



(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)



1-0032790

(51)⁸ A61K 39/395; C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2018-00840

(22) 04/08/2016

(86) PCT/US2016/045574 04/08/2016

(87) WO/2017/024146 09/02/2017

(30) 62/201,150 05/08/2015 US; 62/367,660 28/07/2016 US

(45) 25/08/2022 413

(43) 25/07/2018 364A

(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)

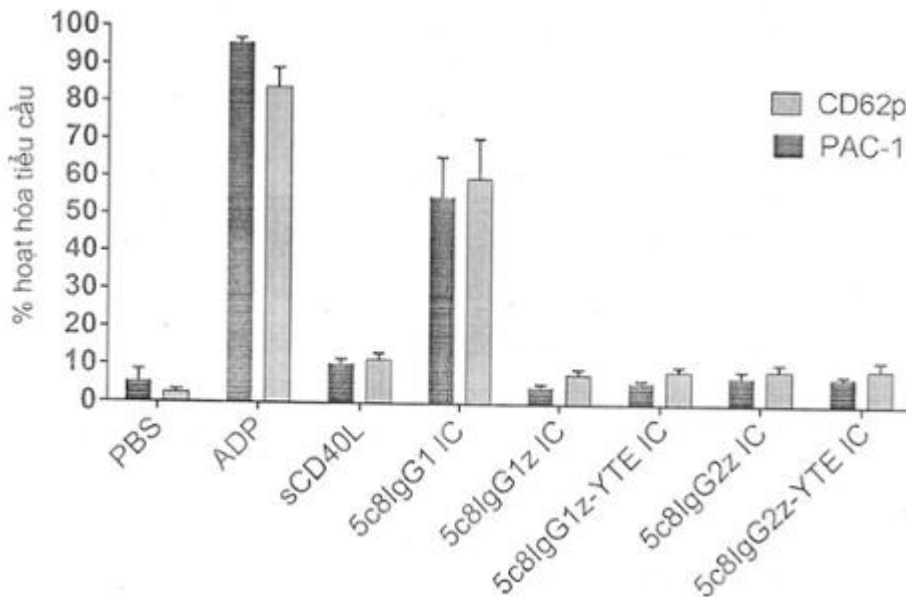
800/850 Ridgeview Drive Horsham, Pennsylvania 19044 (US)

(72) FRANSSON, Johan (CA); LEU, Jocelyn (US); OBMOLLOVA, Galina (US); SURI, Anish (BE); TENG, Fang (US); TEPLYAKOV, Alexey (US); ZHOU, Hong (US).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ ĐỐI KHÁNG PHÂN LẬP ĐƯỢC LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD154 NGƯỜI, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH, VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154, các polynucleotit mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể, thể liên hợp miễn dịch, dược phẩm và các phương pháp tạo ra chúng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154, các polynucleotit mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể, thể liên hợp miễn dịch, được phẩm và phương pháp tạo ra chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD154, còn được gọi là phối tử CD40 (CD40L), gp39, protein hoạt hóa liên quan TNF (TRAP), kháng nguyên 5c8, hoặc T-BAM, là protein xuyên màng tam phân (trimer) của siêu họ yếu tố hoại tử khối u (TNF). CD154 được biểu hiện phụ thuộc vào sự hoạt hóa, bị giới hạn theo thời gian trên bề mặt các tế bào T CD4⁺. CD154 cũng được biểu hiện, sau khi hoạt hóa, trên tập con các tế bào T CD8⁺, bạch cầu ưa bazơ, dưỡng bào, bạch cầu ái toan, tế bào sát thủ tự nhiên, tế bào B, đại thực bào, các tế bào tua và tiểu cầu. CD154 cũng tồn tại dưới dạng tan trong máu.

CD154 liên kết với CD40 trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC), dẫn đến các đáp ứng khác nhau tùy thuộc vào loại tế bào đích. Tương tác CD40-CD154 là cần thiết đối với các tương tác tế bào T-B bình thường, bao gồm sự gia tăng đồng kích thích, tạo môi trường tế bào T, sản xuất cytokin, chuyển đổi isotyp và trưởng thành ái lực, và sản xuất kháng thể và tự kháng thể.

Sự gián đoạn của đường CD40/CD154 do ức chế CD154 đã cho thấy là có lợi trong các căn bệnh tự miễn như lupus ban đỏ hệ thống (SLE), viêm khớp dạng thấp (RA), xơ cứng rải rác (MS), bệnh viêm ruột (IBD), tiểu đường loại I (T1D), và thải bỏ bộ phận ghép. Ở người, các đột biến trong CD40 hoặc CD154 tạo nên hội chứng tăng IgM đặc trưng bởi sự thiếu isotyp IgG hoặc IgA (Aruffo và cộng sự, Cell (Tế bào) 72:291, 1993).

Các kháng thể kháng CD154 đã được mô tả, ví dụ, trong các Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1993/08207, WO1994/10308, WO1996/40918, WO1993/009812, WO1999/051258, WO1995/006480, WO1995/006481, WO1995/006666, WO2001/002057, WO1997/017446, WO1999/012566, WO2001/068860,

WO2005/003175, WO2006/033702, WO2006/030220, WO2008/118356, WO2012/052205, WO2012/138768, WO2012/138768, WO2013/055745 và WO2013/056068.

Các kháng thể kháng CD154 đã được minh chứng là có hiệu quả trong điều trị các bệnh tự miễn ở người. Tuy nhiên, hiện tượng huyết khối thuyên tắc do hoạt hóa tiểu cầu quan sát được sau khi điều trị đã ngăn cản việc tiếp tục phát triển lâm sàng. Sự gắn kết của FcγRIIa trên các tiểu cầu đã cho thấy là nguyên nhân khiến kháng thể kháng CD154 5c8 gây nên sự hoạt hóa tiểu cầu (Xie và cộng sự, J Immunol (Tạp chí Miễn dịch học) 192:4083-4092, 2014).

Vì thế, cần có các kháng thể kháng CD154 bổ sung với các mức hiệu lực và tính an toàn được nâng cao hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 người có SEQ ID NO: 1, bao gồm vùng xác định hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), và HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), trong đó tùy chọn

gốc S1 của HCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T hoặc V;

gốc I4 của HCDR1 được đột biến thành M, L hoặc V;

gốc S5 của HCDR1 được đột biến thành A;

gốc S3 của HCDR2 được đột biến thành A, T hoặc V;

gốc P4 của HCDR2 được đột biến thành V, T, L Q hoặc E;

gốc N8 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

gốc T9 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

gốc N10 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

gốc S1 của HCDR3 được đột biến thành A hoặc M;

gốc R2 của HCDR3 được đột biến thành A, S, Q hoặc K; và

gốc L7 của HCDR3 được đột biến thành M.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, trong đó kháng thể bao gồm một số trình tự axit amin của VH và VL như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, trong đó kháng thể bao gồm một số trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1 bao gồm:

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 44 và 52;

VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66; hoặc

chuỗi nặng có SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 81.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, trong đó CD154 là homotrimer và kháng thể liên kết với monome CD154 thứ nhất trong homotrimer trong các gốc axit amin 182-207 của CD154 và monome CD154 thứ hai trong homotrimer trong các gốc axit amin 176-253 của CD154, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.

Sáng chế đồng thời đề xuất thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế liên kết với tác nhân điều trị hoặc chất tạo ảnh.

Sáng chế đồng thời đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Sáng chế đồng thời đề xuất polynucleotit mã hóa VH của kháng thể theo sáng chế, VL của kháng thể theo sáng chế, hoặc VH và VL của kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế đồng thời đề xuất vector bao gồm polynucleotit theo sáng chế.

Sáng chế đồng thời đề xuất tế bào chủ bao gồm vector theo sáng chế.

Sáng chế đồng thời đề xuất phương pháp tạo kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện mà trong đó kháng thể được biểu hiện, và bước thu hồi kháng thể được sản sinh từ tế bào chủ.

Sáng chế đồng thời bộc lộ phương pháp điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm qua trung gian miễn dịch, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể phân lập theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết với kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế đồng thời đề xuất bộ kit bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 minh họa tác động của Fc kháng thể đối với sự hoạt hóa tiểu cầu bằng các phức hợp miễn dịch (IC) CD154:kháng thể. IC của CD154 người dạng tan (shCD154, được biểu thị là sCD40L trong hình) và các tiểu cầu được hoạt hóa bởi kháng thể kháng CD154 5c8 (isotyp IgG1) (IC 5c8IgG1), trong khi IC của shCD154 và 5c8 tạo dòng trên khung IgG1 bất hoạt IgG1sigma, IgG1sigma-YTE, IgG2sigma hoặc IgG2sigma-YTE (lần lượt 5c8IgG1z, 5c8IgG1z-YTE, 5c8IgG2z hoặc 5c8IgG2z-YTE) không có tác dụng. Sự hoạt hóa tiểu cầu được đánh giá dưới dạng % tổng các tiểu cầu biểu hiện PAC-1 (kháng thể PAC-1 nhận biết đặc hiệu dạng cấu hình hoạt động của integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$) và CD62p (biểu hiện bề mặt P-selectin). ADP: đối chứng dương. PBS: đối chứng âm. Năm đối tượng cho được đánh giá về sự hoạt hóa tiểu cầu. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của từng thí nghiệm $\pm$ SD.

Hình 2 minh họa các phức hợp miễn dịch (IC) của shCD154 (sCD40L trong hình) và các kháng thể IgG2sigma/ κ kháng CD154 làm bất hoạt chức năng thực thi là C4LB5, C4LB89, C4LB189, C4LB191, C4LB199 và C4LB150 không hoạt hóa tiểu cầu. Sự hoạt hóa tiểu cầu được đánh giá dưới dạng % tổng tiểu cầu biểu hiện PAC-1 và CD62p. IC của shCD154 và 5c8IgG1 (IC 5c8IgG1) hoạt hóa tiểu cầu. ADP: đối chứng dương. Năm đối tượng cho được đánh giá về sự hoạt hóa tiểu cầu. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của từng thí nghiệm $\pm$ SD.

Hình 3 minh họa các phức hợp miễn dịch (IC) của shCD154 (sCD40L) và các kháng thể kháng CD154 là C4LB89 (IgG2sigma/ κ), C4LB231 (IgG1sigma/ κ), và C4LB232 (IgG1sigma/ κ) không hoạt hóa tiểu cầu. Sự hoạt hóa tiểu cầu được đánh giá dưới dạng % tổng tiểu cầu biểu hiện PAC-1 và CD62p. IC 5c8-IgG1 hoạt hóa tiểu cầu, sự hoạt hóa này bị ức chế bởi kháng thể kháng Fc γ IIa, cho thấy rằng sự hoạt hóa tiểu

cầu của IC CD154/5c8-IgG1 được diễn ra qua trung gian Fc γ RIIa trên các tiểu cầu. ADP: đối chứng dương. PBS: đối chứng âm. Năm đối tượng cho được đánh giá về sự hoạt hóa tiểu cầu. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của từng thí nghiệm $\pm$ SD.

Hình 4 minh họa bề mặt tương tác giữa CD154 và C4LB89. Các gốc thiom F55, Y101 và Y102 trong HCDR2 và HCDR3 đóng góp vào phần lớn các tương tác (việc đánh số gốc theo SEQ ID NO: 59). Chuỗi nhẹ C4LB89 không đóng góp vào liên kết.

Hình 5 minh họa hình ảnh hai chiều về các gốc epitope và paratope được nhận dạng từ cấu trúc tinh thể của CD154 khi đuôi sóc trong phức hợp với C4LB89. Các gốc epitope được khoanh bằng hình elip và các gốc paratope được trình bày trong chuỗi nặng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 (được biểu thị là CDR1, CDR2 và CDR3 trong hình). Kháng thể liên kết đồng thời với hai monome CD154 A và B. Việc đánh số các gốc epitope là theo CD154 người (SEQ ID NO: 1) và việc đánh số các gốc paratope là theo vùng biến đổi chuỗi nặng của C4LB89 (SEQ ID NO: 59).

Hình 6A minh họa sự bắt cặp của các gốc 1-180 của CD154 người (SEQ ID NO: 1, hàng trên) và CD154 khi đuôi sóc (SEQ ID NO: 2, hàng dưới) cho thấy rằng các gốc epitope C4LB89 được bảo toàn giữa CD154 người và khi đuôi sóc. Các gốc epitope trên monome CD154 1 được gạch chân, và các gốc epitope trên monome 2 được gạch chân hai lần.

Hình 6B minh họa sự bắt cặp của các gốc 181-261 của CD154 người (SEQ ID NO: 1, hàng trên) và CD154 khi đuôi sóc (SEQ ID NO: 2, hàng dưới) cho thấy rằng các gốc epitope C4LB89 được bảo toàn giữa CD154 người và khi đuôi sóc. Các gốc epitope trên monome CD154 1 được gạch chân, và các gốc epitope trên monome 2 được gạch chân hai lần.

Hình 7 minh họa các phức hợp miễn dịch (IC) của shCD154 (sCD40L trong hình) và kháng thể IgG1/ κ kháng CD154 là C4LB237 không hoạt hóa tiểu cầu, trong khi IC của shCD154 và kháng thể IgG1 khác 5c8 hoạt hóa tiểu cầu. Các kháng thể đứng riêng không có tác động đến sự hoạt hóa tiểu cầu, sự hoạt hóa tiểu cầu này được đánh giá dưới dạng % tổng tiểu cầu biểu hiện PAC-1 và CD62p. ADP: đối chứng dương. PBS: đối chứng âm. Năm đối tượng cho được đánh giá về sự hoạt hóa tiểu cầu. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của từng thí nghiệm $\pm$ SD. n=4 trong mỗi nhóm.

Hình 8A minh họa các phức hợp miễn dịch (IC) của shCD154 (sCD40L trong hình) và C4LB119 bất hoạt Fc hoạt hóa tiểu cầu mà không phụ thuộc FcγRIIa, trong khi IC của shCD154 và kháng thể có các miền VH/VL của C4LB119 được biểu hiện trên IgG1 (C4LB287) lại hoạt hóa tiểu cầu phụ thuộc FcγRIIa. ADP: đối chứng dương. PBS: đối chứng âm.

Hình 8B minh họa các phức hợp miễn dịch (IC) của shCD154 (sCD40L trong hình) và C4LB94 bất hoạt Fc hoạt hóa tiểu cầu mà không phụ thuộc FcγRIIa, trong khi IC của shCD154 và kháng thể có các miền VH/VL của C4LB94 được biểu hiện trên IgG1 (C4LB289) lại hoạt hóa tiểu cầu phụ thuộc FcγRIIa. ADP: đối chứng dương. PBS: đối chứng âm.

Hình 8C minh họa các phức hợp miễn dịch (IC) của shCD154 (sCD40L trong hình) và C4LB83 bất hoạt Fc hoạt hóa tiểu cầu một cách vừa phải, trong khi IC của shCD154 và kháng thể có các miền VH/VL của C4LB83 được biểu hiện trên IgG1 (C4LB288) lại hoạt hóa tiểu cầu phụ thuộc FcγRIIa. ADP: đối chứng dương. PBS: đối chứng âm.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Tất cả các tài liệu ẩn phẩm, bao gồm nhưng không giới hạn trong các bằng sáng chế và đơn xin cấp bằng sáng chế được nêu trong bản mô tả này sau đây được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn.

Cần hiểu rằng hệ thuật ngữ sử dụng trong tài liệu này chỉ nhằm mô tả các phương án cụ thể và không có ý giới hạn. Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong tài liệu này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của người có trình độ trong ngành mà sáng chế này có liên quan.

Trong bản mô tả này và trong các yêu cầu bảo hộ, dạng số ít “một” bao gồm cả các số nhiều trừ khi ngữ cảnh biểu thị nội dung khác một cách rõ ràng.

Có thể sử dụng các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong tài liệu này trong thực hành thử nghiệm sáng chế, và các phương pháp và vật liệu mô tả trong tài liệu này chỉ là ví dụ. Trong mô tả và yêu cầu bảo hộ sáng chế, hệ thuật ngữ sau sẽ được sử dụng.

“Liên kết đặc hiệu” hoặc “liên kết một cách đặc hiệu” hoặc “liên kết” chỉ việc kháng thể liên kết với kháng nguyên hoặc epitope bên trong kháng nguyên bằng ái lực lớn hơn ái lực đối với các kháng nguyên khác. Thông thường, kháng thể liên kết với kháng

nguyên hoặc epitope bên trong kháng nguyên bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 1×10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ khoảng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, hoặc khoảng 1×10^{-12} M hoặc nhỏ hơn, thông thường bằng K_D nhỏ hơn ít nhất 100 lần so với K_D của nó khi liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ BSA, casein). Có thể đo hằng số phân ly bằng các quy trình chuẩn. Tuy nhiên, các kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitope bên trong kháng nguyên có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ với cùng kháng nguyên từ các loài khác (đồng đẳng), như người hoặc khỉ, ví dụ, khỉ đuôi dài *Macaca fascicularis* (khỉ đuôi dài), tinh tinh thường *Pan troglodytes* (tinh tinh) hoặc khỉ đuôi sóc *Callithrix jacchus* (khỉ đuôi sóc). Trong khi kháng thể đơn đặc hiệu liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên hoặc một epitope, kháng thể đặc hiệu đôi liên kết đặc hiệu với hai kháng nguyên riêng hoặc hai epitope riêng.

“Sự trung hòa” hoặc “trung hòa” hoặc “kháng thể trung hòa” hoặc “chất đối kháng kháng thể” hoặc “chất đối kháng” hoặc “có tính chất đối kháng” chỉ kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ức chế một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính sinh học của CD154 người. Có thể nhận diện các kháng thể đối kháng bằng cách sử dụng các xét nghiệm hoạt tính sinh học của CD154 như được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 người có thể ức chế hoạt tính sinh học của CD154 người ở mức bằng khoảng 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

“CD154” chỉ protein CD154 người (hCD154) (ví dụ CD40L người). Protein đầy đủ chiều dài của CD154 người có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 1. CD154 người có trong màng tế bào dưới dạng protein màng loại II và tồn tại dưới dạng tan trong huyết tương. Dạng liên kết với màng của CD154 bao gồm các gốc 1-261 có SEQ ID NO: 1, với miền xuyên màng ở vị trí giữa các gốc 23-46 và miền ngoại bào trải dài qua các gốc 47-261. Dạng tan của CD154 người (shCD154) được tạo bằng cách xử lý protein của dạng liên kết với màng, và bao gồm các gốc 113-261 có SEQ ID NO: 1 (trình tự axit amin của shCD154 được thể hiện trong SEQ ID NO: 4). Cả dạng liên kết với màng và dạng CD154 tan đều tạo thành các trime hoạt tính sinh học. “CD154” bao gồm các loại CD154 khác nhau, bao gồm monome, đime, trime, dạng liên kết với màng và dạng tan cũng như các biến thể CD154 người xuất

hiện tự nhiên. Trime CD154 người dạng tan (trime shCD154) bao gồm ba chuỗi polypeptit mà mỗi chuỗi có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4.

