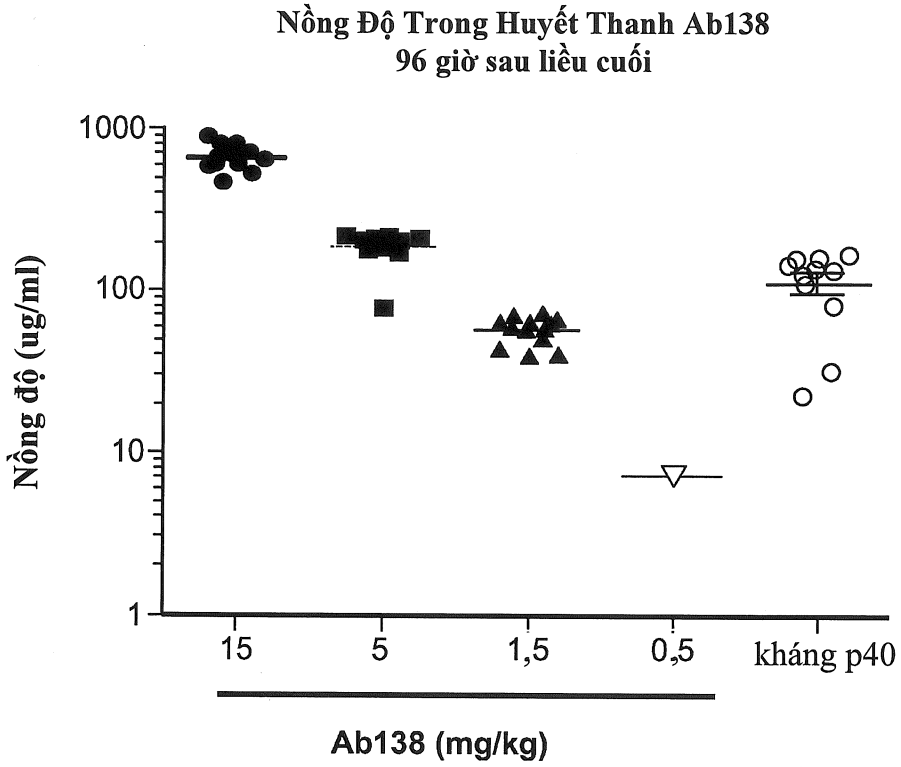
Mô học TCT-3012
Đại Thực Bào IBA$^+$ trong Trực Tràng



***P<0,001 so với IgG

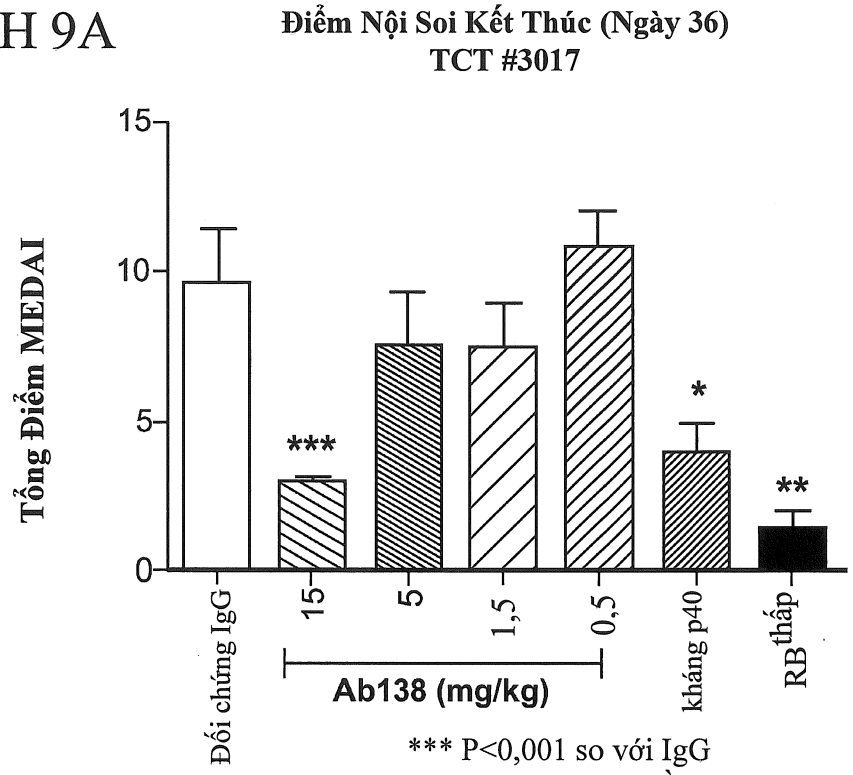
ANOVA /Sau Thử nghiệm Dunnett

HÌNH 8



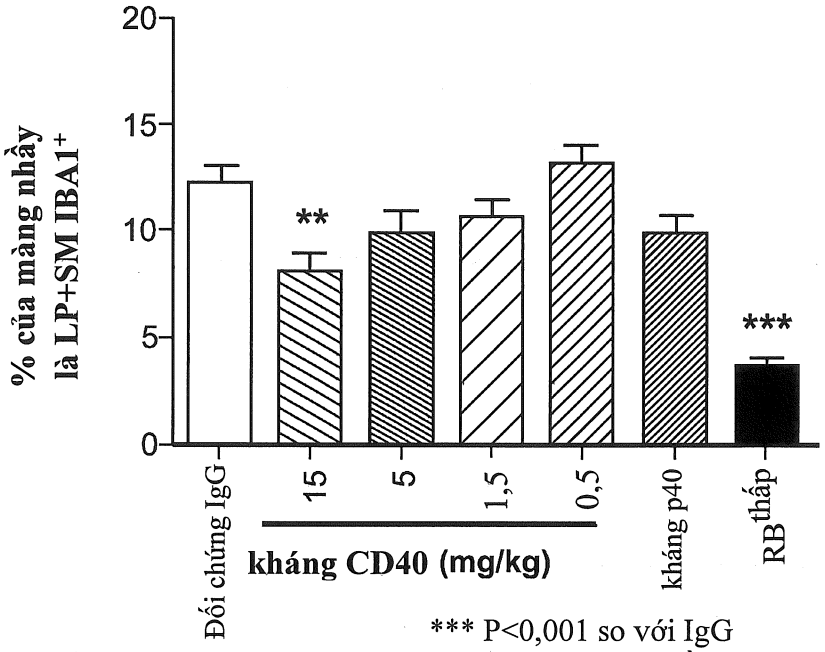
chỉ 1 con vật ở nhóm 0,5 mg/kg có hàm lượng đo được của Ab138

HÌNH 9A



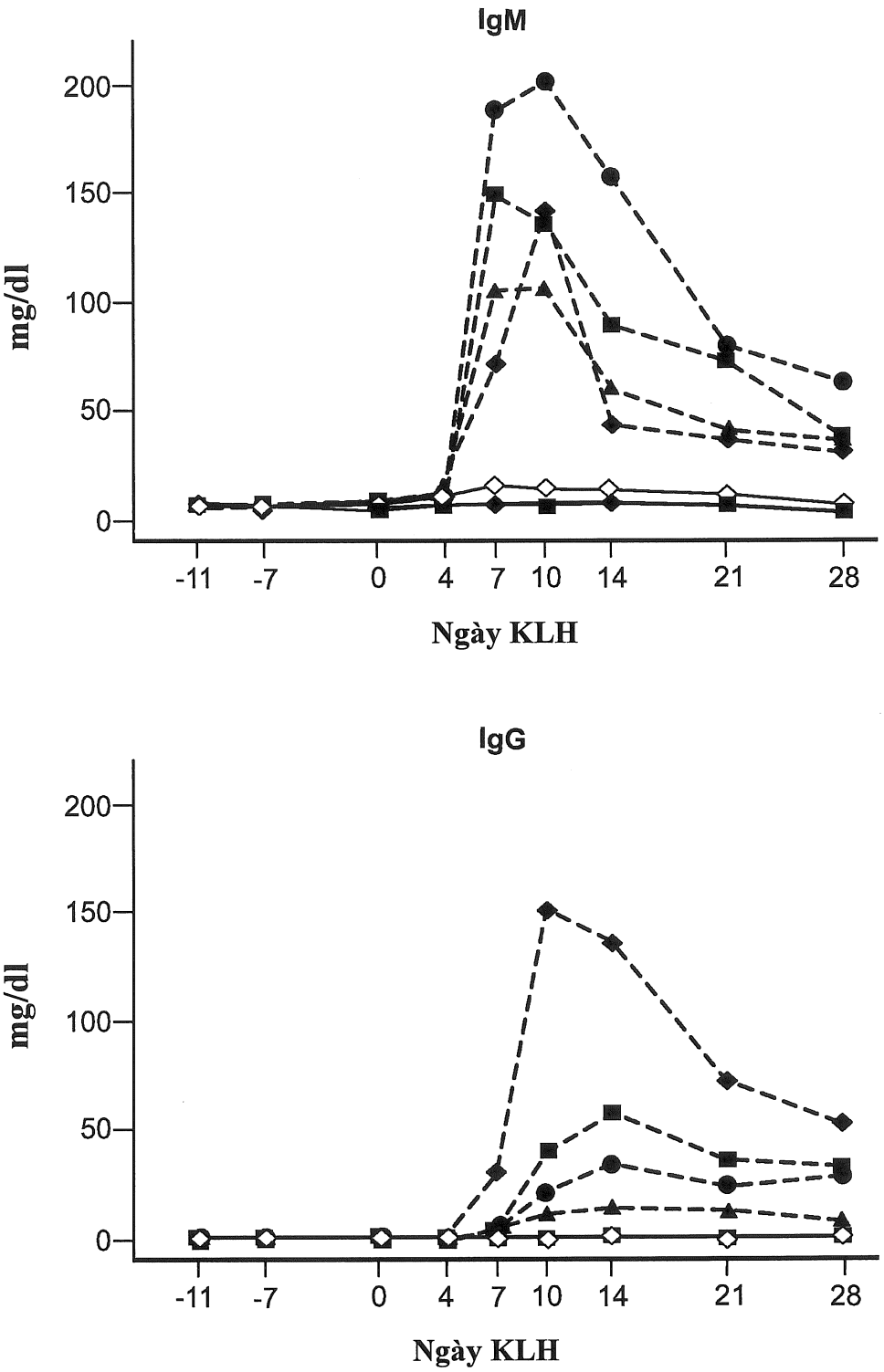
*** P<0,001 so với IgG
ANOVA 1 thành phần/Sau Thử Nghiệm Dunnett