Trong bản mô tả này, “các kháng thể” có nghĩa rộng và bao gồm các phân tử globulin miễn dịch bao gồm các kháng thể đơn dòng bao gồm các kháng thể đơn dòng chuột, người, nhân hóa và tổng hợp, các mảnh kháng thể, các kháng thể đặc hiệu đôi (bispecific) hoặc các kháng thể đa hiệu, các kháng thể dạng đime, dạng tetrame hoặc đa phân, kháng thể đơn chuỗi, kháng thể miễn và cấu hình cải biến khác bất kỳ của phân tử globulin miễn dịch bao gồm điểm gắn kháng nguyên có tính đặc hiệu yêu cầu. “Các phân tử kháng thể hoàn chỉnh” bao gồm hai chuỗi nặng (HC) và hai chuỗi nhẹ (LC) được kết nối với nhau bằng liên kết disulfua cũng như các dạng đa phân của nó (ví dụ IgM). Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nặng (bao gồm các miền CH1, CH2 và CH3). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL). Các vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng xác định bổ trợ (CDR), được đặt rải rác với các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn đoạn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4.

“Các vùng xác định bổ trợ (CDR)” là “các điểm gắn kháng nguyên” trong kháng thể. Các CDR có thể được định nghĩa bằng cách sử dụng các thuật ngữ khác nhau: (i) Các vùng xác định bổ sung (CDR), ba trong VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) và ba trong VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) dựa trên sự biến đổi trình tự (Wu và Kabat, J Exp Med (Tạp chí y học thực nghiệm) 132:211-50, 1970; Kabat và cộng sự, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Trình tự protein có lợi ích miễn dịch), Tái bản lần 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) “Các vùng siêu biến”, “HVR”, hoặc “HV”, ba trong VH (H1, H2, H3) và ba trong VL (L1, L2, L3) chỉ các vùng của các miền biến đổi của kháng thể siêu biến trong cấu trúc như Chothia và Lesk đã định nghĩa (Chothia và Lesk, Mol Biol (Sinh học phân tử) 196:901-17, 1987). Cơ sở dữ liệu International ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) cung cấp cách đánh số chuẩn hóa và định nghĩa các điểm gắn kháng nguyên. Sự tương ứng giữa các mô tả về CDR, HV và IMGT được trình bày trong Lefranc và cộng sự, Dev Comparat Immunol (Tạp chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm) 27:55-77, 2003. Các thuật ngữ “CDR”, “HCDR1”, “HCDR2”, “HCDR3”, “LCDR1”, “LCDR2” và “LCDR3” bao gồm các CDR được định

nghĩa theo phương pháp bất kỳ được mô tả *supra* (trên đây), Kabat, Chothia hoặc IMGT, trừ khi được thông báo khác trong bản mô tả.

Các globulin miễn dịch có thể được phân thành 5 isotyp chính, là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, tùy vào trình tự axit amin của miền hằng định chuỗi nặng. IgA và IgG được phân tiếp thành các isotyp IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ và IgG₄. Chuỗi nhẹ của kháng thể từ loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được phân thành một trong hai loại có sự khác biệt rõ ràng, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của các miền hằng định của chúng.

Thuật ngữ “mảnh kháng thể” hoặc “phần gắn kháng nguyên của kháng thể” chỉ một phần của phân tử globulin miễn dịch giữ lại điểm gắn kháng nguyên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, như vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR) 1, 2, và 3, vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR) 1, 2, và 3, và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, F(ab')₂, Fd và Fv được biết đến nhiều cũng như các kháng thể miền (dAb) bao gồm một miền VH. Các miền VH và VL có thể được liên kết với nhau qua cầu nối tổng hợp để tạo các loại cấu hình kháng thể đơn chuỗi khác nhau trong đó các miền VH/VL ghép cặp trong phân tử, hoặc giữa các phân tử trong các trường hợp khi các miền VH và VL được biểu hiện bằng các cấu trúc kháng thể đơn chuỗi riêng biệt, để tạo điểm gắn kháng nguyên đơn trị, như Fv đơn chuỗi (scFv) hoặc diabody; được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1998/44001, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1988/01649; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1994/13804; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1992/01047.

“Kháng thể đơn dòng” chỉ nhóm các kháng thể có thành phần axit amin đơn trong mỗi chuỗi nặng và mỗi chuỗi nhẹ, ngoại trừ các biến đổi phổ biến có thể xảy ra như loại bỏ lysin đầu C ra khỏi chuỗi nặng kháng thể. Các kháng thể đơn dòng thường liên kết với một epitope kháng nguyên, trừ các kháng thể đơn dòng đặc hiệu đôi liên kết với hai epitope kháng nguyên khác nhau. Kháng thể đơn dòng có thể có glycosyl hóa không đồng nhất trong nhóm kháng thể. Kháng thể đơn dòng có thể mang tính đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, hoặc đơn trị, lưỡng trị hoặc đa trị. Thuật ngữ kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi.

“Kháng thể phân lập” chỉ kháng thể hoặc mảnh kháng thể về cơ bản được tách ra khỏi các kháng thể khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể

phân lập liên kết đặc hiệu với CD154 về căn bản được tách khỏi các kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác ngoài CD154. “Kháng thể phân lập” bao gồm các kháng thể được phân lập thành độ tinh khiết cao hơn, như các kháng thể có độ tinh khiết 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

“Các gốc Chothia” là các gốc VL và VH của kháng thể được đánh số theo Al-Lazikani (Al-Lazikani và cộng sự, J Mol Biol (Tạp chí Sinh học phân tử) 273:927-48, 1997).

“Các kháng thể nhân hóa” chỉ các kháng thể trong đó vị trí liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các loài không phải là người và các khung của vùng biến đổi có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch người. Kháng thể nhân hóa có thể bao gồm các thay thế trong các vùng khung cho nên khung có thể không phải là bản sao chính xác của các trình tự globulin miễn dịch người hoặc trình tự gen dòng mầm (germline) được biểu hiện.

“Kháng thể người” chỉ các kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó cả khung và điểm gắn kháng nguyên đều có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc là người. Nếu kháng thể chứa vùng hằng định hoặc một phần của vùng hằng định, vùng hằng định cũng có nguồn gốc từ các trình tự có nguồn gốc là người.

Kháng thể người bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là các trình tự "có nguồn gốc" là người nếu các vùng biến đổi của kháng thể được thu từ hệ thống sử dụng globulin miễn dịch dòng mầm của người hoặc các gen globulin miễn dịch được tái cấu trúc. Các hệ thống ví dụ này là các thư viện gen globulin miễn dịch người biểu hiện trên thực khuẩn, và các động vật biến đổi gen không phải là người như chuột hoặc chuột nhắt mang lôcut globulin miễn dịch người như được mô tả trong tài liệu này. “Kháng thể người” có thể có các khác biệt về axit amin khi so sánh với các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người hoặc các trình tự globulin miễn dịch được tái cấu trúc, ví dụ, do các đột biến soma xảy ra tự nhiên hoặc do đưa các thay thế vào khung hoặc điểm gắn kháng nguyên, hoặc cả hai, một cách có chủ ý. Thông thường, “kháng thể người” có % trình tự axit amin đồng nhất ít nhất ở mức khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được mã hóa bởi dòng mầm người hoặc gen globulin miễn dịch được tái cấu trúc. Trong một số trường hợp, “kháng thể người”

có thể bao gồm các trình tự khung liên ứng có nguồn gốc từ các phân tích trình tự khung của người, ví dụ như được mô tả trong Knappik và cộng sự, J Mol Biol (Tạp chí Sinh học phân tử) 296:57-86, 2000, hoặc HCDR3 tổng hợp được hợp nhất vào thư viện gen globulin miễn dịch người biểu hiện trên thực khuẩn, ví dụ như được mô tả trong Shi và cộng sự, J Mol Biol (Tạp chí Sinh học phân tử) 397:385-96, 2010 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009/085462.

Các kháng thể nhân hóa phân lập là kháng thể tổng hợp. Các kháng thể người, mặc dù có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch người, có thể được tạo bằng cách sử dụng các hệ thống như các khung tổng hợp và/hoặc CDR tổng hợp hợp nhất vào bề mặt biểu hiện của thực khuẩn (phage display), hoặc có thể được gây đột biến *trong ống nghiệm* để tăng cường các đặc tính của kháng thể, dẫn đến sản sinh các kháng thể không được biểu hiện trong tập hợp toàn bộ các loại dòng mầm của kháng thể người *trong cơ thể sống*.

Các kháng thể trong đó các điểm gắn kháng nguyên có nguồn gốc từ các loài không phải là người không bao gồm trong định nghĩa về “kháng thể người”.

“Tái tổ hợp” bao gồm các kháng thể và các protein khác, được điều chế, biểu hiện, tạo hoặc phân lập bằng phương tiện tái tổ hợp

Thuật ngữ “epitope” trong bản mô tả này chỉ phần kháng nguyên mà kháng thể liên kết đặc hiệu với nó. Các epitope thường bao gồm các nhóm có bề mặt hoạt tính hóa học (như phân cực, không phân cực hoặc kỵ nước) của các gốc như axit amin hoặc các mạch bên polysacarit và có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc điểm điện tích đặc hiệu. Epitope có thể được cấu tạo từ các axit amin liên kề và/hoặc không liên kề tạo thành đơn vị cấu hình không gian. Đối với epitope không liên kề, axit amin từ các phần khác nhau của trình tự tuyến tính của kháng nguyên sẽ tiến tới gần nhau trong không gian 3 chiều bằng cách gập phân tử protein.

Thuật ngữ “paratope” chỉ phần kháng thể mà kháng nguyên liên kết đặc hiệu với nó. Paratope có thể dài và hẹp trong tự nhiên hoặc có thể không liên tục, được tạo theo mối quan hệ không gian giữa các axit amin không liên kề của kháng thể chứ không phải chuỗi tuyến tính của các axit amin. “Paratope chuỗi nhẹ” và “paratope chuỗi nặng” hoặc “các gốc axit amin của paratope chuỗi nhẹ” và “các gốc axit amin của paratope chuỗi nặng” lần lượt chỉ các gốc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể tiếp xúc với kháng nguyên, hoặc nói

chung, “các gốc paratope kháng thể” chỉ các axit amin của kháng thể tiếp xúc với kháng nguyên.

“Đặc hiệu đôi” (“bispecific”) chỉ kháng thể liên kết đặc hiệu với hai kháng nguyên khác nhau hoặc hai epitope khác nhau trong cùng một kháng nguyên. Kháng thể đặc hiệu đôi có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác hoặc có thể liên kết với một epitope được dùng chung giữa hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau.

“Đa đặc hiệu” (“multispecific”) chỉ kháng thể liên kết đặc hiệu với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau hoặc ít nhất hai epitope khác nhau trong cùng một kháng nguyên. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể liên kết với, ví dụ, hai, ba, bốn hoặc năm kháng nguyên khác nhau hoặc epitope khác nhau trong cùng một kháng nguyên.

“Kết hợp với” có nghĩa rằng cho đối tượng như người sử dụng các dược phẩm hoặc thuốc điều trị trong một hỗn hợp, đồng thời theo từng chất hoặc lần lượt theo từng chất theo thứ tự bất kỳ.

“Hoạt tính sinh học của CD154” chỉ hoạt tính bất kỳ xuất hiện do CD154 liên kết với thụ thể CD40 của nó. Hoạt tính sinh học của CD154 có thể là, ví dụ, hoạt hóa các tế bào B CD40⁺ hoặc tế bào tua (DC) qua trung gian CD154, hoặc hoạt hóa hạ nguồn các đường phát tín hiệu CD40. Có thể đo hoạt tính sinh học của CD154 bằng các phương pháp đã biết và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, như đo sự tăng sinh tế bào B hoặc hoạt hóa tế bào B qua trung gian CD154 bằng cách đánh giá sự tăng biểu hiện ICAM-1 hoặc tăng sản lượng cytokin bởi tế bào B, đo sự hoạt hóa DC qua trung gian CD154 bằng cách đánh giá biểu hiện bề mặt tăng của CD80 và/hoặc CD86 hoặc sự tiết cytokin bởi các tế bào DC, hoặc sự hoạt hóa đường phát tín hiệu CD40 được đánh giá bằng các xét nghiệm gen chỉ thị như đo sự tiết phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) bởi các tế bào biểu hiện SEAP dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động có thể cảm ứng NF- κ B.

“Vectơ” có nghĩa là polynucleotit có khả năng sao chép bên trong hệ sinh học hoặc có thể được di chuyển giữa các hệ này. Các polynucleotit vectơ thông thường chứa các phần tử, như các gốc sao chép, tín hiệu polyadenyl hóa hoặc dấu ấn chọn lọc, có chức năng hỗ trợ sao chép hoặc duy trì các polynucleotit này trong hệ sinh học. Các ví dụ về các hệ sinh học có thể bao gồm tế bào, virus, động vật, thực vật, và hệ sinh học tái tạo sử dụng các thành phần sinh học có khả năng sao chép vectơ. Polynucleotit chứa vectơ có thể là các phân tử ADN hoặc ARN hoặc lai giữa chúng.

“Vector biểu hiện” có nghĩa là vector có thể được sử dụng trong hệ sinh học hoặc hệ sinh học tái tạo để định hướng dịch mã polypeptit mã hóa bởi trình tự polynucleotit có mặt trong vector biểu hiện.

“Polynucleotit” có nghĩa là phân tử bao gồm chuỗi nucleotit liên kết cộng hóa trị bởi bộ khung đường-phosphat hoặc hóa học cộng hóa trị tương đương khác. ADN và ARN sợi đơn và sợi kép là các ví dụ điển hình của polynucleotit.

“Polypeptit” hoặc “protein” có nghĩa là phân tử bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit để tạo thành polypeptit. Các polypeptit nhỏ có ít hơn 50 axit amin có thể được gọi là “peptit”.

Trong tài liệu này, các mã axit amin một và ba chữ cái truyền thống được sử dụng như trong Bảng 1.

Bảng 1.

Axit amin	Mã ba chữ cái	Mã một chữ cái
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Xystein	Cys	C
Glutamat	Gln	E
Glutamin	Glu	Q
Glyxin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuxin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Metionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Thành phần của chất

Sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 bằng ái lực cao và trung hòa hiệu quả hoạt tính sinh học của CD154. Sáng chế dựa trên, ít nhất một phần, sự nhận biết ngược lại với quan niệm hiện nay là sự liên kết của các kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154 với FcγRIIa tại các tiểu cầu đã gây ra sự hoạt hóa và kết tụ tiểu cầu và dẫn tới huyết khối thuyên tắc, đó là sự hoạt hóa tiểu cầu cũng dựa trên epitope CD154 mà các kháng thể liên kết với nó. Bản mô tả này cũng trình bày sự phát hiện là các kháng thể theo sáng chế liên kết với epitope nhất định tại CD154 có khả năng gắn kết với FcγRIIa không làm trung gian tạo nên hoạt hóa tiểu cầu. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế tùy chọn được kiến tạo Fc để ngăn chặn sự hoạt hóa các chức năng kích thích miễn dịch bổ sung không mong muốn. Do đó, các kháng thể theo sáng chế có thể có các mức an toàn tốt hơn trong điều kiện lâm sàng so với các kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154 hiện tại.

CD154 là đích trong các bệnh tự miễn, thải ghép và các bệnh liên quan đến miễn dịch khác ở chuột, linh trưởng không phải là người (NHP) và người. Trong một số thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II, các kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154 đã cho thấy khả năng ức chế hiệu quả các hoạt tính của CD154 *trong cơ thể sống* và làm giảm nhẹ bệnh. Các chất đối kháng CD154 khác với tất cả các thuốc điều trị khác về tác động đối với đáp ứng miễn dịch; chúng là thuốc điều trị duy nhất có thể cảm ứng sự dung nạp miễn dịch chức năng, như đã được minh chứng trong cả chuột và khỉ. Ở chuột, hầu như tất cả các mẫu mang bệnh tự miễn đều có thể được giảm nhẹ một cách hiệu quả tình trạng bệnh bằng chất đối kháng CD154 (Noelle và cộng sự, Ann N Y Acad Sci (Biên niên sử Viện hàn lâm khoa học New York) 815: 384-391, 1997; Mackey và cộng sự, J Leukoc Biol (Tạp chí Sinh học bạch cầu) 63: 418-428, 1998; Noelle, Agents Actions Suppl (Các chất và thành phần bổ sung) 49: 17-22, 1998; Quezada và cộng sự, Annu Rev Immunol (Tạp chí miễn dịch học niên san) 22: 307-328, 2004), và có thời gian thuyên giảm lâu dài.

Sáng chế đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phân gán kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phân gán kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154, trong đó CD154 là homotrimer và kháng thể liên kết với monome CD154 thứ nhất trong homotrimer trong các gốc axit

amin 182-207 của CD154 và monome CD154 thứ hai trong homotrimer trong các gốc axit amin 176-253 của CD154, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.

Kháng thể ví dụ là kháng thể C4LB89. Do các vùng biến đổi của kháng thể C4LB235 và C4LB236 khác nhau một gốc axit amin trong LCDR2 so với các vùng của C4LB89, và do C4LB231 và C4LB232 có các trình tự VH/VL đồng nhất với C4LB89, dự kiến là các kháng thể này cũng liên kết với cùng epitope CD154 như C4LB89. Các kháng thể liên kết với CD154 trong các gốc 182-207 và 176-253 không có khả năng hoạt hóa tiểu cầu ngay cả khi có khả năng gắn kết với FcγR, bao gồm FcγRIIa. Do đó, các kháng thể này có thể có mức an toàn được cải thiện so với các kháng thể đối kháng liên kết với CD154 khác.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đối kháng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 người có SEQ ID NO: 1, bao gồm vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), và HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), trong đó tùy chọn

Gốc S1 của HCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T hoặc V;

Gốc I4 của HCDR1 được đột biến thành M, L hoặc V;

Gốc S5 của HCDR1 được đột biến thành A;

Gốc S3 của HCDR2 được đột biến thành A, T hoặc V;

Gốc P4 của HCDR2 được đột biến thành V, T, L Q hoặc E;

Gốc N8 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

Gốc T9 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

Gốc N10 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

Gốc S1 của HCDR3 được đột biến thành A hoặc M;

Gốc R2 của HCDR3 được đột biến thành A, S, Q hoặc K; và

Gốc L7 của HCDR3 được đột biến thành M.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng xác định hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) và LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), trong đó tùy chọn

gốc Q4 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W hoặc Y;

gốc S5 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

gốc S7 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

gốc S8 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

gốc A2 của LCDR2 được đột biến thành S;

gốc N3 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

gốc S4 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

gốc L5 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

gốc Q6 của LCDR2 được đột biến thành E, D hoặc N;

gốc S7 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

gốc S3 của LCDR3 được đột biến thành A;

gốc D4 của LCDR3 được đột biến thành N;

gốc S5 của LCDR3 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y; và

gốc I6 của LCDR3 được đột biến thành A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T hoặc V.

Cấu trúc tinh thể của phức hợp của kháng thể C4LB89 và CD154 cho thấy kháng thể liên kết với CD154 chỉ bằng các gốc của VH. Các phân tích thêm còn cho thấy một số thay thế nhất định được trình bày trong Bảng 19 và Bảng 20 tương tự như được trình bày ở phần trên, trong các CDR của kháng thể, được dự kiến là không tác động đến cấu trúc tổng thể của phức hợp và các đặc trưng của kháng thể.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng xác định hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1, LCDR2 và LCDR3 có

các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51;

các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52;

các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53;

các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54;

các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55;

các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56;

các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57;

các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52; hoặc

các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 44 và 52.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 49 và 52.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 50 và 52.

Trong một số phương án, phức hợp miễn dịch của kháng thể theo sáng chế và CD154 (shCD154) người dạng tan không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện bề mặt P-selectin trên tiểu cầu.

Hoạt hóa tiểu cầu là quy trình chuyển hóa tiểu cầu không bám dính và nhân thành hạt bám dính có gai giải phóng và biểu hiện các chất có hoạt tính sinh học và có khả năng liên kết với fibrinogen (tơ huyết) protein huyết tương. Sự hoạt hóa cũng có thể xảy ra do các yếu tố kích thích vật lý từ ứng suất cắt chất lưu cao, như ở tại vị trí động mạch quan trọng bị thu hẹp (Quinn và cộng sự, 2005, Platelet Function: assessment, diagnosis, and treatment (Chức năng tiểu cầu: đánh giá, chẩn đoán và điều trị, Humana Press, tr. 3-20). Hoạt hóa tiểu cầu dẫn đến hoạt hóa các đường phát tín hiệu giữa các tế bào, làm tăng biểu

hiện P-selectin trên bề mặt tiểu cầu và tăng ái lực liên kết của fibrinogen với các thụ thể integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Do đó, có thể đo lường sự hoạt hóa tiểu cầu bằng cách đo biểu hiện được gia tăng trên bề mặt của P-selectin hoặc liên kết của phối tử trên đoạn dò, ví dụ PAC-1, với integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ trên các tiểu cầu, sử dụng phương pháp đếm và đo tế bào theo dòng (flow cytometry). Các kháng thể theo sáng chế không làm hoạt hóa các tiểu cầu người trong đó kháng thể trong phức hợp với shCD154 không làm tăng biểu hiện P-selectin trên bề mặt hoặc làm tăng liên kết của phối tử trên đoạn dò (ví dụ PAC-1) với integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ một cách đáng kể theo thống kê so với biểu hiện P-selectin trên bề mặt và sự tăng liên kết của phối tử trên đoạn dò (ví dụ PAC-1) với integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ do shCD154 cảm ứng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế có ít nhất một trong những đặc tính sau:

liên kết với CD154 bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 ở 25°C trong dung dịch nước muối đệm phosphat theo Dulbecco chứa polysorbat P20 0,03% và albumin huyết thanh bò có nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$;

ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc

ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κB trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với CD154 bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 5×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 5×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154 phản ứng chéo với CD154 khi *Macaca fascicularis* (khỉ đuôi dài) CD154 hoặc CD154 khi *Callithrix jacchus* (khỉ đuôi sóc).

Ái lực của kháng thể đối với CD154 người, khỉ đuôi dài hoặc khỉ đuôi sóc có thể được xác định qua thực nghiệm, bằng phương pháp phù hợp bất kỳ. Các phương pháp này có thể sử dụng các thiết bị đo ProteOn XPR36, Biacore 3000 hay KinExA, ELISA hoặc các xét nghiệm liên kết tương tự được những người có trình độ trong lĩnh vực biết tới. Ái lực

đo được của kháng thể cụ thể với CD154 có thể khác nhau nếu đo trong các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ mol, độ pH). Do đó, các số đo ái lực và các thông số liên kết khác (ví dụ K_D , K_{on} , K_{off}) thường là được đo trong các điều kiện tiêu chuẩn và dung dịch đệm tiêu chuẩn, như dung dịch đệm được mô tả trong tài liệu này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ chấp nhận sai số nội tại đối với các số đo ái lực, ví dụ, sử dụng Biacore 3000 hoặc ProteOn (được đo theo độ lệch tiêu chuẩn, SD), thông thường có thể nằm trong khoảng 5-33% đối với các số đo nằm trong giới hạn phát hiện thông thường. Do đó, thuật ngữ "khoảng" phản ánh mức chênh lệch tiêu chuẩn thông thường trong xét nghiệm. Ví dụ, SD thông thường đối với K_D bằng 1×10^{-9} M lên tới $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ M.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong thí nghiệm về sự tăng sinh tế bào B, 1×10^5 tế bào B amidan người được nuôi cấy với IL-21 người tái tổ hợp nồng độ 100 ng/ml, CD154 người dạng tan tái tổ hợp tam phân nồng độ 0,5 μ g/ml được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp leuxin zipper và kháng thể kháng CD154 với nồng độ trong khoảng 0,000064-25 μ g/ml trong thể tích cuối là 200 μ l/lỗ. Sau 2 ngày ủ, methyl (-3H)-thymidin (0,5 μ Ci/lỗ) có thể được thêm vào dung dịch nuôi cấy và có thể xác định được tác động của các kháng thể lên sự tăng sinh tế bào B người sau khi ủ qua đêm.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) cảm ứng bởi CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) cảm ứng bởi CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu IFN- β có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng từ $2,1 \times 10^{-8}$ M đến $5,4 \times 10^{-10}$ M.

Các tế bào có thể được sử dụng là, ví dụ, các tế bào CD40L HEK-Blue™ (InvivoGen, San Diego, CA). CD154 người có thể được cung cấp dưới dạng protein dung hợp leuxin zipper CD154 người hòa tan tam phân. Có thể phát hiện tín hiệu từ phosphatase kiềm được tiết và tính IC_{50} cho sự ức chế bằng các phương pháp đã biết.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết đồng thời với monome CD154 thứ nhất và monome CD154 thứ hai trong homotrimer CD154.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám gốc CD154 trong monome CD154 thứ nhất trong các gốc axit amin 182-207 của CD154 có SEQ ID NO: 1.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám gốc CD154 trong monome CD154 thứ hai trong các gốc axit amin 176-253 của CD154 có SEQ ID NO: 1.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với các gốc E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 và R207 trong monome CD154 thứ nhất, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với các gốc T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 và F253 trong monome CD154 thứ hai, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.

“Nằm trong khoảng” có nghĩa là kháng thể chỉ liên kết với các gốc nằm trong các đoạn các axit amin 182-207, 176-354 hoặc 182-207 và 176-354.

Kháng thể ví dụ là kháng thể C4LB89. Do các vùng biến đổi của kháng thể C4LB235 và C4LB236 khác nhau một gốc axit amin trong LCDR2 so với các vùng của C4LB89, và do C4LB231 và C4LB232 có các trình tự VH/VL đồng nhất với C4LB89, dự kiến là các kháng thể này cũng liên kết với cùng epitope CD154 như C4LB89.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với CD154 người bằng các gốc paratope nằm trong VH của kháng thể.

“Gốc paratope” là gốc trong VH hoặc VL kháng thể nằm trong 4 Å từ các gốc CD154. Các gốc paratope có thể được nhận dạng từ cấu trúc tinh thể của phức hợp của kháng thể với CD154.

Ví dụ về kháng thể liên kết với CD154 chỉ bằng các gốc paratope VH không có VL tiếp xúc với kháng nguyên là kháng thể bao gồm VH và VL của kháng thể C4LB89. Do các vùng biến đổi của C4LB235 và C4LB236 khác nhau một gốc axit amin trong LCDR2 so với các vùng của C4LB89, và do C4LB231 và C4LB232 có các trình tự VH/VL đồng nhất với C4LB89, dự kiến là các kháng thể này chỉ liên kết với CD154 bằng các gốc VH. Các kháng thể liên kết với CD154 trong các gốc 182-207 hoặc 176-354 có SEQ ID NO: 1 hoặc các gốc E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 và R207 trong monome CD154 thứ nhất và các gốc T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 và

F253 trong monome CD154 thứ hai trong homotrimer CD154 không có khả năng hoạt hóa tiểu cầu ngay cả khi có khả năng gắn kết với Fc γ R, bao gồm Fc γ RIIa. Do đó, các kháng thể này có thể có mức an toàn được cải thiện so với các kháng thể liên kết với CD154 khác.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 59, tùy chọn VH bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 59.

Kháng thể bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, và 30, hoặc có các HCDR có SEQ ID NO: 59 hoặc VH có SEQ ID NO: 59 liên kết với CD154 chỉ bằng VH của kháng thể. Do đó, VH có SEQ ID NO: 59 hoặc VH bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, có thể được kết hợp với trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bất kỳ và sự liên kết của kháng thể tạo thành với CD154 có thể được thử nghiệm bằng các thí nghiệm được mô tả trong bản mô tả này để tạo kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154.

Ví dụ, VH bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, và 30, hoặc VH có SEQ ID NO: 59 có thể được sử dụng để sàng lọc các miền VL có khả năng tạo mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu hai miền có khả năng liên kết với CD154. Có thể thực hiện được sàng lọc bằng phương pháp sàng lọc với kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn, sử dụng, ví dụ, phương pháp tiếp cận tổ hợp đối ngẫu phân cấp công bố trong Bằng sáng chế PCT Số công bố WO1992/01047. Trong cách tiếp cận này, từng cụm dòng tế bào chứa dòng chuỗi H hoặc L, ví dụ VH có SEQ ID NO: 59, được sử dụng để tác động đến thư viện dòng tế bào hoàn chỉnh mã hóa chuỗi kia (L hoặc H) và miền gắn kháng nguyên đặc hiệu hai chuỗi tạo thành sẽ được chọn theo kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn (phage display) như được mô tả trong bản mô tả này và được thử nghiệm về sự liên kết của nó và hoạt tính đối kháng đối với CD154.

Hoặc, VH có SEQ ID NO: 59 hoặc VH bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, có thể được kết hợp với các miền VL của các kháng thể CD154 hiện tại hoặc các kháng thể CD154 được mô tả trong bản mô tả này, và

kháng thể tạo thành được thử nghiệm về sự liên kết của nó và hoạt tính đối kháng đối với CD154.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73, tùy chọn VL bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có các SEQ ID NO: 66, 72 hoặc 73, tùy chọn VL bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc, trong đó kháng thể không làm hoạt hóa tiểu cầu người.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế đã làm giảm liên kết với FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa hoặc FcγRIIIb.

“Giảm liên kết” chỉ việc giảm liên kết của các kháng thể theo sáng chế có ít nhất một thay thế trong vùng Fc với thụ thể FcγR so với liên kết của kháng thể mẹ không có sự thay thế với cùng thụ thể FcγR. “Giảm liên kết” có thể là giảm liên kết ít nhất ở mức khoảng 100 lần, ít nhất khoảng 500 lần, ít nhất khoảng 1000 lần, ít nhất khoảng 5000 lần, ít nhất khoảng 10.000 lần, hoặc ít nhất khoảng 20.000 lần. Trong thực tế, các kháng thể biểu hiện “giảm liên kết” với FcγR cụ thể chỉ các kháng thể có chức năng thực thi không đáng kể về mặt thống kê qua trung gian FcγR cụ thể.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế có ít nhất một thay thế trong vùng Fc.

Trong một số phương án, ít nhất một thay thế trong vùng Fc là thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S hoặc P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S hoặc P331S trong vùng Fc, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.

Trong một số phương án, ít nhất một thay thế trong vùng Fc là thay thế V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S hoặc P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S trong vùng Fc, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đối kháng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm chuỗi nặng có SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 81.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đối kháng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm chuỗi nặng có SEQ ID NO: 82 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 81.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đối kháng hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm chuỗi nặng có SEQ ID NO: 83 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 81.

SEQ ID NO: 80 (VH của C4LB89 tại IgG1sigma: HC của C4LB231)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWIS
PIFGNTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSRYYGDL
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 (chuỗi nhẹ của C4LB89 và C4LB231)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYANSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSIPWTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 82 (VH của C4LB89 tại IgG1sigmaYTE)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI
SPIFGNTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSRYYG
LDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV
VDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 83 (VH của C4LB89 tại IgG2sigma)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI
SPIFGNTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSRYYG
LDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHDHKPSNT
KVDKTVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Đặc tính thực thi miễn dịch của kháng thể theo sáng chế có thể được tăng cường hoặc làm bất hoạt bằng cách điều hòa Fc bằng các kỹ thuật được người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực biết. Ví dụ, các chức năng thực thi của Fc như liên kết C1q, độc tính đối với tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), độc tính đối với tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào (phagocytosis), giảm biểu hiện thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), v.v. có thể được cung cấp và/hoặc được điều khiển bằng cách điều hòa các gốc trong Fc chịu trách nhiệm cho các hoạt tính này. Ví dụ, các thay thế tại Fc V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 hoặc V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S (Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO11/066501) hoặc L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S có thể được đưa vào kháng thể theo sáng chế.

Có thể đánh giá sự liên kết của kháng thể theo sáng chế với FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa và FcγRIIIb bằng cách sử dụng dạng tan tái tổ hợp hoặc dạng liên kết với tế bào của các thụ thể Fcγ. Ví dụ, các phép đo liên kết cạnh tranh trực tiếp hoặc gián tiếp có thể được sử dụng để đánh giá các ái lực tương đối và ái lực của kháng thể theo sáng chế với các loại FcγR. Trong thử nghiệm ví dụ, liên kết của kháng thể thử nghiệm với FcγR tan thu được trên đĩa được đánh giá bằng cách sử dụng liên kết cạnh tranh giữa IgG1 người được biotin hóa nồng độ 1 μg/ml và các dung dịch pha loãng tuần tự của kháng thể thử nghiệm được tạo phức hợp trước đó với kháng nguyên.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế đã làm giảm cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) và/hoặc cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

“Gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể”, “gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể” hoặc “ADCC” là cơ chế khiến cho tế bào bị tiêu diệt, phụ thuộc vào sự tương tác của tế bào đích được phủ kháng thể với tế bào thực thi có hoạt tính làm ly giải, như tế bào sát thủ tự nhiên, bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và bạch cầu trung tính qua thụ thể gamma Fc (FcγR) được biểu hiện trên tế bào thực thi. Ví dụ, các tế bào NK biểu hiện FcγRIIIa, trong khi bạch cầu đơn nhân biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIIIa. Để đánh giá hoạt tính ADCC của các kháng thể theo sáng chế, kháng thể có thể được thêm vào các tế bào đích kết hợp với các tế bào thực thi miễn dịch, các tế bào này có thể được hoạt hóa bằng các phức kháng thể kháng nguyên dẫn tới sự ly giải tế bào đích. Sự ly giải tế bào thường được phát hiện qua việc giải phóng nhân (ví dụ, cơ chất phóng xạ, thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc protein trong tế bào tự nhiên) từ các tế bào bị ly giải. Ví dụ về tế bào thực thi

cho các xét nghiệm này bao gồm tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) và tế bào NK. Các ví dụ về tế bào đích bao gồm các tế bào D1.1 Jurkat (ATCC® CRL-10915™) hoặc các tế bào T biểu hiện CD154.

"Sự thực bào phụ thuộc kháng thể" ("ADCP") chỉ cơ chế loại bỏ tế bào đích phủ kháng thể bằng cách nội thực hóa bằng tế bào thực bào, như đại thực bào hay tế bào tua. ADCP có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các đại thực bào dẫn xuất từ bạch cầu đơn nhân dưới dạng tế bào thực thi và tế bào D1.1 Jurkat biểu hiện CD154 được kiến tạo để biểu hiện GFP hoặc các phân tử được gắn nhãn khác làm tế bào đích. Tỷ lệ tế bào thực thi:tế bào đích có thể là, ví dụ, 4:1. Tế bào thực thi có thể được ủ với tế bào đích trong 4 giờ có hoặc không có kháng thể CD154 thử nghiệm. Sau khi ủ, các tế bào có thể được tách ra bằng cách sử dụng accutase. Các đại thực bào có thể được nhận dạng với việc các kháng thể kháng CD11b và kháng CD14 cùng được gắn với nhãn huỳnh quang, và có thể xác định phần trăm thực bào dựa trên % huỳnh quang GFP trong các đại thực bào CD11⁺CD14⁺ bằng các phương pháp tiêu chuẩn.

"Gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể" hay "CDC", chỉ cơ chế khiến cho tế bào bị tiêu diệt trong đó miễn thực thi Fc của kháng thể liên kết đích liên kết và hoạt hóa thành phần bổ thể C1q, đến lượt mình thành phần này cũng hoạt hóa hệ bổ thể dẫn tới tế bào đích bị tiêu diệt. Sự hoạt hóa bổ thể cũng có thể dẫn đến sự tích tụ các thành phần bổ thể trên bề mặt tế bào đích hỗ trợ cho cơ chế ADCC bằng cách gắn kết các thụ thể bổ thể (ví dụ CR3) lên các bạch cầu. Có thể đo lường CDC của các tế bào biểu hiện CD154, ví dụ, bằng cách cho trực tiếp các tế bào Jurkat vào môi trường phù hợp, thêm các kháng thể kháng CD154 vào hỗn hợp, sau đó thêm huyết thanh người được tổng hợp. Sau thời gian ủ, có thể phát hiện phần trăm (%) các tế bào bị ly giải theo % các tế bào nhuộm propidium iodua trong xét nghiệm FACS sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

"Giảm ADCC", "giảm CDC" và "giảm ADCP" chỉ ADCC, CDC và/hoặc ADCP cảm ứng bởi kháng thể không đáng kể về mặt thống kê trong các xét nghiệm chuẩn đánh giá ADCC, CDC và/hoặc ADCP, như các xét nghiệm được mô tả trong bản mô tả này và các xét nghiệm được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 8,871,204.

Các kháng thể theo sáng chế có mức trung hòa và ái lực mong muốn có thể sẽ được chọn từ thư viện các biến thể hoặc mảnh kháng thể bằng cách sàng lọc bằng

CD154 người hoặc CD154 khi đuôi sóc và tùy chọn có thể sàng lọc theo sự trưởng thành ái lực của kháng thể. Trong một phương án sàng lọc ví dụ, các thư viện thực khuẩn có thể được sàng lọc bằng CD154 khi đuôi sóc. Hoặc, các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo bằng cách tạo miễn dịch chuột bằng CD154 người hoặc CD154 khi đuôi sóc hoặc cả hai, và sàng lọc các tế bào lai về liên kết với CD154 người, và sau đó đánh giá các đặc tính đối kháng của các kháng thể bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế cạnh tranh để liên kết với CD154 với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.

Sự cạnh tranh giữa liên kết đặc hiệu với CD154 với các kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự VH và VL nhất định có thể được xét nghiệm *trong ống nghiệm* sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, liên kết của kháng thể gắn nhãn este NHS MSD Sulfo-Tag™ với CD154 với sự có mặt của kháng thể không gắn nhãn có thể được đánh giá bằng phương pháp ELISA, hoặc có thể sử dụng phân tích Bioacore hoặc phương pháp đếm và đo tế bào theo dòng (flow cytometry) để thể hiện sự cạnh tranh với các kháng thể theo sáng chế. Kháng thể cạnh tranh để liên kết với CD154 với kháng thể tham chiếu (ví dụ kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66) trong đó kháng thể ức chế liên kết của kháng thể tham chiếu với CD154 ở mức 80% hoặc hơn, ví dụ, 85% hoặc hơn, 90% hoặc hơn, hoặc 95% hoặc hơn.