HÌNH 9B

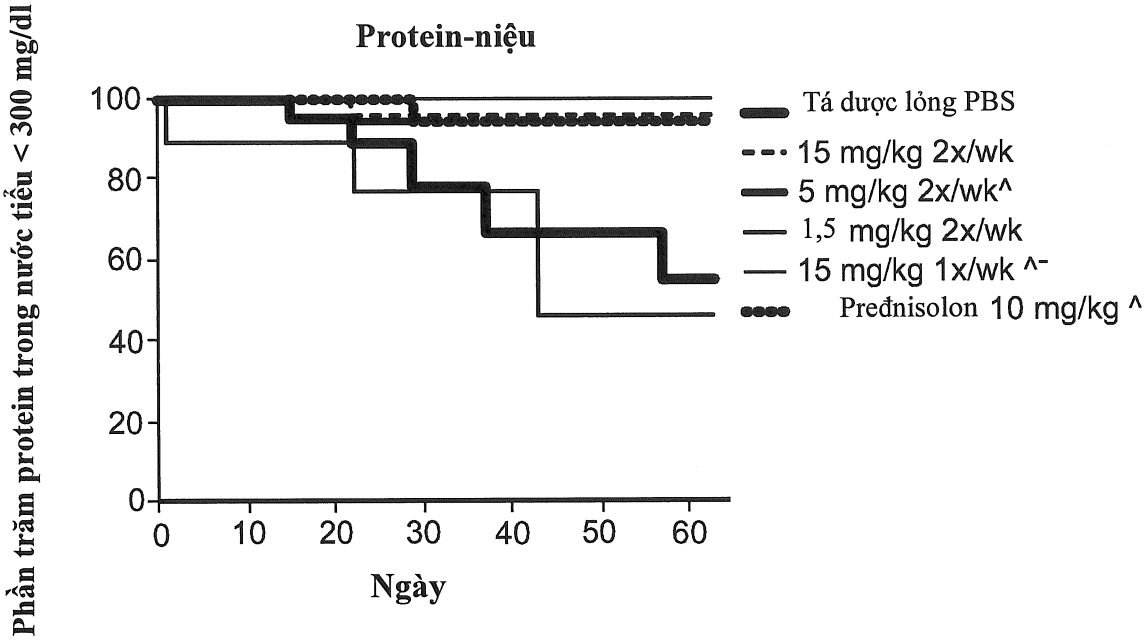


*** P<0,001 so với IgG
ANOVA 1 thành phần/Sau Thử Nghiệm Dunnett

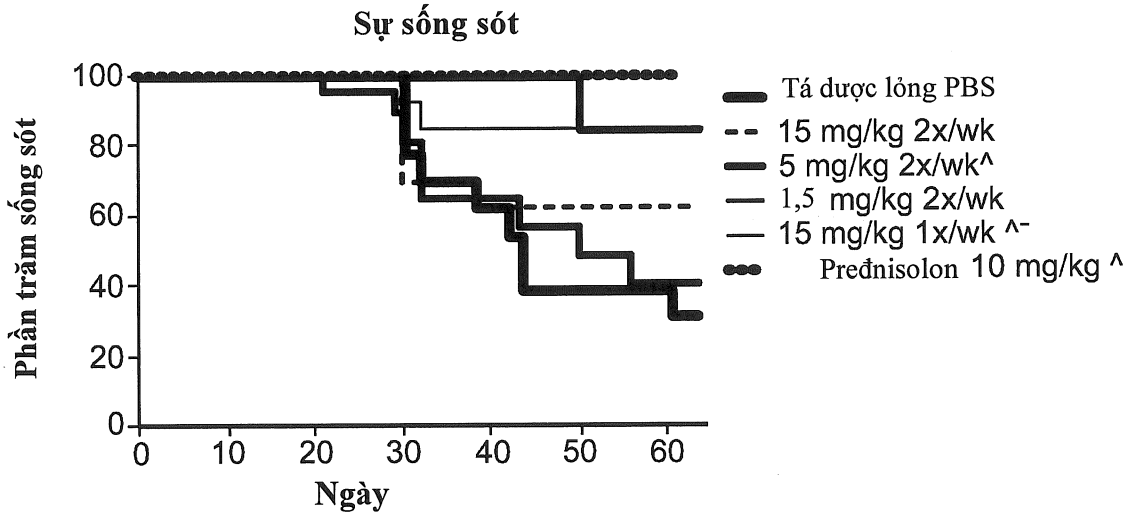
HÌNH 10


IgM
200
150
100
50
0
mg/dl
-11
-7
0
4
7
10
14
21
28
Ngày KLH
IgG
200
150
100
50
0
mg/dl
-11
-7
0
4
7
10
14
21
28
Ngày KLH