Trong một số phương án, VH có SEQ ID NO: 59 có thể kết hợp với VL của kháng thể kháng CD154 bất kỳ được mô tả trong Bảng sáng chế quốc tế các Số công bố WO1993/08207, WO1994/10308, WO1996/40918, WO1993/009812, WO1999/051258, WO1995/006480, WO1995/006481, WO1995/006666, WO2001/002057, WO1997/017446, WO1999/012566, WO2001/068860, WO2005/003175, WO2006/033702, WO2006/030220, WO2008/118356, WO2012/052205, WO2012/138768, WO2012/138768, WO2013/055745 và WO2013/056068 để tạo kháng thể đối kháng kháng CD154. Sự liên kết và hoạt tính đối kháng của các kháng thể tạo thành có thể được thử nghiệm bằng các xét nghiệm và quy trình được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có

các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29;

các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30;

các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31;

các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32;

các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33;

các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34; hoặc

các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có

các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29;

các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30;

các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31;

các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32;

các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33;

các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34; hoặc

các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có

các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51;

các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52;

các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53;

các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54;

các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55;

các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56;

các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57;

các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52; hoặc

các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51; hoặc VH có SEQ ID NO: 58 và VL có SEQ ID NO: 65.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52; hoặc VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53; hoặc VH có SEQ ID NO: 60 và VL có SEQ ID NO: 67.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54; hoặc VH có SEQ ID NO: 61 và VL có SEQ ID NO: 68.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55; hoặc VH có SEQ ID NO: 62 và VL có SEQ ID NO: 69.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56; hoặc VH có SEQ ID NO: 63 và VL có SEQ ID NO: 70.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57; hoặc VH có SEQ ID NO: 64 và VL có SEQ ID NO: 71.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52; hoặc VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52; hoặc VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH và VL trong đó VH bao gồm trình tự axit amin có các SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH và VL trong đó VL bao gồm trình tự axit amin có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có các SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, và VL có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của VH có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73, và các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của VL có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73, trong đó các CDR được định nghĩa theo Kabat, Chothia và/hoặc IMGT.

Các biến thể của kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin của VH hoặc VL được trình bày trong Bảng 8, Bảng 9 và Bảng 14 đều thuộc phạm vi của sáng chế. Ví dụ, các biến thể có thể bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin trong VH và/hoặc VL mà không gây hại đến các đặc tính của kháng thể. Trong một số phương án, sự đồng nhất trình tự có thể bằng khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin của VH hoặc VL theo sáng chế.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí đồng nhất của các trình tự (tức là % đồng nhất = số lượng vị trí đồng nhất/tổng số các vị trí x 100), có tính đến số khoảng trống và chiều dài của mỗi khoảng trống, các khoảng trống cần được đưa vào để có sự bắt cặp tối ưu giữa hai trình tự.

Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* (Ứng dụng điện toán vào khoa học sinh học), 4:11-17 (1988), được hợp nhất vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), sử dụng bảng trọng số gốc PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống bằng 12 và điểm phạt khoảng trống bằng 4. Ngoài ra, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (*J. Mol. Biol.* (Sinh học phân tử và tế bào). 48:444-453 (1970)) đã được hợp nhất vào chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có tại http://_www_gcg_com), sử dụng ma trận Blossum 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng số khoảng trống 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng số chiều dài 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, trong đó kháng thể biểu hiện một hoặc nhiều đặc tính trong các đặc tính sau:

phức hợp miễn dịch của kháng thể và shCD154 không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện trên bề mặt của P-selectin trên tiểu cầu;

liên kết với CD154 bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 sử dụng thiết kế thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, các phép đo ái lực;

ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc

ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73, trong đó kháng thể biểu hiện một hoặc nhiều đặc tính trong các đặc tính sau:

phức hợp miễn dịch của kháng thể và shCD154 không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện trên bề mặt của P-selectin trên tiểu cầu;

liên kết với CD154 bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 sử dụng thiết kế thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, các phép đo ái lực;

ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc

ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64 và VL đồng nhất ít nhất 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73, trong đó kháng thể biểu hiện một hoặc nhiều đặc tính trong các đặc tính sau:

phức hợp miễn dịch của kháng thể và shCD154 không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện trên bề mặt của P-selectin trên tiểu cầu;

liên kết với CD154 bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 sử dụng thiết kế thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, các phép đo ái lực;

ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc

ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 58.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 59.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 60.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 61.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 62.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 63.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 64.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 65.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 66.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 67.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 68.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 69.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 70.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 71.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 72.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 73.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 58 và VL có SEQ ID NO: 65, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 60 và VL có SEQ ID NO: 67, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 61 và VL có SEQ ID NO: 68, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 62 và VL có SEQ ID NO: 69, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 63 và VL có SEQ ID NO: 70, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 64 và VL có SEQ ID NO: 71, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm

một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, như được trình bày trong Bảng 8, Bảng 9 và Bảng 14, hoặc các điều hòa bảo thủ của chúng, và trong đó các kháng thể giữ lại các đặc tính chức năng mong muốn của các kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52, và các điều hòa bảo thủ của chúng.

Kháng thể theo sáng chế bao gồm một số trình tự HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 và các điều hòa bảo thủ của chúng

thể hiện một hoặc nhiều đặc tính trong các đặc tính sau đây:

phức hợp miễn dịch của kháng thể và shCD154 không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện trên bề mặt của P-selectin trên tiểu cầu;

liên kết với CD154 bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 sử dụng thiết kế thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, các phép đo ái lực;

ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc

ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

“Điều hòa bảo thủ” chỉ các biến đổi axit amin không ảnh hưởng hoặc làm thay đổi đáng kể các đặc trưng liên kết của kháng thể chứa trình tự axit amin. Điều hòa bảo thủ bao gồm các thay thế, bổ sung hoặc làm mất axit amin. Thay thế bảo thủ là những thay thế trong đó axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có mạch bên tương tự. Các họ gốc axit amin có mạch bên tương tự được xác định rõ và bao gồm các axit amin có mạch bên mang tính axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), mạch bên có tính bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin), mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, tyrosin, tryptophan), mạch bên thiom (ví dụ, phenylalanin, tryptophan, histidin, tyrosin), mạch bên béo (ví dụ, glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, serin, threonin), amit (ví dụ, asparagin, glutamin), mạch bên nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và mạch bên chứa lưu huỳnh (xystein, methionin). Ngoài ra, gốc tự nhiên bất kỳ trong polypeptit có thể được thay thế bằng alanin, như đã từng được mô tả về gây đột biến quét alanin (MacLennan và cộng sự, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67, 1998; Sasaki và cộng sự (1998) *Adv. Biophys.* (Tiến bộ trong vật lý sinh học) 35:1-24, 1998). Có thể thực hiện thay thế axit amin cho các kháng thể theo sáng chế bằng các phương pháp đã biết, ví dụ, bằng phương pháp gây đột biến PCR (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 4,683,195). Hoặc, có thể tạo các thư viện biến thể bằng các phương pháp đã biết, ví dụ bằng cách sử dụng các codon ngẫu nhiên (NNK) hoặc codon không ngẫu nhiên, ví dụ codon DVK, codon này mã hóa 11 axit amin (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Các biến thể kháng thể tạo thành có thể được thử nghiệm các đặc điểm của chúng bằng các xét nghiệm được mô tả trong tài liệu này.

Mặc dù các phương án minh họa trong các Ví dụ sáng chế bao gồm các cặp vùng biến đổi, một từ chuỗi nặng và một từ chuỗi nhẹ, người có trình độ trong ngành sẽ nhận thấy các phương án thay thế có thể bao gồm chỉ riêng vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi đơn có thể được sử dụng để sàng lọc các miền biến đổi có khả năng tạo thành mảnh kháng thể gắn kháng nguyên đặc hiệu hai miền có khả năng, ví dụ, liên kết đặc hiệu với CD154. Có thể thực hiện được sàng lọc bằng phương pháp sàng lọc với kỹ thuật biểu hiện trên thực khuẩn, sử dụng, ví dụ, phương pháp tiếp cận tổ hợp đối ngẫu phân cấp công bố trong Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO1992/01047 như được mô tả trong bản mô tả này.

Có thể tạo các kháng thể theo sáng chế bằng các kỹ thuật khác nhau. Ví dụ, có thể sử dụng phương pháp tế bào lai của Kohler và Milstein, *Nature (Tự nhiên)* 256:495, 1975 để tạo các kháng thể đơn dòng. Trong phương pháp tế bào lai, chuột nhắt hoặc động vật chủ khác, như chuột hamster, chuột hoặc khỉ, được tạo miễn dịch bằng CD154 của người, khỉ đuôi sóc hoặc khỉ hoặc các mảnh của CD154, như dạng tan của CD154, sau đó là dung hợp các tế bào lá lách từ các động vật được tạo miễn dịch bằng các tế bào u tủy, sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn để hình thành các tế bào lai (Gooding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Kháng thể đơn dòng: Nguyên lý và thực hành), tr.59-103 (Academic Press, 1986)). Các dòng tế bào vô tính phát sinh từ các tế bào lai bất tử đơn được sàng lọc để tạo ra các kháng thể có các đặc tính mong muốn, như tính đặc hiệu của liên kết, có hoặc không có phản ứng chéo, và ái lực đối với kháng nguyên.

Các động vật chủ khác nhau có thể được sử dụng để tạo các kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, có thể sử dụng chuột Balb/c để tạo các kháng thể. Kháng thể tạo từ chuột Balb/c và các động vật không phải là người khác có thể được nhân hóa bằng các công nghệ khác nhau để tạo nhiều trình tự giống người hơn. Các kỹ thuật nhân hóa ví dụ bao gồm việc chọn khung chất nhận của người đã được biết tới và bao gồm kỹ thuật ghép CDR (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 5,225,539), ghép SDR (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 6,818,749), Tái tạo bề mặt (Padlan, *Mol Immunol* (Miễn dịch học phân tử) 28:489-499, 1991), Tái tạo bề mặt bằng các gốc quyết định đặc hiệu (Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 20100261620), thích ứng với con người (hay thích ứng với khung của người) (Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số US2009/0118127), Siêu nhân hóa (Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 7,709, 226) và hướng dẫn chọn lọc (Osbourn và cộng sự (2005), *Methods (Các phương pháp)* 36:61-68, 2005; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 5,565,332). Trong các phương pháp này, các CDR của các kháng thể mẹ được chuyển đến các khung của người mà có thể được chọn dựa trên tính tương đồng tổng thể của chúng đối với các khung mẹ, dựa trên thông tin chiều dài, tính tương đồng hoặc cấu trúc hợp chuẩn của CDR khung, hoặc kết hợp của các thông tin này.

Các kháng thể nhân hóa có thể được tối ưu hóa hơn nữa để cải thiện tính chọn lọc hoặc ái lực đối với kháng nguyên mong muốn bằng cách hợp nhất các gốc đỡ khung thay đổi để bảo toàn ái lực liên kết (đột biến ngược) bằng các kỹ thuật như các kỹ thuật đã công bố trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO90/007861 và trong Bằng sáng

ché quốc tế Số công bố WO92/22653, hoặc bằng cách đưa biến đổi vào CDR bất kỳ để cải thiện, ví dụ, ái lực của kháng thể.

Có thể sử dụng chuột biến đổi gen mang lôcut globulin miễn dịch (Ig) người trong bộ gen của chúng để tạo các kháng thể người kháng lại protein đích, và đã được trình bày trong, ví dụ, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO90/04036, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,150,584, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO99/45962, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO02/066630, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO02/43478, Lonberg và cộng sự, (1994) *Nature (Tự nhiên)* 368:856-9; Green và cộng sự (1994), *Nature Genet. (Di truyền học tự nhiên)* 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) *Exp. Med. (Y học thực nghiệm)* 188:483-95; Lonberg và Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol. (Tập chí miễn dịch học quốc tế)* 13:65-93; Bruggemann và cộng sự (1991) *Eur. J. Immunol. (Tập chí miễn dịch học châu Âu)* 21:1323-1326; Fishwild và cộng sự (1996) *Nat. Biotechnol. (Công nghệ sinh học tự nhiên)* 14:845-851; Mendez và cộng sự (1997) *Nat. Genet. (Di truyền học tự nhiên)* 15:146-156; Green (1999) *J. Immunol. Methods (Tập chí Các phương pháp miễn dịch học)* 231:11-23; Yang và cộng sự (1999) *Cancer Res. (Nghiên cứu ung thư)* 59:1236-1243; Bruggemann và Taussig (1997) *Curr. Opin. Biotechnol. (Quan điểm hiện nay về Công nghệ sinh học)* 8:455-458; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO02/043478). Lôcut globulin miễn dịch nội sinh trong các con chuột này có thể bị phá vỡ hoặc bị làm mất, và ít nhất một phần hoặc toàn bộ lôcut globulin miễn dịch người có thể được đưa vào bộ gen chuột sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp tương đồng hoặc không tương đồng, sử dụng nhiễm sắc thể chuyển đoạn, hoặc sử dụng gen nhỏ. Các công ty như Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) và Ablexis (http://_www_ablexis_com) có thể cam kết cung cấp kháng thể người được định hướng kháng lại kháng nguyên chọn lọc sử dụng công nghệ như mô tả ở phần trên.

Có thể chọn kháng thể người từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn, trong đó thực khuẩn được kiến tạo để biểu hiện globulin miễn dịch người hoặc các phần của chúng như Fab, kháng thể đơn chuỗi (scFv), hoặc các vùng biến đổi kháng thể tạo thành cặp hoặc không tạo cặp (Knappik và cộng sự, *J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử)* 296:57-86, 2000; Krebs và cộng sự, *J Immunol Meth (Tập chí Phương pháp miễn dịch học)* 254:67-84, 2001; Vaughan và cộng sự, *Nature Biotechnology (Công nghệ sinh học tự nhiên)* 14:309-314,

1996; Sheets và cộng sự, PITAS (HOA KỲ) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom và Winter, J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử) 227:381, 1991; Marks và cộng sự, J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử) 222:581, 1991). Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập, ví dụ, từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn biểu hiện vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể là protein dung hợp với protein áo pIX của thực khuẩn như được mô tả trong Shi và cộng sự, J Mol Biol (Tập chí sinh học phân tử) 397:385-96, 2010 và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO09/085462). Các thư viện được sàng lọc về sự liên kết thực khuẩn với CD154 người, khi đuôi sóc và/hoặc khi đuôi dài và các dòng tế bào dương tính thu được có thể được đặc trưng hóa hơn, các Fab phân lập từ dung dịch thủy phân dòng tế bào, và được biểu hiện là IgG với toàn bộ chiều dài. Phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn này để phân lập kháng thể người được mô tả, ví dụ, trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,223,409; 5,403,484; và 5,571,698 đến Ladner và cộng sự; Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,427,908 và 5,580,717 đến Dower và cộng sự; Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,969,108 và 6,172,197 đến McCafferty và cộng sự; và Bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081 đến Griffiths và cộng sự.

Có thể thực hiện điều chế kháng nguyên gây miễn dịch và sản xuất kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật phù hợp bất kỳ, như sản xuất protein tái tổ hợp. Có thể cho động vật sử dụng kháng nguyên gây miễn dịch dưới dạng protein tinh chế, hoặc hỗn hợp protein bao gồm toàn bộ tế bào hoặc phần chiết mô hoặc tế bào, hoặc kháng nguyên có thể được tạo *de novo* (mới) trong cơ thể động vật từ các axit nucleic mã hóa kháng nguyên nói trên hoặc một phần của nó.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể người hoặc kháng thể nhân hóa.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm khung VH có nguồn gốc từ gen dòng mầm người VH1_1-69, VH4_4-39, VH1_1-02 hoặc VH4_4-59.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm khung VL có nguồn gốc từ gen dòng mầm người VKIV_B3, VKI_O12 hoặc VL3_3R.

Kháng thể theo sáng chế có thể là loại IgD, IgE, IgG hoặc IgM. Kháng thể theo sáng chế có thể là loại IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Các kháng thể theo sáng chế có thể còn được kiến tạo để tạo kháng thể được điều hòa với các đặc tính tương tự hoặc đã được thay đổi so với kháng thể mẹ. VH, VL, các vùng hằng định, VH và VL, khung VH, khung VL, hoặc CDR bất kỳ hoặc tất cả các CDR trong số sáu CDR có thể được kiến tạo trong các kháng thể theo sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể được kiến tạo bằng kỹ thuật ghép CDR. Một hoặc nhiều trình tự CDR của các kháng thể theo sáng chế có thể được ghép với trình tự của khung khác. Có thể thực hiện ghép CDR bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm VH bao gồm HDCR1 có các SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 hoặc 21, HCDR2 có các SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 hoặc 28, HCDR3 có các SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 hoặc 35, và VL bao gồm LCDR1 có các SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 hoặc 42, LCDR2 có các SEQ ID NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49 hoặc 50, và/hoặc LCDR3 có các SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55, 56 hoặc 57, trong đó khung VH không có nguồn gốc từ VH1_1-69, VH4_4-39, VH1_1-02 hoặc VH4_4-59, và khung VL không có nguồn gốc từ VKIV_B3, VKI_O12 hoặc VL3_3R. Có thể thu được các trình tự khung được sử dụng từ cơ sở dữ liệu ADN chung hoặc các tham chiếu được công bố bao gồm các trình tự gen của kháng thể dòng mầm. Ví dụ, có thể tìm thấy các trình tự protein được mã hóa và ADN dòng mầm cho các gen vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng của người tại IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® [http://_www-imgt_org](http://www-imgt.org). Các trình tự khung có thể được sử dụng để thay thế các trình tự khung hiện tại trong các kháng thể theo sáng chế là các trình tự thể hiện phần trăm đồng nhất trình tự cao nhất đối với C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 và C4LB256.

Các trình tự khung của các kháng thể mẹ và các kháng thể được kiến tạo có thể còn được điều hòa, ví dụ, bằng các đột biến ngược để khôi phục và/hoặc cải thiện liên kết của kháng thể tạo thành với kháng nguyên như được mô tả trong, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 6,180,370. Các trình tự khung của các kháng thể mẹ và các kháng thể được kiến tạo có thể còn được điều hòa bằng cách đột biến một hoặc nhiều gốc bên trong vùng khung, hoặc ngay cả bên trong một hoặc nhiều vùng CDR, để loại bỏ các epitope tế bào T để từ đó giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng của kháng thể. Phương pháp này còn được gọi là “khử miễn dịch” và được mô tả chi tiết hơn trong Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 20030153043.

Các gốc CDR của các kháng thể theo sáng chế có thể được đột biến để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính liên kết của kháng thể được đề cập. Gây đột biến tại chỗ hoặc gây đột biến qua trung gian PCR có thể được thực hiện để đưa (các) đột biến vào, và tác dụng đối với liên kết kháng thể, hoặc đặc tính chức năng quan tâm khác, có thể

được đánh giá trong các thí nghiệm *trong ống nghiệm* hoặc *trong cơ thể sống* như được mô tả trong bản mô tả này và trong các Ví dụ. Các ví dụ về thay thế có thể được đưa vào là các điều hòa bảo thủ như được trình bày ở *phần trên*. Ngoài ra, thông thường không nhiều hơn một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc bên trong vùng CDR là được biến đổi.

Các thay thế Fc có thể được thực hiện đối với kháng thể theo sáng chế để điều hòa thời gian bán thải của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều thay thế trong các thay thế M252Y, S254T và T256E có thể được đưa vào để làm tăng thời gian bán thải của kháng thể tạo thành (Dall'Acqua và cộng sự, J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học) 281:23514-240, 2006).

Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế có thể được điều hòa sau khi dịch mã bằng các quy trình như glycosyl hóa, isome hóa, khử đường ra khỏi glycogen hoặc điều hòa cộng hóa trị xảy ra phi tự nhiên như bổ sung các gốc polyetylen glycol (pegylation) và điều hòa bằng cách liên kết với chất béo (lipidation). Các điều hòa này có thể xảy ra *trong cơ thể sống* hoặc *trong ống nghiệm*. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp vào polyetylen glycol (tiếp hợp với PEG) để tăng mức được động học của chúng. Có thể thực hiện tiếp hợp bằng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã biết. Việc tiếp hợp các kháng thể điều trị với PEG đã được chứng tỏ là làm tăng cường được lực học trong khi không làm ảnh hưởng đến chức năng (Knigh và cộng sự, Plateles (Tiểu cầu) 15:409-18, 2004; Leong và cộng sự, Cytokine (Cytokin) 16:106-19, 2001; Yang và cộng sự, Protein Eng (Tạo dựng protein) 16:761-70, 2003).

Các kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được điều hòa để tăng tính bền, tính chọn lọc, phản ứng chéo, ái lực, tính sinh miễn dịch hoặc các đặc tính sinh học hoặc lý sinh mong muốn khác đều thuộc phạm vi của sáng chế. Độ bền của kháng thể chịu sự ảnh hưởng bởi một số yếu tố, bao gồm (1) sự bao bọc từ lõi từng miền riêng biệt ảnh hưởng đến độ bền từ bên trong của chúng, (2) tương tác giao diện protein/protein tác động lên sự tạo thành cặp HC và LC, (3) hủy bỏ các gốc phân cực và tích điện, (4) mạng liên kết H đối với các gốc phân cực và tích điện; và (5) phân bố gốc phân cực và tích điện trên bề mặt giữa các lực liên phân tử và bên trong phân tử khác (Worn và cộng sự, J Mol Bio (Tạp chí sinh học phân tử) 305:989-1010, 2001). Có thể nhận dạng các gốc gây bất ổn cấu trúc tiềm năng dựa trên cấu trúc tinh thể của

kháng thể hoặc bằng cách tạo mô hình phân tử trong một số trường hợp nhất định, và có thể kiểm tra tác động của các gốc này đối với độ bền của kháng thể bằng cách tạo và đánh giá biến thể mang đột biến trong các gốc được nhận dạng. Một trong các cách làm tăng độ bền kháng thể là nâng điểm giữa chuyển hóa nhiệt (T_m) được đo bằng Phân tích nhiệt quét vi sai (Differential scanning calorimetry, DSC). Nhìn chung, T_m protein tương quan với độ bền của nó và tương quan nghịch với độ nhạy của nó đối với sự duỗi ra và biến tính trong dung dịch và các quy trình phân hủy phụ thuộc vào xu hướng duỗi ra của protein (Remmele và cộng sự, Biopharm (Dược phẩm sinh học) 13:36-46, 2000). Một số nghiên cứu phát hiện mối tương quan giữa sự xếp hạng độ bền vật lý của các chế phẩm được đo độ bền nhiệt bằng DSC và độ bền vật lý được đo bằng các phương pháp khác (Gupta và cộng sự, AAPS PharmSci 5E8, 2003; Zhang và cộng sự, J Pharm Sci (Tạp chí Khoa học dược) 93:3076-89, 2004; Maa và cộng sự, Int J Pharm (Tạp chí dược quốc tế) 140:155-68, 1996; Bedu-Addo và cộng sự, Pharm Res (Nghiên cứu dược) 21:1353-61, 2004; Remmele và cộng sự, Pharm Res (Nghiên cứu dược) 15:200-8, 1997). Các nghiên cứu chế phẩm cho rằng T_m của Fab có bao hàm về độ bền vật lý dài hạn của kháng thể đơn dòng tương ứng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đặc hiệu đôi.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đa đặc hiệu.

Các kháng thể đơn đặc hiệu liên kết đặc hiệu với CD154 theo sáng chế có thể được kiến tạo thành các kháng thể đặc hiệu đôi, cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Các vùng VL và/hoặc VH của kháng thể theo sáng chế có thể được kiến tạo bằng các phương pháp đã công bố thành các kháng thể đặc hiệu đôi đơn chuỗi, như các cấu trúc như thiết kế TandAb® (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1999/57150; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số US2011/0206672) hoặc thành các scFV đặc hiệu đôi, là các cấu trúc như các cấu trúc công bố trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,869,620; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1995/15388, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO1997/14719, hoặc Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2011/036460.

Các vùng VL và/hoặc VH của kháng thể theo sáng chế có thể được kiến tạo thành kháng thể đặc hiệu đôi đầy đủ chiều dài, trong đó mỗi nhánh của kháng thể liên kết với một kháng nguyên hoặc epitope khác nhau. Các kháng thể đặc hiệu đôi này có thể được tạo bằng cách điều hòa các tương tác CH3 giữa hai chuỗi nặng của kháng thể để tạo các kháng thể đặc hiệu đôi, sử dụng các kỹ thuật như kỹ thuật mô tả trong Bằng sáng chế

Hoa Kỳ số 7,695,936; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2004/111233; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2010/0015133; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2007/0287170; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2008/119353; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2009/0182127; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2010/0286374; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2011/0123532; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2011/131746; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2011/143545; hoặc Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 2012/0149876.

Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu đôi có thể được tạo *trong ống nghiệm* trong môi trường không có tế bào bằng cách đưa các đột biến bất đối xứng vào các vùng CH3 của hai kháng thể đồng dime đơn đặc hiệu và tạo thành kháng thể dị dime đặc hiệu đôi từ hai kháng thể đồng dime đơn đặc hiệu mẹ trong các điều kiện khử để cho phép isome hóa liên kết disulfua theo các phương pháp được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2011/131746. Trong các phương pháp, hai kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu được kiến tạo để có một số thay thế nhất định tại miền CH3 làm tăng cường tính bền dị dime; các kháng thể được ủ cùng nhau trong các điều kiện khử đủ để cho phép các xystein trong vùng bản lề trải qua quá trình isome hóa liên kết disulfua; từ đó tạo ra kháng thể đặc hiệu đôi bằng cách trao đổi nhánh Fab. Các điều kiện ủ nuôi cấy có thể được khôi phục lại tình trạng không khử. Ví dụ về các chất khử có thể được sử dụng là 2- mercaptoethylamin (2-MEA), dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), glutathion, tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP), L-xystein và beta-mercaptoetanol, tốt nhất là chất khử được chọn từ nhóm bao gồm: 2-mercaptoethylamin, dithiothreitol và tris(2-carboxyetyl)phosphin. Ví dụ, có thể ủ trong ít nhất 90 phút trong nhiệt độ ít nhất bằng 20°C với sự có mặt của ít nhất 25 mM 2-MEA hoặc với sự có mặt của ít nhất 0,5 mM dithiothreitol với độ pH bằng từ 5-8, ví dụ với độ pH bằng 7,0 hoặc độ pH bằng 7,4.

Ví dụ về các đột biến CH3 có thể được sử dụng trong chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đặc hiệu đôi là K409R và/hoặc F405L.

Các cấu trúc đặc hiệu đôi bổ sung mà các vùng VL và/hoặc VH của kháng thể theo sáng chế có thể hợp nhất vào, ví dụ, là các globulin miễn dịch của miền biến đổi kép (DVD) (Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009/134776), hoặc các cấu trúc bao gồm các miền nhị trùng hóa khác nhau để kết nối với hai nhánh của kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau, như cấu trúc leuxin zipper hoặc các miền nhị trùng hóa collagen

(Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2012/022811, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,932,448; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số 6,833,441). DVD là các kháng thể đầy đủ chiều dài bao gồm chuỗi nặng có cấu trúc VH1-cầu nối-VH2-CH và chuỗi nhẹ có cấu trúc VL1-cầu nối-VL2-CL; cầu nối là tùy chọn.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1 có một số trình tự VH và VL nhất định, trong đó VH kháng thể được mã hóa bởi polynucleotit thứ nhất và VL kháng thể được mã hóa bởi polynucleotit tổng hợp thứ hai. Polynucleotit có thể là axit deoxynucleic bổ sung (ADN bổ sung), và có thể được tối ưu codon để biểu hiện trong vật chủ phù hợp. Tối ưu hóa codon là một kỹ thuật được biết đến rộng rãi.

Trong một số phương án, polynucleotit mã hóa VH hoặc VL kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự có các SEQ ID NO: 76, 77, 78 hoặc 79.

SEQ ID NO: 76 (mã hoá VH của C4LB231)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGA
CAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGA
ACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTAC
GCCAACAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTC
CGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGC
CACCTACTACTGCCAGCAGAGCGACAGCATCCCCTGGACCTTCGGCCAGG
GCACCAAGGTGGAAATCAAG

SEQ ID NO: 77 (mã hoá VL của C4LB231)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCA
GCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCAGCTACGGC
ATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCCAGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCT
GGATCAGCCCCATCTTCGGCAACACCAACTACGCCCAGAAATTCAGGGC
AGAGTGACCATCACCGCCGACGAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAC
TGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAG
CCGGTACTACGGCGACCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCG
TGTCCTCT

SEQ ID NO: 78 (mã hoá VH của C4LB191)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
CGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAGCATGAAGGTGTCCTGCAAGGCC
AGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCC
AGGCCAGGGACTGGAATGGGTGGGACGGTTCAACCCCAACAGCGGCGAC
ACCAACGGCGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACA
CCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTACCCGGCTGCGGAGCGACGAC
ACCGCCGTGTACCACTGTGCCAGAGAGGGCGAGCTGGCCGGCATCTTCTT
CGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCAGC

SEQ ID NO: 79 (mã hoá VL của C4LB191)

AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCCGTGTCTCCTGGCCAGACC
GCCAGCATCACCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTCCTG
GAACCACCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTGATCTACCAGGACC
GGAAGAGGCCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAACAGCGG
CAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCG
ACTACTACTGCCAGGCCTGGGACAGCAGCACCGTGGTGTTCGGCGGAGGC
ACCAAGCTGACCGTGCTG

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa vùng bất kỳ trong các vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế. Trong bản mô tả này có trình bày một số ví dụ nhất định về polynucleotit, tuy nhiên, trong trường hợp có suy biến mã di truyền hoặc ưu tiên codon trong hệ biểu hiện đã cho, các polynucleotit khác mã hóa các kháng thể theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các ví dụ về polynucleotit là các polynucleotit có các trình tự được biểu hiện trong các SEQ ID NO: 76, 77, 78 VÀ 79. Các trình tự polynucleotit mã hóa VH hoặc VL hoặc mảnh của chúng của kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với một hoặc nhiều phần tử điều hòa, như trình tự khởi động hoặc trình tự tăng cường, cho phép biểu hiện trình tự nucleotit trong tế bào chủ dự định. Polynucleotit có thể là ADN bổ sung.

Sáng chế đồng thời đề xuất vector bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Các vector này có thể là vector plasmit, vector virus, vector để biểu hiện virus Baculo, các vector nền gen nhảy hoặc vector bất kỳ phù hợp để đưa polynucleotit tổng hợp theo sáng

chế vào sinh vật hoặc nền di truyền đã cho bằng phương tiện bất kỳ. Ví dụ, các polynucleotit mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc nhẹ của kháng thể theo sáng chế, có thể liên kết với miền hằng định, sẽ được đưa vào các vectơ biểu hiện. Các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ có thể được tách dòng trong các vectơ biểu hiện giống nhau hoặc khác nhau. Các đoạn ADN mã hóa các chuỗi globulin miễn dịch có thể được liên kết với các trình tự kiểm soát trong (các) vectơ biểu hiện, đảm bảo biểu hiện của các polypeptit globulin miễn dịch. Các trình tự kiểm soát bao gồm trình tự tín hiệu, trình tự khởi động (ví dụ, các trình tự khởi động không tương đồng hoặc liên kết tự nhiên), các phần tử trình tự tăng cường, các trình tự kết thúc phiên mã, được chọn để tương thích với tế bào chủ được chọn để biểu hiện kháng thể. Khi vectơ đã được hợp nhất vào vật chủ phù hợp, vật chủ được giữ trong các điều kiện phù hợp với biểu hiện mức cao của protein được mã hóa bởi polynucleotit hợp nhất.

Các vectơ biểu hiện phù hợp thông thường được nhân bản trong sinh vật chủ dưới dạng thể bổ sung hoặc dưới dạng một phân tích hợp của ADN nhiễm sắc thể của vật chủ. Nhìn chung, các vectơ biểu hiện chứa các dấu ấn chọn lọc như kháng ampicilin, kháng hygromycin, kháng tetracyclin, kháng kanamycin hoặc kháng neomycin để cho phép phát hiện các tế bào này biến nạp bằng các trình tự ADN mong muốn.

Các thành phần trình tự tăng cường và trình tự khởi động phù hợp đã được biết đến trong ngành. Đối với biểu hiện trong tế bào nhân thực, các trình tự khởi động ví dụ bao gồm các thành phần trình tự tăng cường và trình tự khởi động gen globulin miễn dịch chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng; trình tự khởi động sớm tức thì của virus cytomegalo ở người; trình tự khởi động thymidine kinase của virus herpes đơn dạng; trình tự khởi động sớm và trễ SV40; trình tự khởi động có mặt trong các lặp lại đoạn cuối dài hạn từ virus retro; trình tự khởi động metallothionein-I của chuột; và các trình tự khởi động đặc hiệu mô khác nhau đã biết trong ngành. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ cách lựa chọn vectơ và trình tự khởi động phù hợp.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng biết rõ một số lượng lớn các vectơ và trình tự khởi động phù hợp; nhiều loại đã có bán trên thị trường để tạo các cấu trúc tái tổ hợp chủ đề. Sau đây là các ví dụ về vectơ. Vi khuẩn: pBs, thể thực khuẩn, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, và pRIT5 (Pharmacia,

Uppsala, Sweden). Nhân thực: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG và pSVL (Pharmacia).

Sáng chế đồng thời đề xuất tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector theo sáng chế. "Tế bào chủ" chỉ tế bào mà vector được đưa vào. Cần hiểu rằng thuật ngữ tế bào chủ không những chỉ tế bào chủ thể cụ thể mà còn chỉ thể hệ con của tế bào này, và cũng chỉ dòng tế bào ổn định được tạo từ tế bào chủ thể cụ thể. Do có thể xảy ra các điều hoà nhất định trong các thể hệ tiếp theo do các ảnh hưởng từ đột biến hoặc môi trường, thể hệ con có thể không đồng nhất với tế bào mẹ, nhưng vẫn trong phạm vi của thuật ngữ "tế bào chủ" sử dụng trong bản mô tả này. Các tế bào chủ có thể là tế bào nhân thực, tế bào nhân sơ, tế bào thực vật hoặc tế bào cổ khuẩn.

Escherichia coli, trực khuẩn, như *Bacillus subtilis*, và các vi khuẩn đường ruột (enterobacteriaceae) khác, như *Salmonella*, *Serratia*, và các loại *Pseudomonas* khác nhau là các ví dụ về tế bào chủ nhân sơ. Các vi trùng khác, như men, cũng hữu ích cho việc biểu hiện. Nấm men *Saccharomyces* (ví dụ *S. cerevisiae*) và *Pichia* là các ví dụ về tế bào chủ men phù hợp. Các tế bào nhân thực, ví dụ, có thể có nguồn gốc là động vật có vú, côn trùng, gia cầm, hoặc các loại động vật khác. Các tế bào nhân thực nguồn gốc động vật có vú bao gồm các dòng tế bào bất tử như các dòng tế bào lai hoặc dòng tế bào u tủy như các dòng tế bào chuột SP2/0 (Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (Bộ sưu tập châu Âu về nuôi cấy tế bào (European Collection of Cell Cultures, ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) và Ag653 (ATCC CRL-1580). Ví dụ về dòng tế bào u tủy người là U266 (ATCC CRL-TIB-196). Các dòng tế bào hữu ích khác bao gồm các dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (CHO) như CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) hoặc DG44.

Sáng chế đồng thời đề xuất phương pháp tạo kháng thể theo sáng chế, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện mà trong đó kháng thể được biểu hiện, và bước thu hồi kháng thể được sản sinh từ tế bào chủ. Các phương pháp tạo kháng thể và tinh chế chúng được biết đến rộng rãi trong ngành. Khi đã được tổng hợp (bằng cách hóa học hoặc tái tổ hợp), toàn bộ kháng thể, các đime của chúng, các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ riêng biệt, hoặc các mảnh kháng thể khác như VH và/hoặc VL, có thể được tinh chế theo các quy trình tiêu chuẩn, bao gồm kết tủa nhôm sulfat, cột ái lực, sắc ký cột, tinh chế

sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), điện di trên gel, v.v. (xem khái quát Scopes, Protein Purification (Phạm vi, tinh chế protein) (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). Kháng thể chủ đề có thể hầu như là tinh khiết, ví dụ, tinh khiết ở mức ít nhất khoảng 80% đến 85%, ít nhất khoảng 85% đến 90%, ít nhất khoảng 90% đến 95%, hoặc ít nhất khoảng 98% đến 99%, hoặc tinh khiết hơn nữa, ví dụ, không có các chất nhiễm bẩn như mảnh vụn tế bào, các đại phân tử, v.v. không phải là kháng thể chủ đề.

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất phương pháp tạo kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm:

bước hợp nhất polynucleotit thứ nhất mã hóa VH của kháng thể và polynucleotit thứ hai mã hóa VL của kháng thể vào vector biểu hiện;

bước biến nạp tế bào chủ với vector biểu hiện;

bước nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện trong đó VL và VH được biểu hiện và tạo thành kháng thể; và

bước thu hồi kháng thể từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy.

Các polynucleotit mã hóa các trình tự VH hoặc VL nhất định theo sáng chế có thể được hợp nhất vào các vector bằng các phương pháp sinh học phân tử tiêu chuẩn. Thực hiện biến nạp, nuôi cấy, biểu hiện kháng thể và tinh chế tế bào chủ bằng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi.

Phương pháp điều trị

Các kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 theo sáng chế, ví dụ các kháng thể C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 và C4LB236, có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa tình trạng hoặc bệnh bất kỳ trong đó sự đối kháng các tác động của CD154 có thể điều trị hiệu quả và có thể giảm các triệu chứng của bệnh. Các ví dụ bao gồm điều trị các tình trạng dị ứng, tự miễn, ung thư, cấy ghép, GVHD, viêm và các tình trạng khác, cụ thể là các tình trạng trong đó sự cảm ứng dung nạp và/hoặc sự ức chế miễn dịch thể dịch được mong muốn về mặt điều trị. Các bệnh có thể được điều trị bằng các kháng thể theo sáng chế là các bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn như viêm khớp, lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm ruột, cấy ghép, ghép thận, cấy ghép da, ghép tủy xương, bệnh mảng ghép chống lại ký chủ (GVHD), giảm

tiểu cầu miễn dịch (ITP), xơ cứng rải rác, viêm tuyến giáp, tiểu đường loại I hoặc xơ vữa động mạch.

Ngoài việc chỉ ức chế các tương tác CD154-CD40, liệu pháp kháng CD154 còn gây ra cảm ứng dung nạp miễn dịch (Gordon và cộng sự, Diabetes (Tiểu đường) 47: 1199-1206, 1988); Markees và cộng sự, Transplantation (Cấy ghép) 64: 329-335, 1997; Jarvinen và cộng sự, Transplantation (Cấy ghép) 76: 1375-1379, 2003; Quezada và cộng sự, Blood (Máu) 102: 1920-1926, 2003; Frleta và cộng sự, J Immunother (Tập chí Liệu pháp miễn dịch) 26: 72-84, 2003; Elster và cộng sự, Transplantation (Cấy ghép) 72: 1473-1478, 2001; Benda và cộng sự, Cell Transplantation (Cấy ghép tế bào) 11: 715-720, 2002; Wekerle và Sykes, Annual review of medicine (Tập chí y khoa niên san) 2001. 52: 353-370¹⁹; Camirand và cộng sự, Transplantation (Cấy ghép) 73: 453-461, 2002).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm khớp, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh viêm khớp.

Trong một số phương án, viêm khớp là viêm khớp trẻ em, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp vẩy nến, hội chứng Reiter, viêm cột sống dính khớp, hoặc viêm khớp gút.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh lupus, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh lupus.