HÌNH 11A

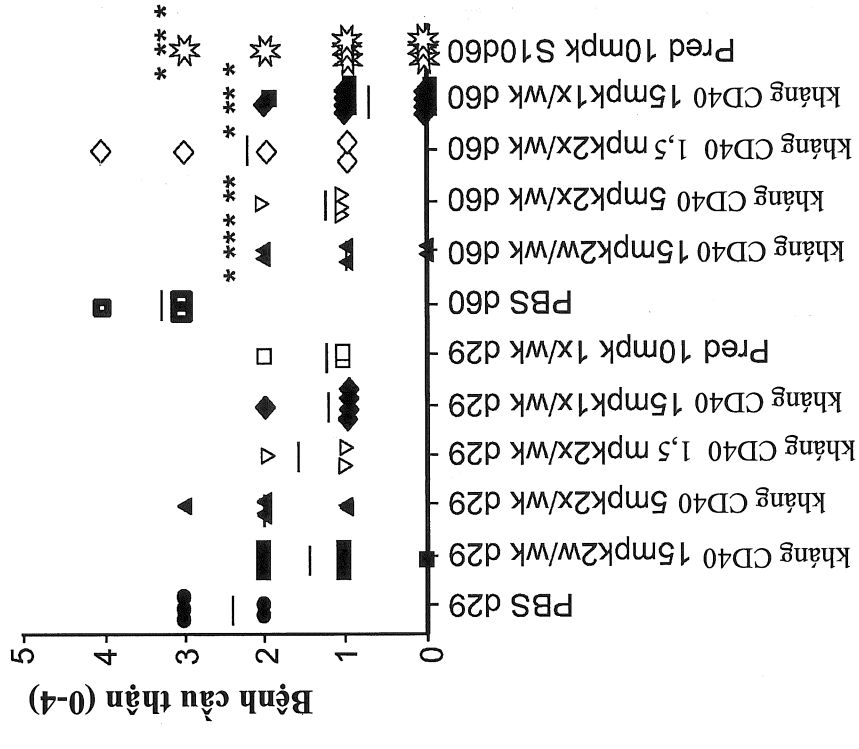


HÌNH 11B

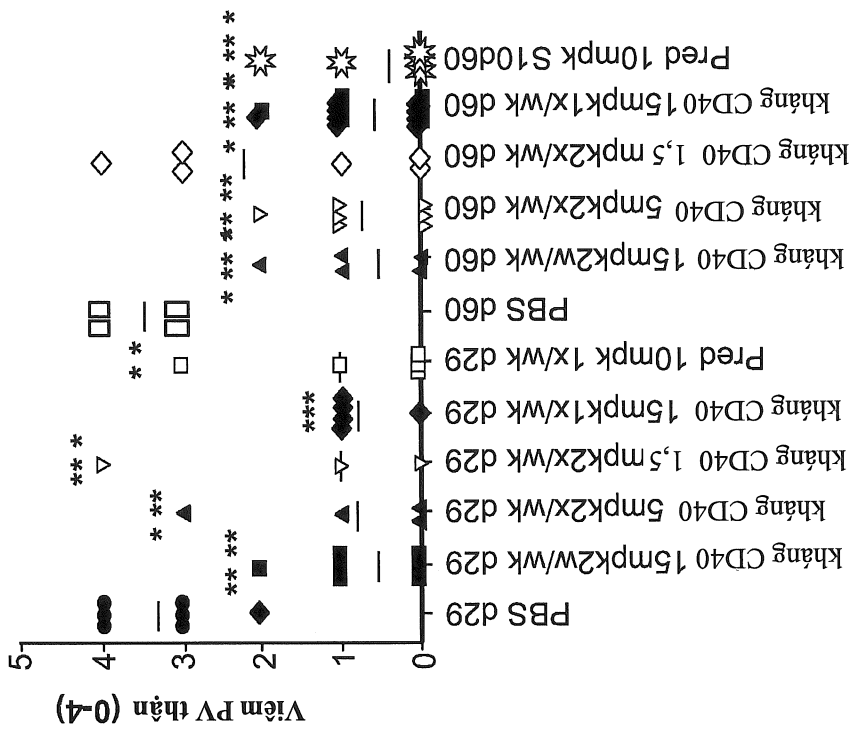


^ Sống sót giá trị p <0,05Log Rank Thử nghiệm Mandel Cox
-Protein niệu so với Đối Chứng Tá Dược Lỏng tương ứng

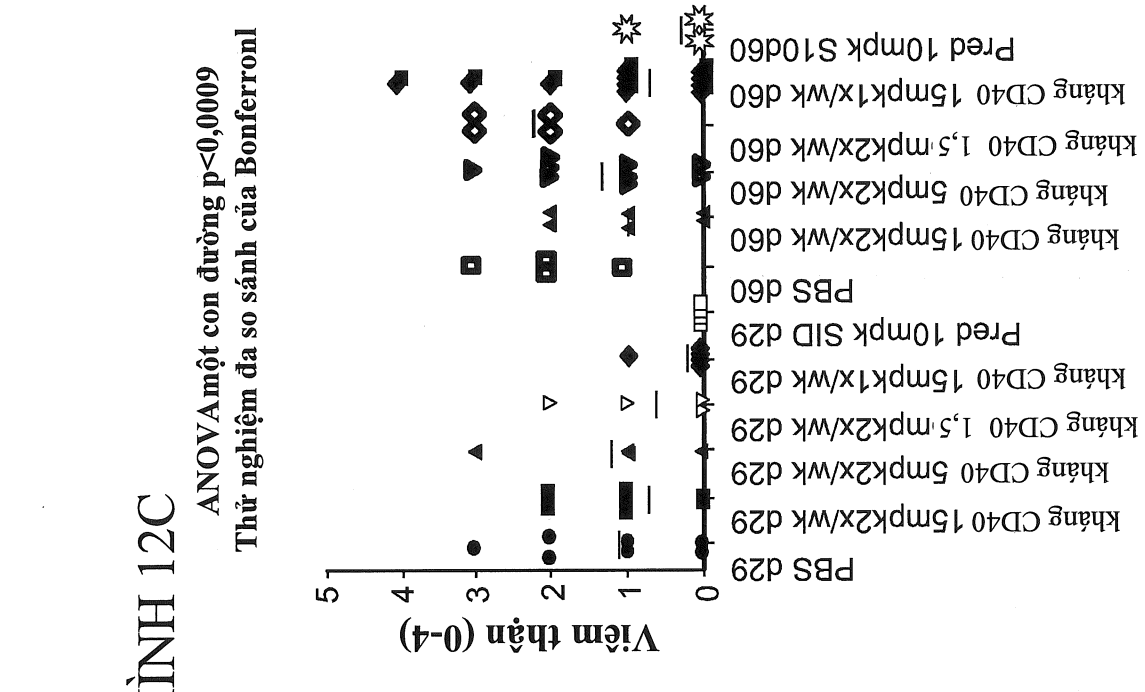
HÌNH 12A



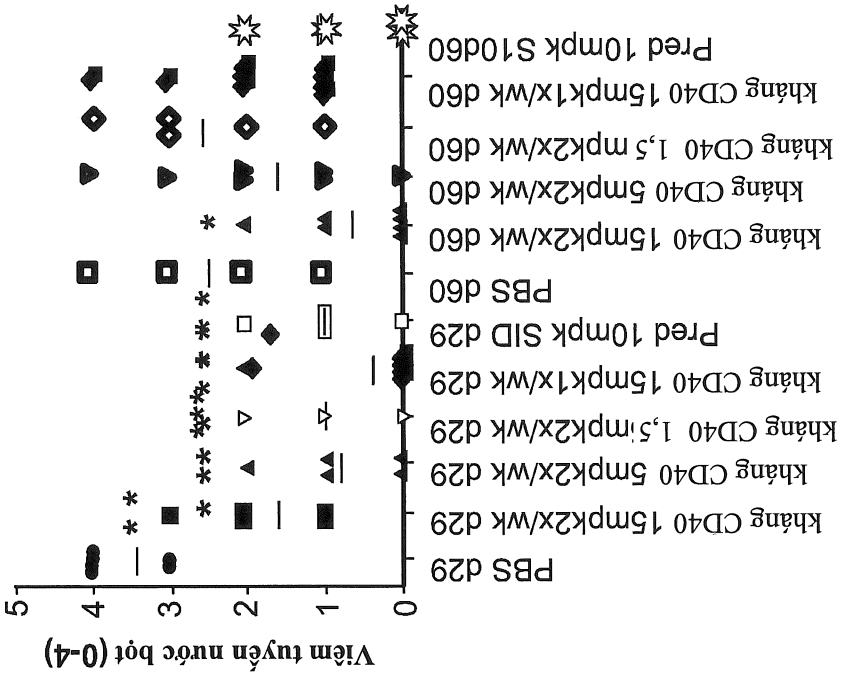
HÌNH 12B



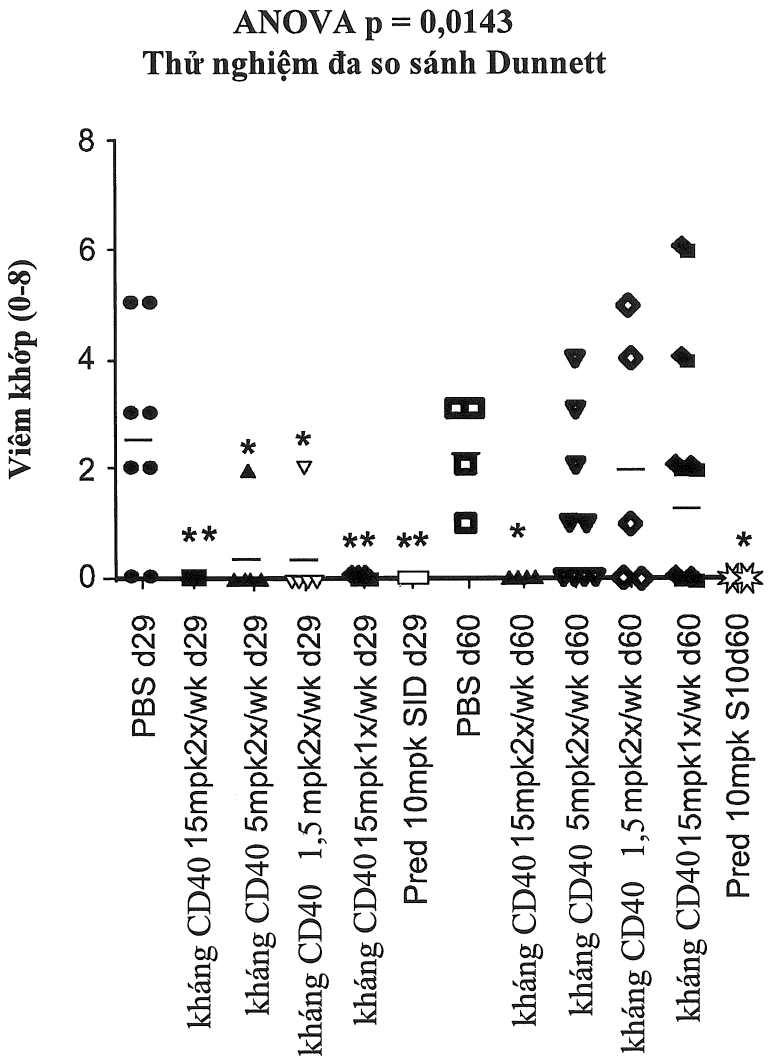
HÌNH 12C



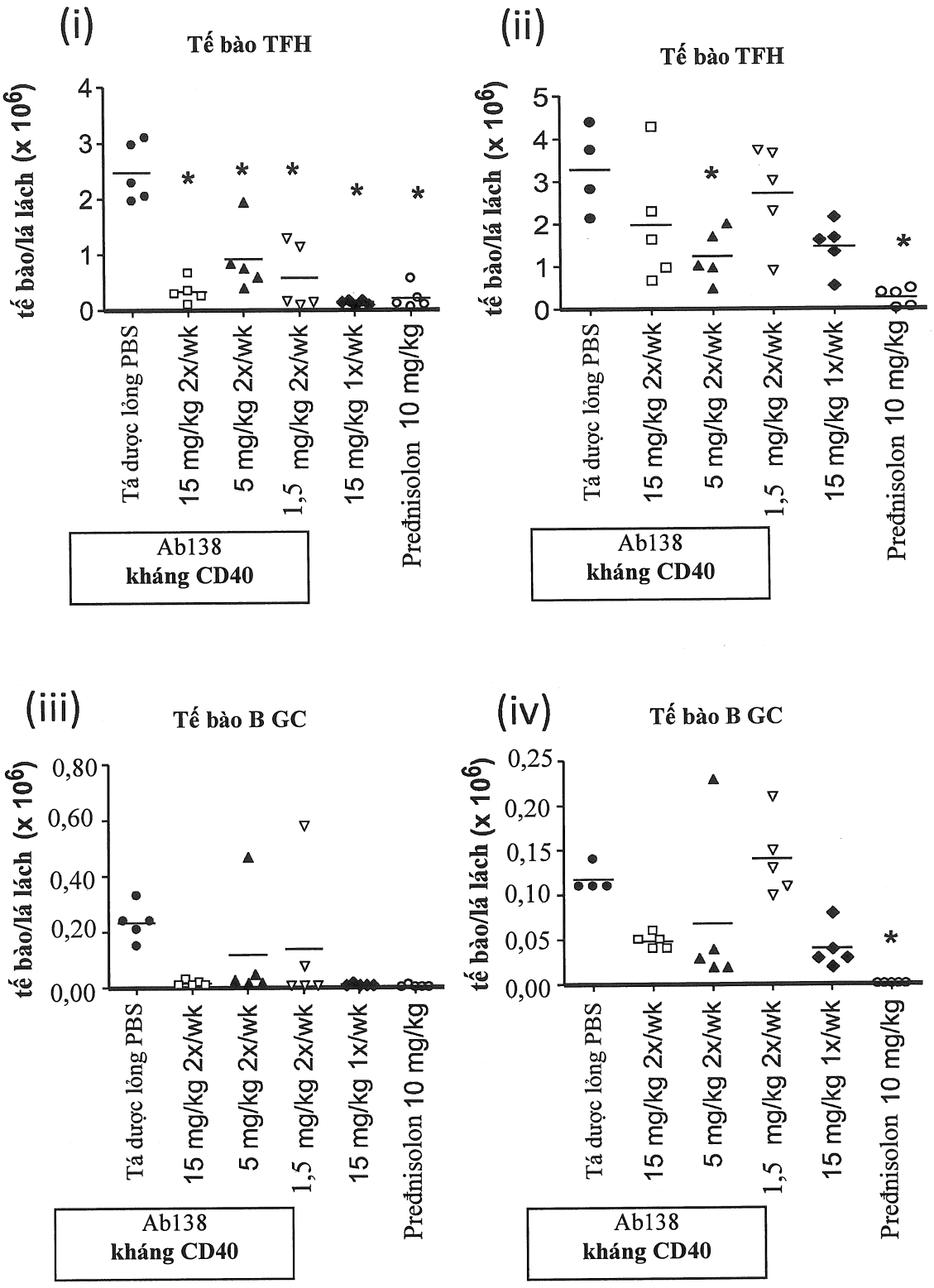
HÌNH 13A



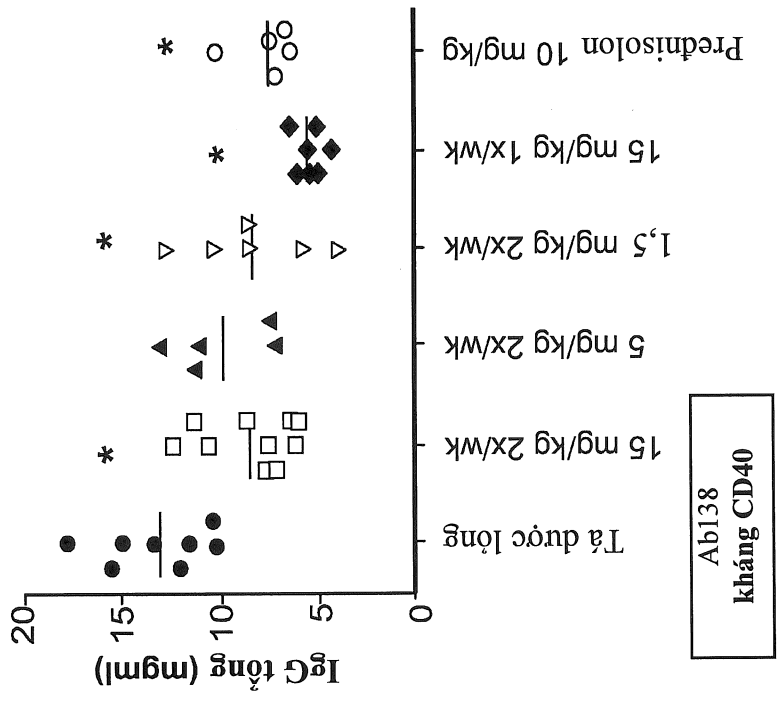
HÌNH 13B


ANOVA p = 0,0143
Thử nghiệm đa so sánh Dunnett
Viêm khớp (0-8)
8
6
4
2
0
PBS d29
kháng CD40 15mpk2x/wk d29
kháng CD40 5mpk2x/wk d29
kháng CD40 1,5 mpk2x/wk d29
kháng CD40 15mpk1x/wk d29
Pred 10mpk SID d29
PBS d60
kháng CD40 15mpk2x/wk d60
kháng CD40 5mpk2x/wk d60
kháng CD40 1,5 mpk2x/wk d60
kháng CD40 15mpk1x/wk d60
Pred 10mpk S10d60