Trong một số phương án, bệnh lupus là lupus ban đỏ hệ thống (SLE) hoặc lupus ban đỏ ở da (CLE).

Trong một số phương án, đối tượng mắc bệnh viêm thận do lupus.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm ruột, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể theo sáng chế trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh viêm ruột.

Trong một số phương án, bệnh viêm ruột là bệnh Crohn.

Trong một số phương án, bệnh viêm ruột là bệnh viêm loét đại tràng.

“Sự điều trị” hay “điều trị” chỉ việc điều trị để chữa trị bệnh. Các cá nhân cần điều trị bao gồm những người được chẩn đoán mắc chứng rối loạn hoặc triệu chứng của chứng rối loạn. Các đối tượng có thể được điều trị còn bao gồm những người có xu hướng hoặc rất dễ mắc chứng rối loạn, trong đó chứng rối loạn cần phải được ngăn ngừa. Các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm sự làm giảm triệu chứng, thu nhỏ phạm vi của bệnh, ổn định (tức là không biến đổi xấu đi) tình trạng của bệnh, làm cản trở hoặc làm chậm lại sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm bớt tình trạng bệnh, và thuyên giảm (một phần hoặc toàn bộ), cho dù các kết quả này có thể được phát hiện hoặc không được phát hiện. Kết quả lâm sàng có lợi bao gồm, ở đối tượng đã được điều trị, ví dụ, là sự giảm tăng sinh tế bào B hoặc tế bào tua, giảm các cytokin viêm, các phân tử gắn kết, các proteaza, các globulin miễn dịch (trong các trường hợp trong đó các tế bào mang CD40 là tế bào B), các kết hợp của các kết quả có lợi này, tăng sản lượng protein kháng viêm, giảm số lượng tế bào tự phản ứng, tăng dung nạp miễn dịch, ức chế sự sống sót của tế bào tự phản ứng, và/hoặc giảm một hoặc nhiều triệu chứng bằng cách kích thích các tế bào biểu hiện CD40 bằng CD154.

Có thể đánh giá đáp ứng lâm sàng bằng cách kỹ thuật sàng lọc như quét chụp ảnh cộng hưởng từ (MRI), chụp ảnh X-quang, chụp cắt lớp điện toán (CT), phân tích đo và đếm tế bào theo dòng (flow cytometry) hay phân tích tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), mô học, bệnh học đại thể, xét nghiệm hóa học máu, bao gồm nhưng không giới hạn trong các thay đổi được phát hiện bằng ELISA, RIA, sắc ký, v.v.

Các kháng thể ví dụ có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm VH, VL, các vùng HCDR và/hoặc LCDR như được trình bày trong Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 13 và Bảng 14, và các kháng thể C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 và C4LB236.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị đối tượng là loại động vật bất kỳ. Các ví dụ về các đối tượng có thể được điều trị này bao gồm động vật có vú như con người, loài gặm nhấm, chó, mèo và động vật nông trại.

Các kháng thể theo sáng chế có thể hữu ích trong việc điều chế dược phẩm cho việc điều trị này, trong đó dược phẩm được điều chế để sử dụng theo liều lượng được xác định trong bản mô tả này.

Có thể sử dụng kháng thể theo sáng chế kết hợp với tác nhân điều trị thứ hai.

Tác nhân điều trị thứ hai có thể là liệu pháp đã biết để điều trị các bệnh viêm và bệnh tự miễn, bao gồm tác nhân bất kỳ hoặc kết hợp các tác nhân được biết là có hiệu quả, hoặc tác nhân đã được sử dụng hoặc đang được sử dụng, để điều trị bệnh viêm và bệnh tự miễn. Các tác nhân và thuốc điều trị này bao gồm phẫu thuật hoặc các thủ thuật phẫu thuật (ví dụ, thủ thuật cắt bỏ lách, thủ thuật cắt bỏ hạch bạch huyết, thủ thuật cắt bỏ tuyến giáp, tách hồng huyết cầu ra khỏi dịch tương, tách bạch cầu, cấy ghép tế bào, mô, hoặc cơ quan, thủ thuật ruột, truyền dịch cơ quan, v.v.), liệu pháp xạ trị, liệu pháp như liệu pháp sử dụng steroid và liệu pháp không steroid, liệu pháp hormon, liệu pháp cytokin, liệu pháp với các tác nhân sử dụng trên da (ví dụ, các tác nhân dùng tại chỗ được sử dụng để điều trị các tình trạng về da như dị ứng, viêm da tiếp xúc, và bệnh vẩy nến), liệu pháp ức chế miễn dịch, và liệu pháp kháng thể đơn dòng kháng viêm khác.

Tác nhân điều trị thứ hai có thể là corticosteroid, thuốc điều trị sốt rét, thuốc ức chế miễn dịch, thuốc gây độc tế bào, hoặc thuốc điều hòa tế bào B.

Trong một số phương án, tác nhân điều trị thứ hai là prednison, prednisolon, methylprednisolon, deflazcort, hydroxycloquin, azathioprine, metotrexat, xyclophosphamit, mycophenolate mofetil (MMF), mycophenolate natri, xyclosporin, leflunomide, tacrolimus, RITUXAN® (rituximab), hoặc BENLYSTA® (belimumab).

Trong một số phương án, có thể sử dụng kháng thể theo sáng chế kết hợp với tác nhân điều trị thứ hai. Các ví dụ về tác nhân điều trị thứ hai là corticosteroid, thuốc kháng viêm không steroid (NSAID), salixylat, hydroxycloquin, sulfasalazin, thuốc gây độc tế bào, thuốc ức chế miễn dịch, kháng thể điều hòa miễn dịch, metotrexat, xyclophosphamit, mizoribin, clorambucil, xyclosporin, tacrolimus (FK506; ProGrafrM), mycophenolate mofetil, và azathioprine (6-mercaptopurin), sirolimus (rapamycin), deoxyspergualin, leflunomide và các chất tương tự malononitriloamide; các kháng thể kháng CTLA4 và các sản phẩm dung hợp Ig, các kháng thể chất kích thích kháng lympho bào B (ví dụ, LYMPHOSTAT-BTM) và các sản phẩm dung hợp CTLA4-Ig (BLyS-Ig), các kháng thể kháng CD80, các kháng thể kháng tế bào T như các kháng thể kháng CD3 (OKT3), kháng CD4, các corticosteroid như, ví dụ, clobetasol, halobetasol, hydrocortison, triamcinolon, betametason, fluocinole, fluocinonide, prednison, prednisolon, methylprednisolon; các thuốc chống viêm không steroid (NSAID) như, ví dụ, sulfasalazin, các dược phẩm chứa mesalamin (được gọi là các chất 5-ASA), celecoxib, diclofenac, etodolac, fenprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, meclofamate, meloxicam, nabumetone, naproxen,

oxaprozin, piroxicam, rofecoxib, salixylat, sulindac, và tolmetin; các chất ức chế phosphodiesteraza-4, các kháng thể kháng TNF α REMICADE® (infliximab), SIMPONI® (golimumab) và HUMIRA® (adalimumab), talidomit hoặc các chất tương tự như lenalidomit.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân điều trị thứ hai đồng thời, một cách tuần tự hoặc riêng biệt.

Có thể đánh giá hiệu quả điều trị hoặc RA theo hiệu quả được đo bằng các đáp ứng lâm sàng được xác định theo tiêu chuẩn của Hội Thấp khớp học Hoa Kỳ (American College of Rheumatology), tiêu chuẩn của Liên đoàn chống thấp khớp châu Âu (European League of Rheumatism), và tiêu chuẩn khác bất kỳ. Xem, ví dụ, Felson và cộng sự (1995) Arthritis Rheum. (Viêm khớp dạng thấp) 38: 727-35 và van Gestel và cộng sự (1996) Arthritis Rheum (Viêm khớp dạng thấp). 39: 34-40.

Phương thức sử dụng/Dược phẩm

Sáng chế đề xuất các dược phẩm bao gồm các kháng thể đối kháng liên kết đặc hiệu với CD154 theo sáng chế và chất mang dược dụng. Để sử dụng trong điều trị, các kháng thể theo sáng chế có thể được điều chế làm dược phẩm chứa lượng hữu hiệu kháng thể làm hoạt chất trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang" chỉ chất pha loãng, tá chất, tá dược, hoặc chất vận chuyển mà hoạt chất được sử dụng với nó. Các chất mang này có thể là chất lỏng, như nước và dầu, bao gồm chất lỏng của dầu hỏa, động vật, rau củ hoặc nguồn gốc tổng hợp, như dầu đậu phộng, dầu nành, dầu khoáng, dầu mè, v.v. Ví dụ, có thể sử dụng dung dịch muối đẳng trương 0,4% và glyxin 0,3%. Các dung dịch này vô trùng và thường không có vật chất dạng hạt. Chúng có thể được khử trùng bằng kỹ thuật khử trùng thông thường đã biết (ví dụ, lọc). Các chế phẩm có thể chứa chất phụ trợ dược dụng cần thiết để phù hợp với các tình trạng sinh lý học liên quan như chất đệm và điều chỉnh pH, chất ổn định, chất làm dày, chất bôi trơn và chất tạo màu, v.v. Nồng độ phân tử hoặc kháng thể theo sáng chế trong dược phẩm này có thể thay đổi trong phạm vi rộng, *tức là*, từ nhỏ hơn khoảng 0,5%, thông thường đến ít nhất khoảng 1% lên đến mức 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% hoặc 50% khối lượng và sẽ được lựa chọn chủ yếu theo liều lượng, thể tích chất lỏng, độ nhớt theo yêu cầu, v.v., theo đường dùng cụ thể được chọn. Các chất mang và chế phẩm phù hợp, bao gồm các protein ở người khác, ví dụ, albumin huyết

thanh người, được mô tả, ví dụ, trong, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Khoa học và Thực hành về Dược), Ấn bản thứ 21, btv Troy, D.B., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Phần 5, Pharmaceutical Manufacturing (Sản xuất dược) tr. 691-1092, xem trang cụ thể 958-989.

Đường dùng kháng thể theo sáng chế trong các phương pháp theo sáng chế có thể là đường dùng phù hợp bất kỳ, như đường dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch hoặc dưới da, qua niêm mạc (miệng, trong mũi, trong âm đạo, trực tràng) hoặc các phương thức khác phổ biến và được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được cho đối tượng sử dụng bằng đường dùng phù hợp bất kỳ, ví dụ, ngoài đường tiêu hóa như truyền tĩnh mạch (*i.v.*) hoặc tiêm nhanh, đường dùng trong cơ hoặc dưới da hoặc trong màng bụng. Việc truyền tĩnh mạch (*i.v.*) có thể được thực hiện trong 15, 30, 60, 90, 120, 180, hoặc 240 phút, hoặc từ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12 giờ.

Liều lượng sử dụng cho đối tượng mắc bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn như viêm khớp dạng thấp là đủ để làm giảm hoặc ít nhất kìm hãm một phần căn bệnh đang được điều trị (“lượng điều trị hữu hiệu”) và thông thường có thể bằng 0,005 mg/kg đến khoảng 100 mg/kg, ví dụ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg hoặc khoảng 0,1 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg, hoặc khoảng 1 mg đến khoảng 20 mg/kg, hoặc khoảng 4 mg/kg, khoảng 8 mg/kg, khoảng 16 mg/kg hoặc khoảng 24 mg/kg, hoặc, ví dụ, khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 mg/kg, nhưng có thể cao hơn, ví dụ khoảng 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 mg/kg.

Cũng có thể cho liều đơn vị cố định, ví dụ, 50, 100, 200, 500 hoặc 1000 mg, hoặc liều lượng có thể dựa trên diện tích bề mặt cơ thể của bệnh nhân, ví dụ, 500, 400, 300, 250, 200, hoặc 100 mg/m². Thường dùng trong khoảng 1 đến 8 liều, (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8) để điều trị bệnh viêm qua trung gian miễn dịch như viêm khớp dạng thấp, nhưng cũng có thể cho dùng 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều liều hơn.

Có thể lặp lại việc sử dụng kháng thể theo sáng chế sau một ngày, hai ngày, ba ngày, bốn ngày, năm ngày, sáu ngày, một tuần, hai tuần, ba tuần, một tháng, năm tuần, sáu tuần, bảy tuần, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng hoặc lâu hơn.

Cũng có thể lặp lại quá trình điều trị dưới dạng dùng thuốc mạn tính. Việc dùng thuốc lặp lại có thể cùng liều hoặc khác liều. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng với liều 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg hoặc liều 16 mg/kg mỗi tuần một lần trong 8 tuần, sau đó dùng liều 8 mg/kg hoặc liều 16 mg/kg 2 tuần một lần trong 16 tuần nữa, sau đó dùng liều 8 mg/kg hoặc liều 16 mg/kg 4 tuần một lần bằng đường truyền tĩnh mạch.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được cung cấp theo liệu pháp điều trị duy trì, ví dụ như, một lần một tuần trong khoảng thời gian 6 tháng hoặc lâu hơn.

Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được đề xuất liều hàng ngày với lượng bằng khoảng 0,1-100 mg/kg, như 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 mg/kg, mỗi ngày, vào ít nhất một trong các ngày 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, hoặc 40, hoặc, ít nhất một trong các tuần 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 sau khi bắt đầu điều trị, hoặc theo lịch trình kết hợp bất kỳ, sử dụng liều đơn hoặc các liều được chia ra mỗi 24, 12, 8, 6, 4, hoặc 2 giờ, hoặc kết hợp lịch trình bất kỳ.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được cho sử dụng theo liệu pháp phòng ngừa nhằm làm giảm nguy cơ phát triển bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn như viêm khớp hoặc viêm khớp dạng thấp, và/hoặc làm trì hoãn khởi phát bệnh viêm qua trung gian miễn dịch của bệnh tự miễn.

Vì vậy, dược phẩm theo sáng chế dùng để tiêm bắp có thể được bào chế chứa 1 ml nước có chất đệm vô trùng, và trong khoảng 1 ng đến khoảng 100 mg/kg, ví dụ, khoảng 50 ng đến khoảng 30 mg/kg hoặc tốt hơn là bằng khoảng 5 mg đến khoảng 25 mg/kg kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ, dược phẩm bao gồm các kháng thể theo sáng chế dành cho truyền tĩnh mạch có thể được điều chế chứa khoảng 200 ml dung dịch Ringer vô trùng, và khoảng 8 mg đến khoảng 2400 mg, khoảng 400 mg đến khoảng 1600 mg, hoặc khoảng 400 mg đến khoảng 800 mg kháng thể theo sáng chế để sử dụng cho bệnh nhân 80 kg. Phương pháp điều chế chế phẩm được sử dụng qua đường tiêm đã được biết và được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Science" (Khoa học dược của Remington), ấn bản thứ 15, Mack Publishing Company, Easton, PA.

“Lượng điều trị hữu hiệu” của kháng thể theo sáng chế để điều trị hiệu quả bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn có thể được xác định bằng các kỹ thuật nghiên cứu tiêu chuẩn. Ví dụ, các xét nghiệm *trong ống nghiệm* có thể được sử dụng để giúp xác định khoảng liều lượng tối ưu. Tùy chọn, có thể xác định liều lượng kháng thể theo sáng chế để điều trị hiệu quả các bệnh viêm qua trung gian miễn dịch hoặc bệnh tự miễn như viêm khớp hoặc viêm khớp dạng thấp bằng cách cho các mẫu động vật liên quan được biết trong ngành sử dụng các kháng thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định việc lựa chọn liều hữu hiệu cụ thể (ví dụ, thông qua thử nghiệm lâm sàng) dựa trên việc xem xét một số yếu tố. Các yếu tố này bao gồm căn bệnh được điều trị hoặc ngăn ngừa, các triệu chứng liên quan, khối lượng cơ thể của bệnh nhân, tình trạng miễn dịch của bệnh nhân và các yếu tố khác mà người có trình độ trong ngành đã biết. Liều chính xác được sử dụng trong chế phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào đường truyền thuốc, và mức độ nghiêm trọng của bệnh, và phải được quyết định theo đánh giá của chuyên gia và từng hoàn cảnh của bệnh nhân. Có thể ngoại suy liều hữu hiệu từ đường cong liều lượng đáp ứng được truy xuất từ hệ thống thử nghiệm mẫu động vật hoặc *trong ống nghiệm*. Các kháng thể theo sáng chế có thể được thử nghiệm về tính hiệu quả và liều hữu hiệu bằng cách sử dụng bất kỳ các mẫu nào được mô tả trong tài liệu này.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được đông khô để bảo quản và được tái tạo trong chất mang phù hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã cho thấy hiệu quả với các chế phẩm protein thông thường và có thể sử dụng kỹ thuật đông khô và tái tạo phổ biến trong ngành.

Các kháng thể kháng idiotyp

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết với kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 58 và VL có SEQ ID NO: 65.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 60 và VL có SEQ ID NO: 67.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 61 và VL có SEQ ID NO: 68.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 62 và VL có SEQ ID NO: 69.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 63 và VL có SEQ ID NO: 70.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 64 và VL có SEQ ID NO: 71.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng idiotyp liên kết đặc hiệu với kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73.

Kháng thể kháng idiotyp (Id) là kháng thể nhận biết các yếu tố quyết định kháng nguyên (ví dụ paratope hoặc các CDR) của kháng thể. Kháng thể Id có thể ức chế kháng nguyên hoặc không ức chế. Id ức chế kháng nguyên có thể được sử dụng để phát hiện kháng thể tự do trong mẫu (ví dụ kháng thể CD154 theo sáng chế được mô tả trong tài liệu này). Id không ức chế có thể được sử dụng để phát hiện tổng lượng kháng thể (tự do, liên kết một phần với kháng nguyên, hoặc liên kết hoàn toàn với kháng nguyên) trong mẫu. Kháng thể Id có thể được điều chế bằng cách tạo miễn dịch cho động vật bằng kháng thể mà kháng thể kháng Id được điều chế cho nó.

Kháng thể kháng Id cũng có thể được sử dụng như chất sinh miễn dịch để cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở động vật khác, tạo ra kháng thể được gọi là kháng thể chống kháng Id. Kháng thể chống kháng Id có thể đồng nhất về epitope với kháng thể đơn dòng gốc, kháng thể này cảm ứng kháng Id. Vì vậy, bằng cách sử dụng các kháng thể cho các yếu tố quyết định idiotyp của kháng thể đơn dòng, có thể nhận dạng các dòng khác biểu hiện các kháng thể có tính đặc hiệu đồng nhất. Các kháng thể kháng Id có thể được biến đổi (do đó tạo ra các biến thể của kháng thể kháng Id) và/hoặc được dẫn xuất bằng kỹ thuật phù hợp bất kỳ, như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này về các kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng thể HLA-DR.

Thẻ liên hợp miễn dịch

“Thẻ liên hợp miễn dịch” chỉ kháng thể theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử không tương đồng.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào. Các chất gây độc tế bào ví dụ bao gồm các chất hoặc thuốc hóa trị liệu, các chất ức chế tăng trưởng, các độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của nó), và các đồng vị phóng xạ.