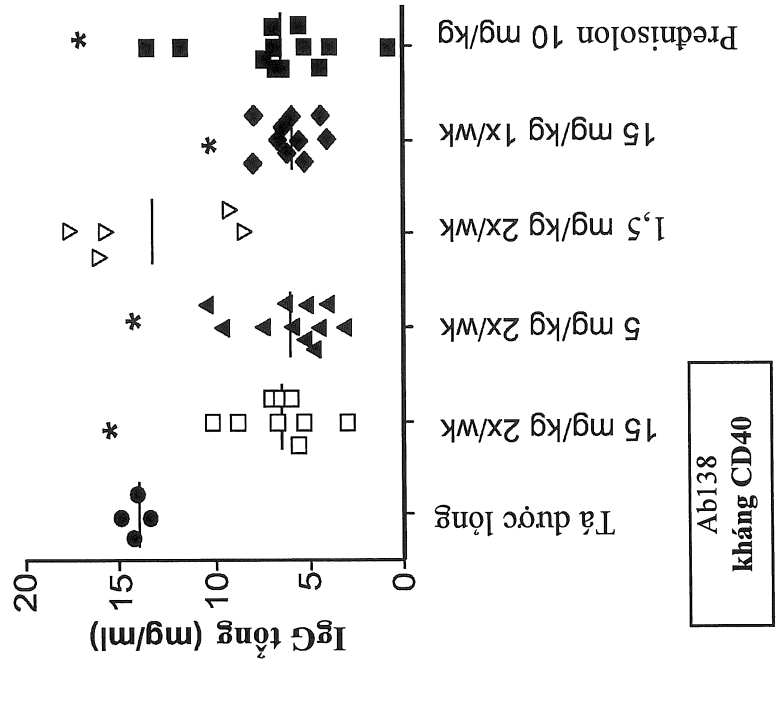
HÌNH 14


(i)
Tế bào TFH
tế bào/lá lách (x 10^6)
Tá dược lỏng PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1,5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
Prednisolon 10 mg/kg
Ab138
kháng CD40
(ii)
Tế bào TFH
tế bào/lá lách (x 10^6)
Tá dược lỏng PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1,5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
Prednisolon 10 mg/kg
Ab138
kháng CD40
(iii)
Tế bào B GC
tế bào/lá lách (x 10^6)
Tá dược lỏng PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1,5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
Prednisolon 10 mg/kg
Ab138
kháng CD40
(iv)
Tế bào B GC
tế bào/lá lách (x 10^6)
Tá dược lỏng PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1,5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
Prednisolon 10 mg/kg
Ab138
kháng CD40

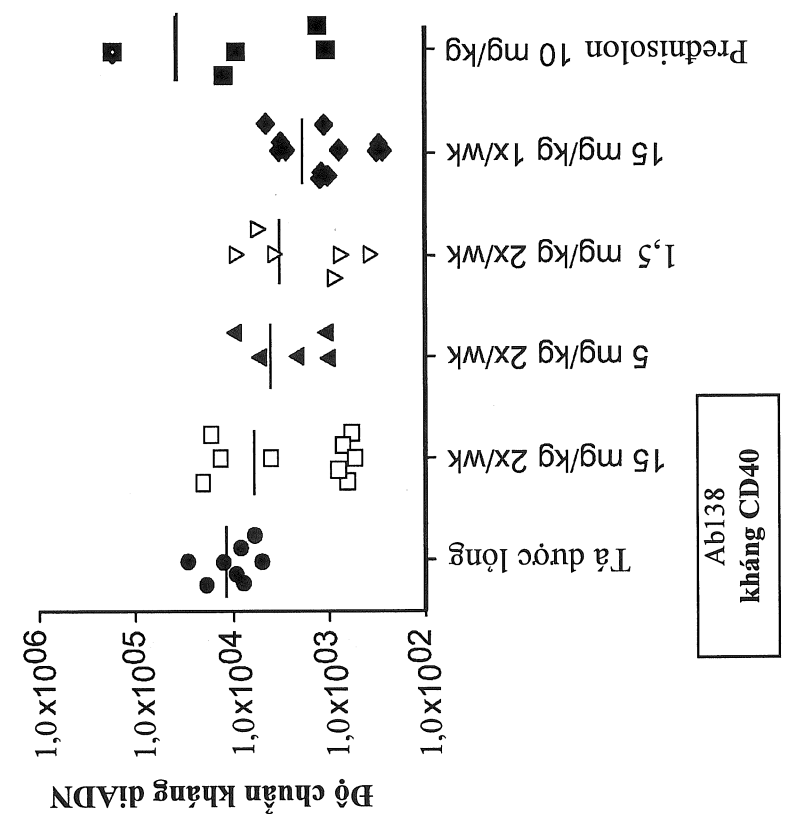
HÌNH 15A



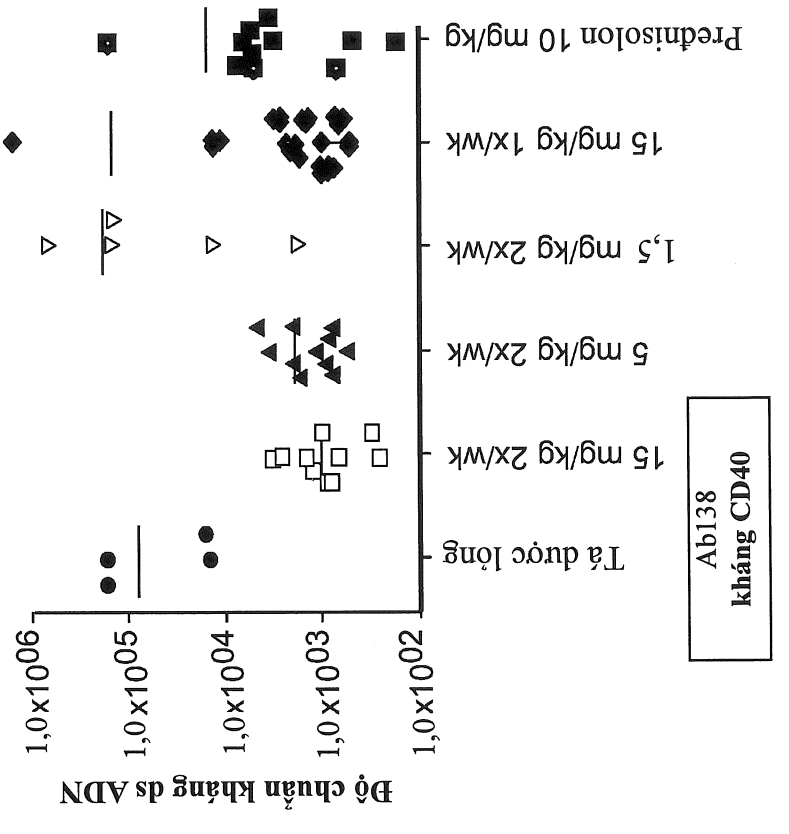
HÌNH 15B



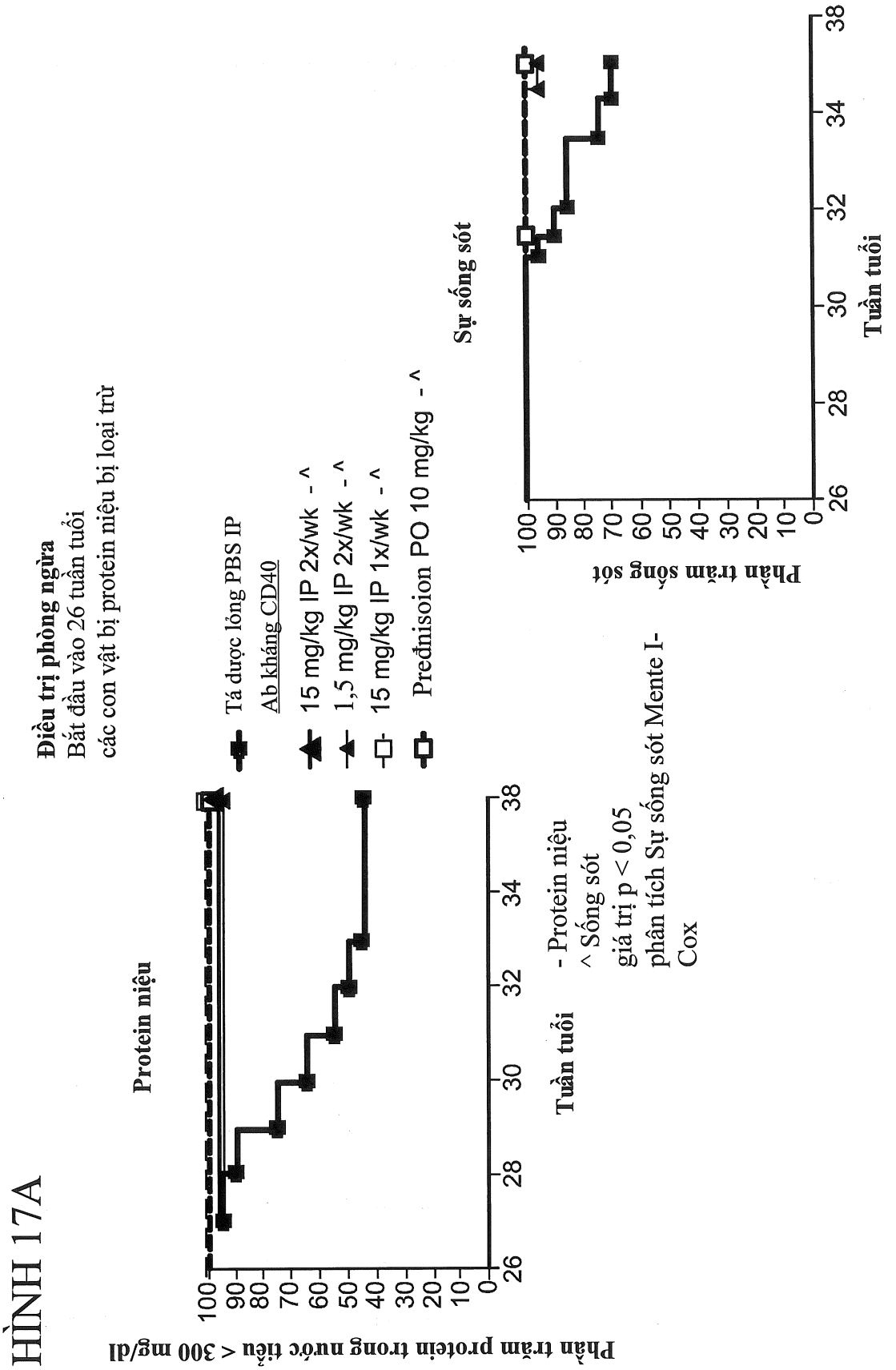
HÌNH 16A



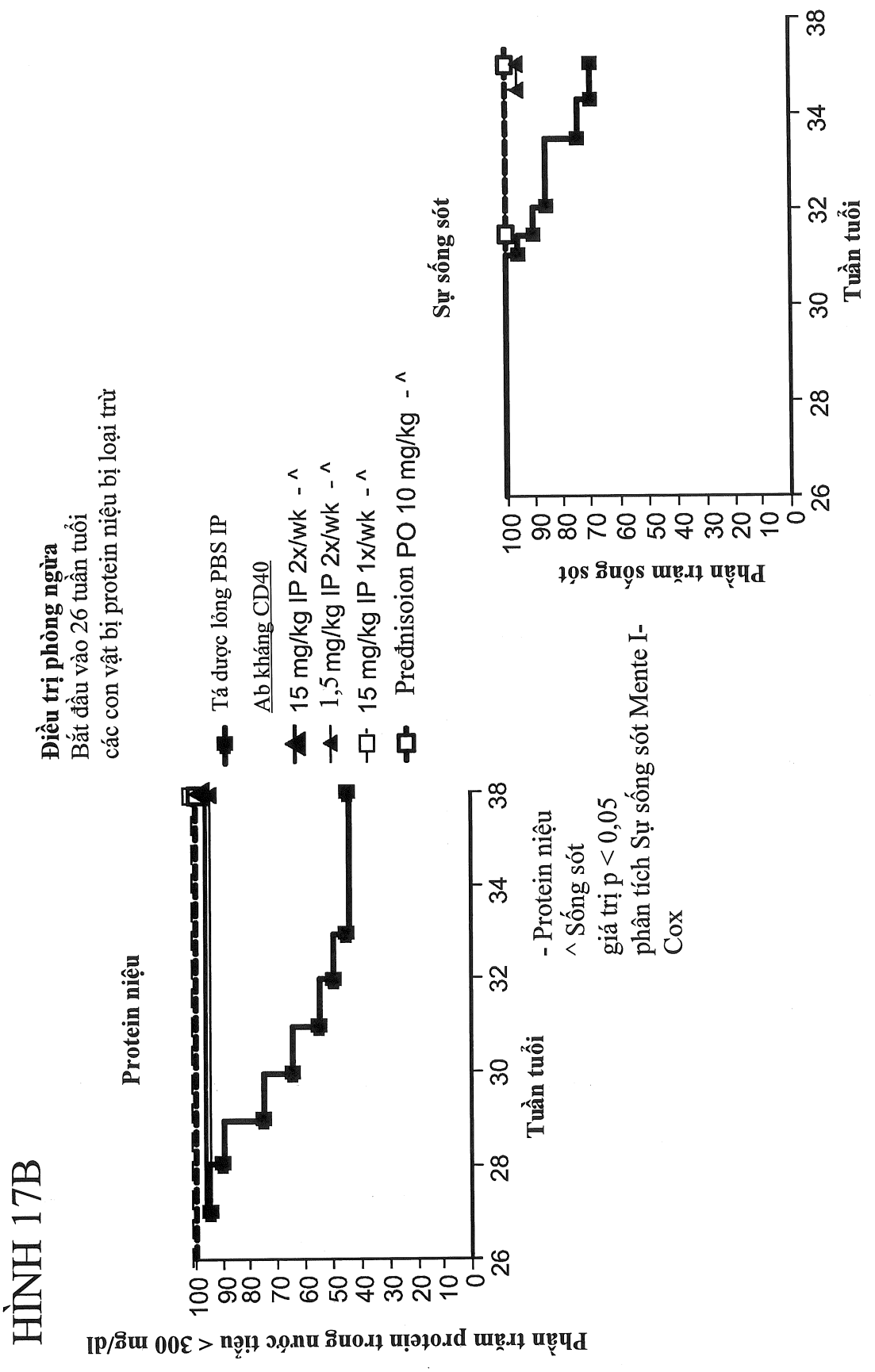
HÌNH 16B



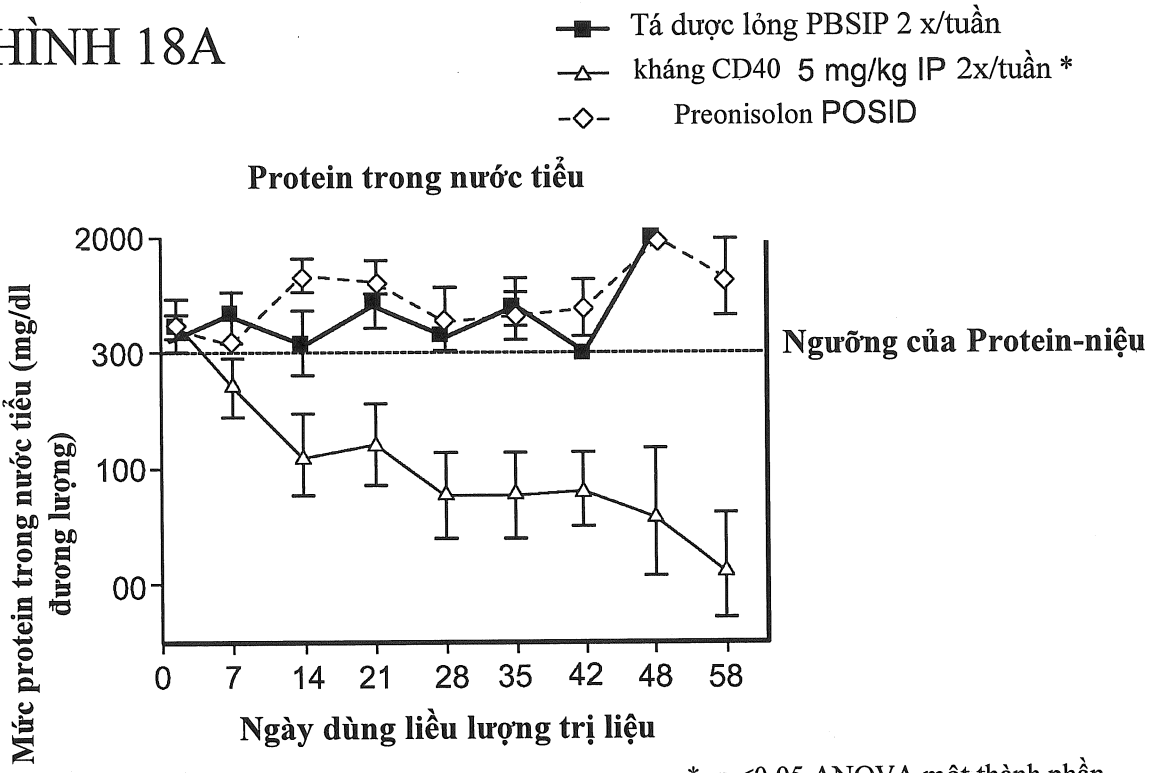
HÌNH 17A


Điều trị phòng ngừa
Bắt đầu vào 26 tuần tuổi
các con vật bị protein niệu bị loại trừ
Protein niệu
Phần trăm protein trong nước tiểu < 300 mg/dl
Tuần tuổi
- Protein niệu
^ Sống sót
giá trị p < 0,05
phân tích Sự sống sót Mente I-Cox
Tá dược lỏng PBS IP
Ab kháng CD40
15 mg/kg IP 2x/wk - ^
1,5 mg/kg IP 2x/wk - ^
15 mg/kg IP 1x/wk - ^
Prednisoion PO 10 mg/kg - ^
Sự sống sót
Phần trăm sống sót
Tuần tuổi