Trong một số phương án, thể liên hợp miễn dịch là liên hợp kháng thể - thuốc (ADC) mà trong đó kháng thể theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều thuốc, như là với maytansinoid (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,208,020, 5,416,06)); auristatin như các gốc thuốc monomethylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298), dolastatin, calicheamicin hoặc chất dẫn xuất của nó (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739, 116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman và cộng sự, (1993) *Cancer Res* (Nghiên cứu ung thư) 53:3336-3342; và Lode và cộng sự, (1998) *Cancer Res* (Nghiên cứu ung thư) 58:2925-2928); anthracycline như daunomycin hoặc doxorubicin (xem, ví dụ, Kratz và cộng sự, (2006) *Current Med. Chem.* (Hóa dược ngày nay), 13:477-523; Jeffrey và cộng sự, (2006) *Bioorganic & Med Chem Letters* (Thư tín về hóa sinh hữu cơ và hoá dược) 16:358-362; Torgov và cộng sự, (2005) *Bioconj Chem* (Hóa học liên hợp sinh học) 16:717-721; Nagy và cộng sự, (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 97:829-834; Dubowchik và cộng sự, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* (Thư tín về hóa sinh hữu cơ và hoá dược) 12: 1529-1532 (2002); King và cộng sự, (2002) *J Med Chem* (Tạp chí Hóa dược) 45:4336-4343; và Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,630,579), metotrexat, vindesine, taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel.

Trong một số phương án, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể theo sáng chế được liên hợp với độc tố hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, như chuỗi A bệnh bạch hầu, các mảnh hoạt tính không liên kết của độc tố bạch hầu, chuỗi A ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A rixin, chuỗi A abrin, chuỗi A modeccin, alpha-sarcin, protein *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein *Phytolaca americana* (Thương lục Mỹ) (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế từ mướp đắng, curcin, crotin, chất ức chế từ cỏ bồ hòn, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothecene.

Trong một số phương án, kháng thể theo sáng chế được liên hợp với nguyên tử phóng xạ để tạo liên hợp phóng xạ. Có nhiều loại đồng vị phóng xạ để sử dụng trong sản xuất liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 và các đồng vị phóng xạ của Lu. Khi liên hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, liên hợp có thể bao gồm nguyên tử phóng xạ cho các nghiên cứu xạ hình, ví dụ tc99 m hoặc I123, hoặc nhãn spin để tạo ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là tạo ảnh cộng hưởng từ, mri), như Iot-123, Iot-131, Indium-111, flo-19, carbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các liên hợp kháng thể theo sáng chế và chất gây độc tế bào có thể được tạo bằng cách sử dụng các chất ghép cặp protein hai chức như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolane (IT), các chất dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimethyl adipimidate HQ), este hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandi-amin), các chất dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendi-amin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo hoạt tính (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế theo mô tả trong Vitetta và cộng sự, (1987) *Science (Khoa học)* 238: 1098. Axit l-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được gắn nhãn Carbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem, ví dụ, W094/11026. Cầu nối có thể là “cầu nối có thể phân chia” hỗ trợ phóng thích thuốc gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, cầu nối không bền trong axit, cầu nối nhạy peptidaza, cầu nối photolabile (không ổn định khi tiếp xúc với ánh sáng), cầu nối dimethyl hoặc cầu nối chứa disulfua (Chari và cộng sự, (1992) *Cancer Res (Nghiên cứu ung thư)* 52: 127-131; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Các thể liên hợp miễn dịch hoặc ADC có thể được điều chế với các thuốc thử cầu nối chéo như BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có sẵn trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Sáng chế cũng đề xuất thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1 theo sáng chế liên kết với tác nhân điều trị hoặc chất tạo ảnh.

Các phương án khác của sáng chế

Dưới đây là các phương án khác của sáng chế được công bố trong bản mô tả này. Các đặc điểm từ các phương án được mô tả ở phần trên của sáng chế được công bố trong bản mô tả này cũng liên quan đến từng phương án trong các phương án khác được đánh số này.

- 1) Kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 người có SEQ ID NO: 1, bao gồm vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), và HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), trong đó tùy chọn
 - a) gốc S1 của HCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T hoặc V;
 - b) gốc I4 của HCDR1 được đột biến thành M, L hoặc V;
 - c) gốc S5 của HCDR1 được đột biến thành A;
 - d) gốc S3 của HCDR2 được đột biến thành A, T hoặc V;
 - e) gốc P4 của HCDR2 được đột biến thành V, T, L Q hoặc E;
 - f) gốc N8 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - g) gốc T9 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - h) gốc N10 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - i) gốc S1 của HCDR3 được đột biến thành A hoặc M;
 - j) gốc R2 của HCDR3 được đột biến thành A, S, Q hoặc K; và
 - k) gốc L7 của HCDR3 được đột biến thành M.
- 2) Kháng thể theo điểm 1, bao gồm vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) và LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), trong đó tùy chọn
 - a) gốc Q4 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - b) gốc S5 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

- c) gốc S7 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - d) gốc S8 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - e) gốc A2 của LCDR2 được đột biến thành S;
 - f) gốc N3 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - g) gốc S4 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - h) gốc L5 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - i) gốc Q6 của LCDR2 được đột biến thành E, D hoặc N;
 - j) gốc S7 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - k) gốc S3 của LCDR3 được đột biến thành A;
 - l) gốc D4 của LCDR3 được đột biến thành N;
 - m) gốc S5 của LCDR3 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y; và
 - n) gốc I6 của LCDR3 được đột biến thành A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T, V.
- 3) Kháng thể theo phương án 1 hoặc 2, bao gồm HCDR1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), LCDR1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) và LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).
- 4) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-3, bao gồm
- a) VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66; hoặc
 - b) chuỗi nặng có SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 81.
- 5) Kháng thể đối kháng phân lập được liên kết đặc hiệu với CD154 (shCD154) người dạng tan có SEQ ID NO: 4.
- 6) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-5, bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc.
- 7) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-6, trong đó kháng thể không hoạt hóa tiểu cầu người.

- 8) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-7, trong đó kháng thể liên kết với shCD154 bằng hằng số phân ly K_D bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 5×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 5×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 sử dụng thiết kế thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, các số đo ái lực.
- 9) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-8, trong đó kháng thể ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian shCD154 với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng $7,0 \times 10^{-11}$ M đến khoảng 6×10^{-10} M.
- 10) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-9, trong đó kháng thể ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian shCD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.
- 11) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-10, trong đó kháng thể cạnh tranh để liên kết với shCD154 với kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm trình tự có SEQ ID NO: 59 và VL bao gồm trình tự có SEQ ID NO: 66.
- 12) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-11, trong đó kháng thể bao gồm các trình tự axit amin của vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) và 3 (HCDR3) của VH có SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64, tùy chọn có một, hai hoặc ba thay thế axit amin bảo thủ trong HCDR1, HCDR2 và/hoặc HCDR3, trong đó các HCDR được định nghĩa theo Kabat, Chothia hoặc IMGT.
- 13) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-12, trong đó kháng thể bao gồm các trình tự axit amin của vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) và 3 (LCDR3) của VL có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73, tùy chọn có một, hai hoặc ba thay thế axit amin bảo thủ trong LCDR1, LCDR2 và/hoặc LCDR3, trong đó các LCDR được định nghĩa theo Kabat, Chothia hoặc IMGT.
- 14) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-13, bao gồm các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có
 - a) các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29, và các điều hòa bảo thủ của chúng;

- b) các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và các điều hòa bảo thủ của chúng;
 - c) các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31, và các điều hòa bảo thủ của chúng;
 - d) các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - e) các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - f) các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34, và các điều hòa bảo thủ của chúng hoặc
 - g) các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35, và các điều hòa bảo thủ của chúng.
- 15) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-10 bao gồm các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2, và LCDR3 có
- a) các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51, và các điều hòa bảo thủ của chúng;
 - b) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52, và các điều hòa bảo thủ của chúng;
 - c) các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - d) các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - e) các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - f) các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - g) các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57, và các điều hòa bảo thủ của chúng
 - h) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52, và các điều hòa bảo thủ của chúng. hoặc
 - i) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52, và các điều hòa bảo thủ của chúng.
- 16) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-15 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có
- a) các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29;
 - b) các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30;
 - c) các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31;
 - d) các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32;
 - e) các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33;
 - f) các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34; hoặc
 - g) các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35.
- 17) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-16 bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3 có
- a) các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51;
 - b) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52;
 - c) các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53;
 - d) các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54;

- e) các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55;
 - f) các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56;
 - g) các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57;
 - h) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52; hoặc
 - i) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52.
- 18) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51.
 - 19) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52.
 - 20) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53.
 - 21) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54.
 - 22) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55.
 - 23) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56.
 - 24) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57.
 - 25) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52.
 - 26) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-17 bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52.

- 27) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-26, bao gồm VH đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VH có các SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 hoặc 64.
- 28) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-27, bao gồm VL đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với VL có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73.
- 29) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 58 và VL có SEQ ID NO: 65, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 30) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 31) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 60 và VL có SEQ ID NO: 67, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 32) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 61 và VL có SEQ ID NO: 68, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 33) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 62 và VL có SEQ ID NO: 69, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 34) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 63 và VL có SEQ ID NO: 70, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 35) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 64 và VL có SEQ ID NO: 71, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn

bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.

- 36) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 37) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-28 bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73, trong đó VH, VL hoặc cả VH và VL tùy chọn bao gồm một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai, mười ba, mười bốn hoặc mười lăm thay thế axit amin.
- 38) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-37, trong đó kháng thể bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc.
- 39) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-38, trong đó ít nhất một thay thế trong vùng Fc là các thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S và P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
- 40) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-38, trong đó ít nhất một thay thế trong vùng Fc là các thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
- 41) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-40, trong đó kháng thể bao gồm isotyp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.
- 42) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-41, trong đó tất cả gốc paratope kháng thể cư trú trong VH.
- 43) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-42, trong đó kháng thể liên kết đồng thời với monome CD154 thứ nhất và monome CD154 thứ hai trong trime CD154 người dạng tan.
- 44) Kháng thể theo phương án 43, trong đó kháng thể liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám gốc CD154 trong monome CD154 thứ nhất trong các gốc axit amin 182-207 của CD154 có SEQ ID NO: 1, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.
- 45) Kháng thể theo phương án 43 hoặc 44, trong đó kháng thể liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc tám gốc CD154 trong monome CD154 thứ hai trong

các gốc axit amin 176-253 của CD154 có SEQ ID NO: 1, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.

- 46) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 43-45, trong đó kháng thể liên kết với các gốc E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 và R207 trong monome CD154 thứ nhất, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.
- 47) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 43-46, trong đó kháng thể liên kết với các gốc T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 và F353 trong monome CD154 thứ hai, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.
- 48) Phân tử đặc hiệu đôi bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 liên kết với phân tử gắn kháng nguyên thứ hai có tính đặc hiệu liên kết khác.
- 49) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 hoặc phân tử đặc hiệu đôi theo điểm 48
 - a) không hoạt hóa các tiêu cầu người trong phức hợp miễn dịch với shCD154;
 - b) liên kết với shCD154 với hằng số phân ly K_D bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn;
 - c) ức chế tăng sinh tế bào B người qua trung gian shCD154; hoặc
 - d) ức chế hoạt tính sinh học của CD154 trong xét nghiệm gen chỉ thị NF- κ B-SEAP.
- 50) Thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 liên kết với tác nhân điều trị hoặc chất tạo ảnh.
- 51) Dược phẩm bao gồm kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 và chất mang dược dụng.
- 52) Polynucleotit mã hóa VH của kháng thể, VL của kháng thể hoặc VH của kháng thể và VL của kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47.
- 53) Vector bao gồm polynucleotit theo phương án 52.
- 54) Tế bào chủ bao gồm vector theo phương án 53.
- 55) Phương pháp tạo kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo phương án 54 trong các điều kiện mà trong đó kháng thể được biểu hiện, và bước thu hồi kháng thể được sản sinh từ tế bào chủ.

- 56) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 hoặc được phẩm theo phương án 51 để sử dụng trong điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm qua trung gian miễn dịch.
- 57) Phương pháp theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 để sử dụng trong điều trị viêm khớp, lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm ruột, cấy ghép, ghép thận, cấy ghép da, ghép tủy xương, bệnh mảng ghép chống lại ký chủ (GVHD), giảm tiểu cầu miễn dịch (ITP), xơ cứng rải rác, viêm tuyến giáp, tiểu đường loại I hoặc xơ vữa động mạch.
- 58) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 để sử dụng trong điều trị viêm khớp dạng thấp.
- 59) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 để sử dụng trong điều trị bệnh lupus.
- 60) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 để sử dụng trong điều trị cấy ghép.
- 61) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 để sử dụng trong điều trị bệnh viêm ruột.
- 62) Kháng thể theo phương án bất kỳ trong các phương án 1-47 để sử dụng theo phương án bất kỳ trong các phương án 56-61 kết hợp với tác nhân điều trị thứ hai.
- 63) Kháng thể theo phương án 62, trong đó tác nhân điều trị thứ hai là thuốc chống viêm không steroid (NSAID), salixylat, hydroxycycloquin, sulfasalazin, corticosteroid, thuốc gây độc tế bào, thuốc ức chế miễn dịch và/hoặc kháng thể.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể phân lập hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 người có SEQ ID NO: 1, bao gồm vùng xác định hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), vùng xác định hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) và LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

Sáng chế cũng đồng thời đề xuất kháng thể đối kháng phân lập được liên kết đặc hiệu với CD154 (shCD154) người dạng tan có SEQ ID NO: 4, bao gồm HCDR1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), LCDR1

có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) và LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

Trong một số phương án, kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.

Trong một số phương án, kháng thể liên kết với shCD154 bằng hằng số phân ly K_D bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 5×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 1×10^{-10} M hoặc nhỏ hơn, khoảng 5×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 sử dụng thiết kế thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, các số đo ái lực.

Trong một số phương án, kháng thể ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian shCD154 với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng $7,0 \times 10^{-11}$ M đến khoảng 6×10^{-10} M.

Trong một số phương án, kháng thể ức chế biểu hiện phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian shCD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

Trong một số phương án, kháng thể có isotyp IgG1, tùy chọn bao gồm các thay thế chuỗi nặng L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S và P331S so với IgG1 kiểu đại.

Trong một số phương án, kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66 và thuộc isotyp IgG1, tùy chọn bao gồm các thay thế chuỗi nặng L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S và P331S so với IgG1 kiểu đại.

Trong một số phương án, kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66 và thuộc isotyp IgG1/ κ , bao gồm các thay thế chuỗi nặng L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S và P331S so với IgG1 kiểu đại.

Trong một số phương án, kháng thể thuộc isotyp IgG2, tùy chọn bao gồm các thay thế chuỗi nặng V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S so với IgG2 kiểu đại.

Trong một số phương án, kháng thể bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66 và thuộc isotyp IgG2/ κ , bao gồm các thay thế chuỗi nặng V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S so với IgG2 kiểu đại.

Trong một số phương án, kháng thể bao gồm chuỗi nặng (HC) có SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ (LC) có SEQ ID NO: 81.

Trong một số phương án, kháng thể bao gồm chuỗi nặng (HC) có SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ (LC) có SEQ ID NO: 81.

Trong một số phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu đôi.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ, trong điều trị bệnh tự miễn.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị bệnh viêm qua trung gian miễn dịch.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị viêm khớp.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị lupus ban đỏ hệ thống.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị bệnh viêm ruột.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị cấy ghép.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị ghép thận.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị ghép da.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị ghép tủy xương.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị bệnh mảng ghép chống lại ký chủ.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị giảm tiêu cầu miễn dịch.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị xơ cứng rải rác.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị viêm tuyến giáp.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị tiểu đường loại I.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị xơ vữa động mạch.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị viêm khớp dạng thấp.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị bệnh Crohn.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị viêm loét đại tràng.

Kháng thể thích hợp để sử dụng trong liệu pháp điều trị, ví dụ trong điều trị bệnh viêm ruột, kết hợp với tác nhân điều trị thứ hai.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả theo các ví dụ cụ thể, không giới hạn sau đây.

Ví dụ 1. Nguyên vật liệu và phương pháp

Tạo các protein được sử dụng

Khi các tín hiệu CD154 nội sinh là trime, CD154 tái tổ hợp được biểu hiện theo nhiều cách để thu trime tái tổ hợp chức năng. CD154 người dạng tan (shCD154; SEQ ID NO: 4), CD154 *Callithrix jacchus* (khỉ đuôi sóc thông thường; sau đây gọi là khỉ đuôi sóc) dạng tan (smCD154; SEQ ID NO: 5) hoặc CD154 *Macaca fascicularis* (khỉ đuôi dài) dạng tan (scCD154; SEQ ID NO: 6) được tạo dòng và được biểu hiện dưới dạng dung hợp His6 (SEQ ID NO: 10) (shCD154-his, SEQ ID NO: 7; smCD154-his, SEQ ID NO: 8; scCD154-his, SEQ ID NO: 9) hoặc dưới dạng dung hợp với cấu trúc leuxin zipper (ILZ) (SEQ ID NO: 11) (shCD154-ILZ, SEQ ID NO: 12; smCD154-ILZ, SEQ ID NO: 13; scCD154-ILZ, SEQ ID NO: 14). Việc tạo dòng, biểu hiện và tinh chế protein được thực hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Cả hai sản phẩm dung hợp His và ILZ chủ yếu là trime. smCD154 và smCD154-ILZ đều được biotin hóa bằng cách sử dụng *EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin and Labeling Kit* (Thermo, mã loại 21327), sự biotin hóa thành công được phân tích bởi xét nghiệm HABA-avidin (Thermo, mã loại 46610) và Octet. Các tế bào biểu hiện CD40 người (SEQ ID NO: 15) được sử dụng trong một số xét nghiệm. Các tế bào D1.1 Jurkat (ATCC® CRL-10915™) biểu hiện nội sinh CD154 người được sử dụng trong một số xét nghiệm.

CD154 người; SEQ ID NO: 1

MIETYNQTSRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE
DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKK
ENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENG
KQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT
HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

CD154 khi đuôi sóc; SEQ ID NO: 2

MIETYNQPVPRSAATGPPVSMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKI
EDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEEKK
KENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLEN
GKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAAN
THSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

CD154 khi đuôi dài; SEQ ID NO: 3

MIETYNQPSRSAATGLPVRMKIFMYLLTIFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIE
DERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEEKKK
ENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENG
KQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT
HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

shCD154; SEQ ID NO: 4

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTV
KRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKP
CGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

smCD154; SEQ ID NO: 5

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTV
KRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKP
CGQQSIHLGGIFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

scCD154; SEQ ID NO: 6

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTV
KRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKP
CGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

shCD154 -his; SEQ ID NO: 7

GSHHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNN
LVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL
LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGL
LKL

smCD154 -his; SEQ ID NO: 8

GSHHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNN
LVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERIL
LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLL
KL

scCD154 -his; SEQ ID NO: 9

GSHHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNN
LVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL
LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGL
LKL

His6; SEQ ID NO: 10

HHHHHH

ILZ; SEQ ID NO: 11

RMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGER

shCD154 -ILZ; SEQ ID NO: 12

GSHHHHHHGGGSRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGD
QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY

YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIH
LGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

smCD154 -ILZ; SEQ ID NO: 13

GSHHHHHHGGGSRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKG
DQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQG
LYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQQ
SIHLGGIFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

scCD154 -ILZ; SEQ ID NO: 14

GSHHHHHHGGGSRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGD
QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY
YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIH
LGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

CD40 người; SEQ ID NO: 15

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCT
EFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT
CEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSA
FEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVC GPQDRLRALVVIPIIFGILFAILL
VLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLP GSNTAAPVQETLHGCQPVT
QEDGKESRISVQERQ

Đo lường ái lực

Đo lường ái lực bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được thực hiện bằng hệ thống ProteOn XPR36 (BioRad). Bề mặt bộ cảm biến sinh học được chuẩn bị bằng cách ghép đôi Fc kháng IgG người (Jackson cat#109-005-098) với bề mặt lớp polyme alginat được điều hòa của chip GLC (BioRad, Cat#176-5011) theo hướng dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép đôi amin. Khoảng 4700 RU (đơn vị đáp ứng) kháng thể thử nghiệm được cố định. Các thí nghiệm động học được thực hiện ở 25°C trong dung dịch đệm đang chảy (DPBS+polysorbat P20 0,03% + BSA 100 µg/ml). Để thực hiện thí nghiệm động học, 100 RU các kháng thể được thu nhận, sau đó tiêm chất phân

tích (shCD154-his và smCD154-his) với các nồng độ trong khoảng từ 0,391 nM đến 100 nM (trong dung dịch pha loãng tuần tự gấp 4 lần). Pha kết hợp được theo dõi trong 3 phút với lượng 50 μ L/phút, tiếp theo là 15 phút chảy dung dịch đệm (pha phân ly). Bề mặt chip được tái tạo với hai xung 18 giây của H_3PO_4 100 mM (Sigma, Cat#7961) với lượng 100 μ L/phút.