HÌNH 17B

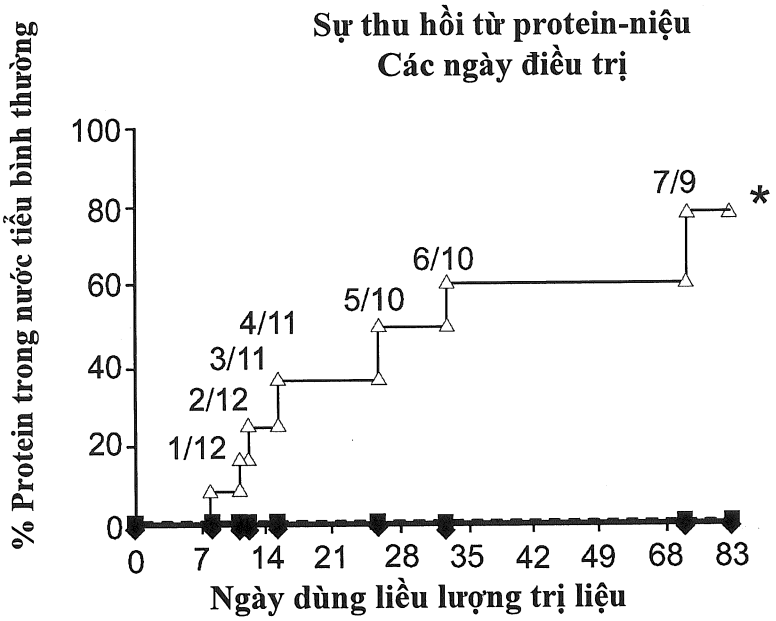

Điều trị phòng ngừa
Bắt đầu vào 26 tuần tuổi
các con vật bị protein niệu bị loại trừ
Protein niệu
Phần trăm protein trong nước tiểu < 300 mg/dl
Tuần tuổi
Tá dược lỏng PBS IP
Ab kháng CD40
15 mg/kg IP 2x/wk - ^
1,5 mg/kg IP 2x/wk - ^
15 mg/kg IP 1x/wk - ^
Prednisoion PO 10 mg/kg - ^
- Protein niệu
^ Sống sót
giá trị p < 0,05
phân tích Sự sống sót Mente I-Cox
Sự sống sót
Phần trăm sống sót
Tuần tuổi

HÌNH 18A



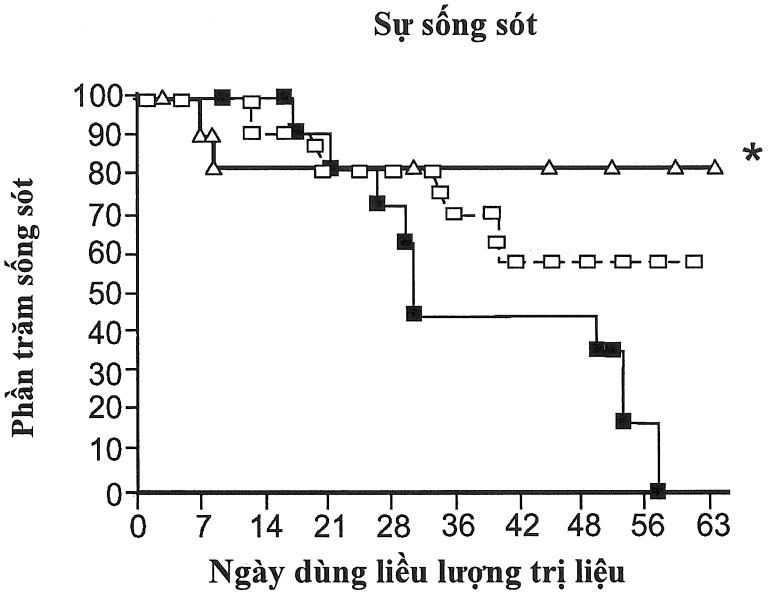
* p <0,05 ANOVA một thành phần
Thử nghiệm đa so sánh của Knuskai Wall và Dunns

HÌNH 18B



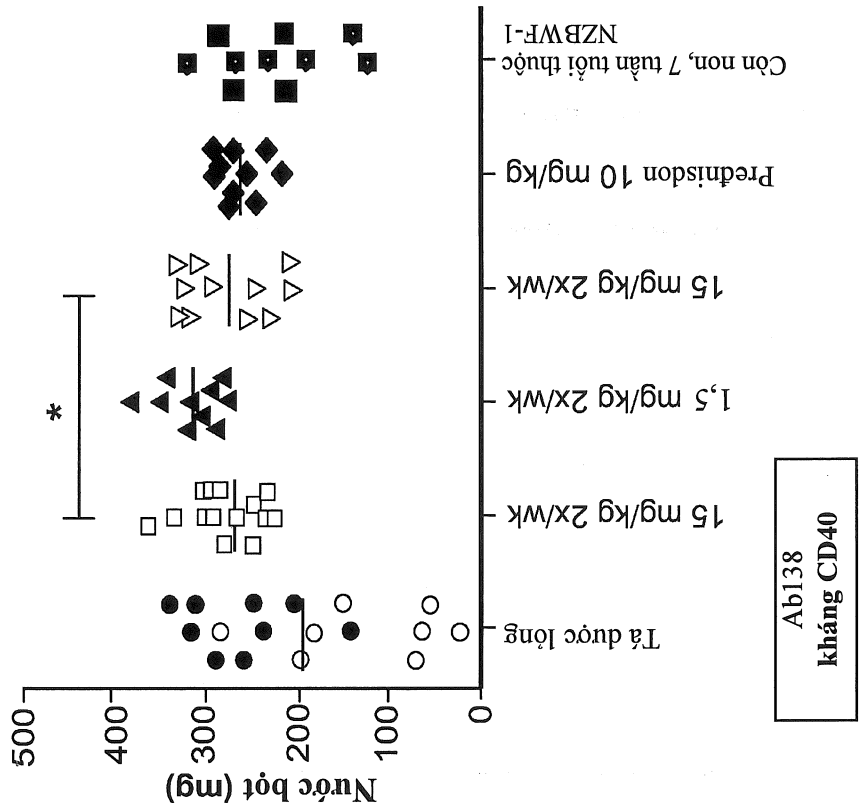
Giá trị ^p sống sót <0,05
Phân tích sự sống sót Mondel Cox

HÌNH 18C

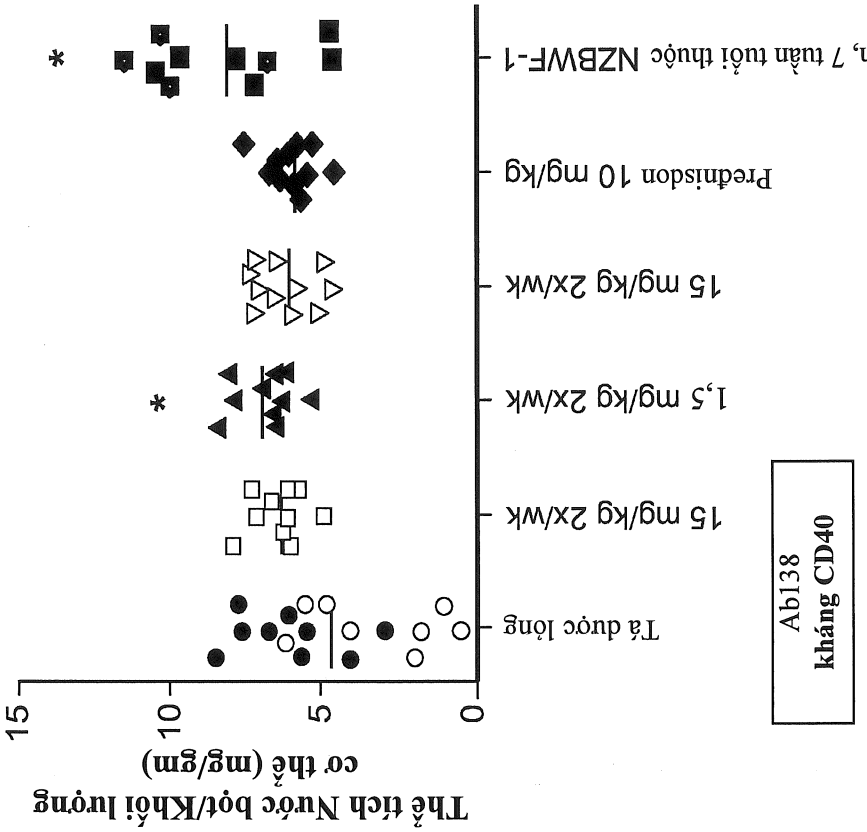


Giá trị ^p <0,05
Phân tích sự sống sót Mondel Cox

HÌNH 19A

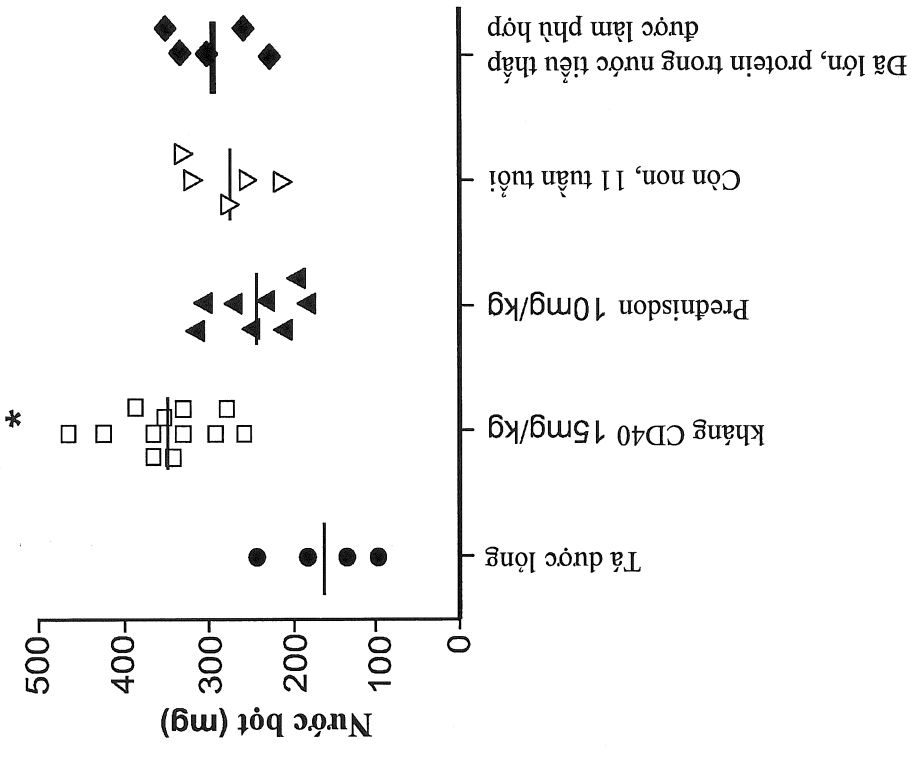


HÌNH 19B

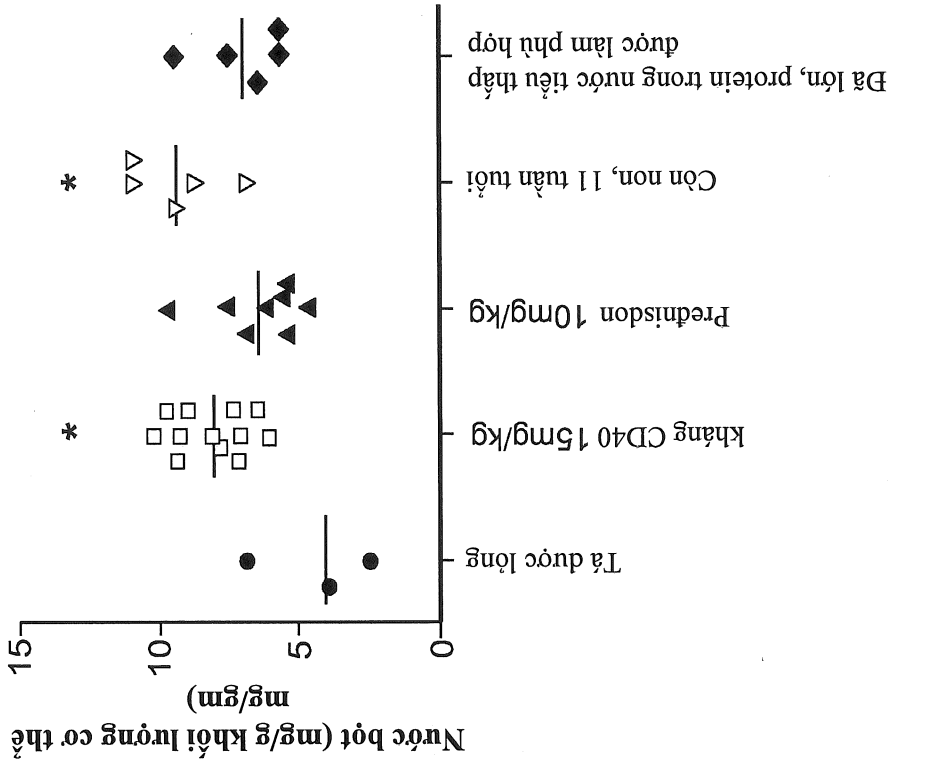


Hình tròn tá dược lỏng màu trắng = Chuột bị protein niệu

HÌNH 20A



HÌNH 20B



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ABBVIE, INC.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD40 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 117813-10420

<140>
<141>

<150> 62/168,425
<151> 2015-05-29

<160> 117

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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
```

<210> 2
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
```

```
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
```

```
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 6
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 7
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 8
Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 9
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Met Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 10
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 11
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12
Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 14
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 15
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

```
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 17

```
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1               5                   10                  15

Thr
```

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 19
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 21
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 22
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 22
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115


<210> 29
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 30
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115


<210> 37
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

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

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 40

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Arg
			20					25					30		

Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65				70					75						80

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

Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
		100					105					110			

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215                 220
```

<210> 41
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 41

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

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

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

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

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

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

```
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 42
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 43
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 44
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 44
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 45
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 46
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 47
Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 48
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser Val Ile Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 49
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 49
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 50
Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 51
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 52
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 53
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu 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 His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 56
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu 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 His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 57

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

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

Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu 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 His
                85                  90                  95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 58

```
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1               5                  10                  15

Gly
```

<210> 59
<211> 17

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 59
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 60
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 61
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 62
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 63
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 64
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 65
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 66
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 67
<211> 17

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 67
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 68
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 69
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 70
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 71
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 72
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ala Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 73
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Pro Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 74
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 75
<211> 116

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 76
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 77
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 77
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="His"

<400> 78
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(6)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Ser" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (17)..(17)
<223> /thay thế="Asp"

<400> 79
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Trp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Ser"

<400> 80
Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 81
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 82
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 83
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 84
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 87
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 89
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

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

<210> 90
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
1 5 10 15

<210> 91
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 92
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 94
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94
Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 95
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 96
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 98
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 100
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100
Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 101
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102
Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 103
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 104
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 105
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 107
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

```
Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln
1               5                  10                  15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr
            20                  25                  30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
        35                  40                  45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
    50                  55                  60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
65                  70                  75                  80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
                85                  90                  95

Glu Ser Cys Val
            100
```

<210> 108
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (17)..(17)
<223> /thay thế="Tyr"

<400> 108
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Met"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ala"

<400> 109
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Met"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Glu"

<400> 110
Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Axit amin bất kỳ không phải là Thr, Asp, Val, Leu, Ile hoặc Met

<400> 111
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 112
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Axit amin bất kỳ

<400> 112
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 113
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Axit amin bất kỳ không phải là Pro

<400> 113
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 114
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 115
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Đuôi 6xHis tổng hợp"

<400> 115
His His His His His His
1 5

<210> 116
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (18)..(18)
<223> /thay thế="Met" hoặc "Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (24)..(24)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (27)..(27)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (31)..(31)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (33)..(33)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (35)..(35)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (36)..(36)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (37)..(37)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (40)..(40)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (56)..(56)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (57)..(57)
<223> /thay thế="Met"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (60)..(60)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (61)..(61)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (95)..(95)

<223> /thay thế="Met"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (96)..(96)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (97)..(97)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (98)..(98)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (99)..(99)
<223> /thay thế="Glu"

<400> 116

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

Glu	Ser	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		

Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80

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

Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu

100 105 110

Lys

<210> 117
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Trình tự lien ứng tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (27)..(27)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (30)..(30)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (31)..(31)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (33)..(33)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (35)..(35)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (52)..(52)
<223> /thay thế="Asn"

<220>

<221> BIẾN THỂ
<222> (53)..(53)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (54)..(54)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (55)..(55)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (56)..(56)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (57)..(57)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (58)..(58)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (59)..(59)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (61)..(61)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (62)..(62)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (63)..(63)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (64)..(64)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (66)..(66)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (99)..(99)
<223> /thay thế="Trp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (100)..(100)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (101)..(101)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (102)..(102)
<223> /thay thế="Ser"

<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```