Dữ liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm ProteOn Manager. Trước tiên, dữ liệu được chỉnh sửa về nền bằng cách sử dụng các liên điểm. Sau đó, thực hiện trừ tham chiếu kép dữ liệu bằng cách tiêm dung dịch đệm để tiêm chất phân tích. Phân tích động học dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir 1:1.

Hoạt hóa tế bào Ramos cảm ứng bởi CD154

Khả năng của các kháng thể kháng CD154 trong việc ức chế sự hoạt hóa tế bào Ramos được đánh giá bằng cách sử dụng CD54 làm dấu ấn cho sự hoạt hóa tế bào. Các tế bào Ramos (tế bào ung thư hạch bạch huyết Burkitt, ATCC® CRL-1596™) được duy trì theo quy trình nhà cung cấp được gieo mầm vào đĩa có đáy hình chữ v 96 lỗ với $2,0 \times 10^5$ tế bào/lỗ trong môi trường tăng trưởng hoàn chỉnh với 100 μ L/lỗ. Các kháng thể thử nghiệm với các nồng độ 0,2, 2 hoặc 20 μ g/ml được ủ trước với smCD154 -his nồng độ 40 ng/ml trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (RT) và sau đó được thêm vào tế bào. Đĩa được phủ lại và ủ qua đêm (37°C, CO₂ 5%). Vào ngày hôm sau, đĩa xét nghiệm được quay xuống và môi trường xử lý đã sử dụng được loại bỏ. Các viên tế bào thu được được rửa với PBS/FBS 2% lạnh và sau đó các tế bào được nhuộm với kháng thể kháng CD54 (ICAM-1) được gắn nhãn PE hoặc isotyp đối chứng phù hợp trong 1 giờ ở 4°C. Các tế bào được rửa với PBS/FBS 2% lạnh, được tái huyền phù trong PBS/FBS 2% lạnh với thể tích 100 μ L/lỗ và tín hiệu huỳnh quang (kênh vàng) được đo trên tế bào kế dòng chảy. Các kháng thể được xác định là chất đối kháng khi chúng đáp ứng các tiêu chí: % hiệu lực liên quan đến kháng thể 5C8 > 5% hiệu lực 5C8, trong đó % hiệu lực chỉ phần trăm ức chế được chuẩn hóa liên quan đến 5C8 với nồng độ cao nhất được thử nghiệm.

Xét nghiệm gen chỉ thị NF- κ B-SEAP

Khả năng của các kháng thể kháng CD154 trong việc ức chế đường phát tín hiệu phía hạ nguồn CD40 cảm ứng bởi CD154 được đánh giá bằng cách sử dụng các tế bào CD40L HEK-Blue™ (Invivogen), được kiến tạo để biểu hiện CD40 người và được chuyển

nhằm với gen chỉ thị phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) nhờ trình tự khởi động có thể cảm ứng NF- κ B (trình tự khởi động tối thiểu IFN- β). Các tế bào được kích thích với CD154 người hoặc khỉ đuôi dài, hoặc với các tế bào Jurkat. Các tế bào CD40L HEK-Blue™ được duy trì theo quy trình của nhà cung cấp và tất cả xét nghiệm hoạt tính được thực hiện trong DMEM được bổ sung 10% huyết thanh thai bò bất hoạt do nhiệt và 1 lần Glutamax. Các tế bào được gieo mầm vào đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ với mật độ tế bào là 2,5 hoặc 5×10^4 tế bào mỗi lỗ trong thể tích 100 μ l và được ủ qua đêm (37°C, CO₂ 5%). Vào hôm sau, 4 X dung dịch shCD154-His hoặc shCD154-ILZ, hoặc các tế bào D1.1 Jurkat được ủ trước với 4 X dung dịch kháng thể kháng CD154 (với nồng độ phù hợp) với tỷ lệ 1:1 để thu được 2 X dung dịch hỗn hợp tiền phức hợp CD154:kháng thể. Hỗn hợp CD154:kháng thể được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, trong khi hỗn hợp D1.1 Jurkat:kháng thể đơn dòng được ủ ở 37°C và CO₂ 5% trong 1 giờ. Vào cuối khoảng thời gian ủ tiền phức hợp, 2 X dung dịch tiền phức hợp với thể tích 100 μ l/lỗ được cho vào đĩa xét nghiệm 96 lỗ chứa các tế bào CD40L HEK-Blue™; thể tích xét nghiệm cuối là 200 μ l/lỗ với các nồng độ CD154 cuối là 80 ng/ml shCD154-His, hoặc 40 ng/ml shCD154-ILZ, hoặc $2,5 - 6,0 \times 10^4$ tế bào D1.1 Jurkat. Sau 16-24 giờ xử lý (37°C, CO₂ 5%), các lớp bề mặt được phân tích về hoạt tính phosphatase (SEAP) bằng cách đo độ hấp thụ (650 nm) của lớp bề mặt với thể tích 40 μ l/lỗ đã được ủ với 160 μ l/lỗ QUANTI-Blue™ (Invivogen) ở 37°C trong 30-60 phút.

Xét nghiệm hoạt hóa tế bào tua qua trung gian tế bào Jurkat

Khả năng của các kháng thể kháng CD154 trong việc ức chế sự hoạt hóa DC qua trung gian tế bào Jurkat được đánh giá bằng cách đo mức giảm trong sản xuất các cytokin bởi DC. Bạch cầu đơn nhân người (Biologic Specialties) được nuôi cấy với IL-4 50 ng/ml và GM-CSF trong 6 ngày. Các tế bào được bổ sung môi trường mới (với IL-4 và GM-CSF) vào ngày 3. Các DC chưa trưởng thành (iDC) (CD1a⁺ CD14^{thấp} CD83⁻) được sử dụng trong các xét nghiệm tế bào vào ngày 6. $2,5 \times 10^5$ tế bào D1.1 Jurkat (được chiếu xạ ở 1000 rad) được ủ với kháng thể kháng CD154 nồng độ 0,000064-25 μ g/ml trong 15-20 phút, sau đó được đồng nuôi cấy với $2,5 \times 10^4$ iDC trong thể tích cuối là 200 μ l/lỗ trong đĩa đáy tròn 96 lỗ. Sau khi ủ 48 giờ, các lớp bề mặt được thu thập để phân tích cytokin.

Xét nghiệm hoạt hóa tế bào B qua trung gian tế bào Jurkat

Khả năng của các kháng thể kháng CD154 trong việc ức chế sự hoạt hóa tế bào B qua trung gian tế bào Jurkat được đánh giá bằng cách đánh giá tác động của các kháng thể đối với sự tăng sinh tế bào B. 1×10^5 tế bào D1.1 Jurkat (được chiếu xạ ở 5000 rad) được đồng nuôi cấy với các tế bào B amidan người với sự có mặt của IL-21 (100 ng/ml) và kháng thể kháng CD154 với nồng độ 0,0077 ng/ml-15 μ g/ml trong thể tích cuối là 200 μ l/lỗ trong đĩa đáy tròn 96 lỗ. Sau 2 ngày ủ, methyl (-3H)-thymidin (0,5 μ Ci/lỗ) được thêm vào dung dịch nuôi cấy và có thể xác định sự tăng sinh tế bào B người sau khi ủ qua đêm.

Xét nghiệm hoạt hóa tế bào B qua trung gian CD154

Khả năng của các kháng thể kháng CD154 trong việc ức chế sự hoạt hóa tế bào B qua trung gian CD154 được đánh giá ở các tế bào B người hoặc khỉ đuôi dài. 1×10^5 tế bào B amidan người hoặc tế bào lá lách của khỉ đuôi dài được nuôi cấy với rhIL-21 nồng độ 100 ng/ml, shCD154-ILZ nồng độ 0,5 μ g/ml, và kháng thể kháng CD154 nồng độ 0,0077 ng/ml-15 μ g/ml trong thể tích cuối là 200 μ l/lỗ trong đĩa đáy tròn 96 lỗ. Sau 2 ngày ủ, methyl (-3H)-thymidin (0,5 μ Ci/lỗ) được thêm vào dung dịch nuôi cấy và có thể xác định sự tăng sinh tế bào B người sau khi ủ qua đêm.

Ví dụ 2. Phân lập các kháng thể kháng CD154 từ các thư viện biểu hiện trên thực khuẩn

Các Fab liên kết với CD154 được chọn từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn pIX *de novo* (mới) được mô tả trong Shi và cộng sự, J Mol Biol (Tạp chí sinh học phân tử) 397:385-96, 2010; Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2009/085462; Công bố đơn sáng chế Hoa Kỳ số US2010/0021477). Mô tả ngắn gọn, các thư viện đã được tạo bằng cách đa dạng hóa giàn giáo sinh học ở người, trong đó gen VH dòng mầm (germline) IGHV1-69*01, IGHV3-23*01, và IGHV5-51*01 đã được tái tổ hợp với gen nhỏ IGKJ-4 người qua vòng H3, và gen VLkappa dòng mầm người O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01), và B3 (IGKV4-1*01) đã được tái tổ hợp với gen nhỏ IGKJ-1 để tập hợp thành các miền VH và VL hoàn chỉnh. Các vị trí trong các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ xung quanh các vòng H1, H2, L1, L2 và L3 tương ứng với các vị trí được xác định là thường xuyên tiếp xúc với các kháng nguyên peptit và protein đã được chọn để đa dạng hóa. Tính đa dạng trình tự ở các vị trí được chọn đã được giới hạn trong các gốc xuất hiện tại mỗi vị trí trong họ

gen dòng mầm IGHV hoặc TGLV của các gen IGHV hoặc IGLV tương ứng. Tính đa dạng ở vòng H3 đã được tạo bằng cách sử dụng các vòng tổng hợp cờ ngăn đến cờ trung có chiều dài 7-14 axit amin. Phân bố axit amin tại H3 đã được thiết kế để mô phỏng biến thể axit amin quan sát được ở kháng thể người. Thiết kế thư viện được mô tả chi tiết trong Shi và cộng sự, J Mol Biol (Tạp chí sinh học phân tử) 397:385-96, 2010. Giàn giáo sinh học được sử dụng để tạo thư viện được đặt tên theo gốc gen dòng mầm VH và VL người của chúng. Ba thư viện chuỗi nặng đã được kết hợp với bốn chuỗi nhẹ dòng mầm hoặc thư viện chuỗi nhẹ dòng mầm để tạo 12 tổ hợp VH:VL duy nhất cho các thử nghiệm sàng lọc đối với smCD154 hoặc các tế bào biểu hiện CD154 khi đuôi dài đầy đủ chiều dài.

Các thư viện được sàng lọc đối với CD154 khi đuôi dài đầy đủ chiều dài (SEQ ID NO: 3) được biểu hiện ổn định trong các tế bào CHO-s hoặc smCD154 được biotin hóa và không được biotin hóa (SEQ ID NO: 5). Sau một số vòng sàng lọc, xét nghiệm ELISA với thực khuẩn đa dòng sử dụng smCD154 làm kháng nguyên được thực hiện để phát hiện sự làm giàu đặc hiệu của từng thử nghiệm sàng lọc. Thực khuẩn thu được từ các thử nghiệm sàng lọc này, các thí nghiệm cho thấy sự làm giàu chất kết dính với smCD154, được sàng lọc thêm bằng xét nghiệm ELISA Fab đơn dòng trong đó các protein Fab được biểu hiện từ các dòng Fab riêng biệt được sử dụng làm chất kết dính với smCD154 không được biotin hóa được cho trực tiếp vào đĩa. Các dòng Fab với tín hiệu liên kết cao hơn gấp bốn lần so với các Fab đối chứng âm được chọn để sàng lọc theo dạng IgG đầy đủ. Các Fab được chọn được tạo dòng thành khung IgG2sigma/kappa và được đặc trưng hóa thêm để sử dụng cho liên kết với các tế bào D1.1 Jurkat. IgG2sigma là Fc bất hoạt và có các thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S so với IgG2 kiểu đại. IgG2sigma được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 8,961,967.

Ví dụ 3. Tạo các kháng thể kháng CD154 ở chuột

Các kháng thể kháng CD154 được tạo bằng cách sử dụng chuột biến đổi gen biểu hiện lôcut globulin miễn dịch người, OmniRat®; OMT, Inc. Lôcut globulin miễn dịch nội sinh OmniRat® được thay thế bởi lôcut Igκ và Igλ người và lôcut IgH người/chuột tổng hợp với các đoạn V, D và J có nguồn gốc là người liên kết với lôcut C_H chuột. Lôcut IgH chứa 22 V_H người, tất cả đoạn D và J_H người trong cấu hình tự nhiên liên kết với lôcut

C_H chuột. Việc tạo và đặc trưng hóa OmniRat® được mô tả trong Osborn, và cộng sự J Immunol (Tạp chí miễn dịch học) 190: 1481-1490, 2013; và Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2014/093908.

OmniRat® được tạo miễn dịch với smCD154 bằng quy trình tạo miễn dịch lặp lại ở nhiều điểm (RIMMS). Tiếp theo chế độ tạo miễn dịch 45 ngày, các hạch bạch huyết được thu thập từ bốn con chuột và được sử dụng để tạo tế bào lai. Các lớp bề mặt của tế bào lai trong các đĩa 96 lỗ được sàng lọc qua xét nghiệm ELISA về liên kết để nhận dạng các kháng thể đơn dòng biểu hiện sự liên kết với smCD154, mà từ đó các lớp bề mặt tế bào lai biểu hiện tín hiệu xét nghiệm lớn hơn gấp 3 lần giá trị trung bình đối chứng âm được chọn.

Các kháng thể được chọn được tạo dòng thành IgG2sigma/λ có độ dài đầy đủ. Các kháng thể thể hiện hoạt tính đối kháng trong hoạt hóa tế bào Ramos cảm ứng bởi CD154 được chọn để tiếp tục đặc trưng hóa.

Ví dụ 4. Đặc trưng hóa các kháng thể

Một số kháng thể kháng CD154 thu được từ thư viện biểu hiện trên thực khuẩn hoặc động vật biến đổi gen biểu hiện lôcut globulin miễn dịch người thể hiện hoạt tính đối kháng theo mô tả trong Ví dụ 2 và 3 được giải trình tự và còn được đặc trưng hóa về sự liên kết của chúng với các tế bào tua người và khỉ, về khả năng ức chế các chức năng tế bào B và tế bào tua người và khỉ, và về các chức năng thực thi của kháng thể. Các vùng VH và VL của các kháng thể được giải trình tự bằng các phương pháp tiêu chuẩn.

Bảng 2 trình bày các trình tự axit amin của HCDR1 của các kháng thể được chọn.

Bảng 3 trình bày các trình tự axit amin của HCDR2 của các kháng thể được chọn.

Bảng 4 trình bày các trình tự axit amin của HCDR3 của các kháng thể được chọn.

Bảng 5 trình bày các trình tự axit amin của LCDR1 của các kháng thể được chọn.

Bảng 6 trình bày các trình tự axit amin của LCDR2 của các kháng thể được chọn.

Bảng 7 trình bày các trình tự axit amin của LCDR3 của các kháng thể được chọn.

Bảng 8 trình bày các trình tự axit amin của VH của các kháng thể được chọn.

Bảng 9 trình bày các trình tự axit amin của VL của các kháng thể được chọn.

Bảng 2.

	HCDR1
--	-------

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	SYAIS	16
C4LB89	SYGIS	17
C4LB94	SYAIS	16
C4LB150	SYSFYWG	18
C4LB189	AYYIH	19
C4LB191	DYYIH	20
C4LB199	SFIYYWG	21

Bảng 3.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	HCDR2	
	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	GIPIFGTANYAQKFQG	22
C4LB89	WISPIFGNTNYAQKFQG	23
C4LB94	GISPYFGNTNYAQKFQG	24
C4LB150	SLYYSGSTYYNPSLKS	25
C4LB189	RINPDSSGGTDYAQRFGG	26
C4LB191	RFNPNSGDTNGAQKFQG	27
C4LB199	CIYSSGGTYYNPSLKS	28

Bảng 4.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	HCDR3	
	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	GASVWDGPAEVFDY	29
C4LB89	SRYYGDLDY	30
C4LB94	DTGWVGAFYLDY	31
C4LB150	LQLGTTTDYFDH	32
C4LB189	DWNYYDGSGYFGPGYYGLDV	33
C4LB191	EGELAGIFFDY	34
C4LB199	LWLGTTTDYFDY	35

Bảng 5.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	LCDR1	
	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	KSSQSVLASSNNENFLA	36
C4LB89	RASQSISSYLN	37
C4LB94	KSSQSVLYSSNNKNYLA	38
C4LB150	SGDELGDKFAC	39
C4LB189	SGDKLGDKYVC	40
C4LB191	SGDKLGDKYVS	41
C4LB199	SGDKLGDKFAC	42

Bảng 6.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	LCDR2	
	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	SASTRES	43
C4LB89	YANSLQS	44
C4LB94	WASTRES	45
C4LB150	QENKRPS	46
C4LB189	QDRKRPS	47
C4LB191	QDRKRPS	47
C4LB199	QDDKRPS	48

Bảng 7.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	LCDR3	
	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	QQAYTTPFT	51
C4LB89	QQSDSIPWT	52
C4LB94	QQYYSTPLT	53
C4LB150	QAWDSDTAV	54
C4LB189	QAWDSGTVV	55
C4LB191	QAWDSSTVV	56
C4LB199	QAWDSNTVV	57

Bảng 8.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	Tên VH	VH	
		Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	C4LH12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG GTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPI FGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGASVWDGPA EVFDYWGQGTLVTVSS	58
C4LB89	C4LH165	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG GTFSSY GISWVRQAPGQGLEWMGWIS PIFGNTNYA QKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARSRYYGDL YWGQGTLVTVSS	59
C4LB94	C4LH99	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG GTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGISP YFGNTNYA QKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARDTGWVGAF YLDYWGQGTLVTVSS	60
C4LB150	C4LH201	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGS ISSYSFYWG WIRQPPGQGLEWIGSLYY SGSTYYNPSLKS RATMSVVT SKTQFSL NLNSVTAADTAVYYCARLQLGTTTDY FDHWGQGTLVTVSS	61
C4LB189	C4LH240	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASG YTF AAYYIHWVRQAPGQGLEWMGRIN PDSGGTDYAQR FQGRVTMTRDTSISTA YMELSR LRSDDTAVFYCARDWNYYD GSGYFGPGYYGLDVWGQGTTTVTVSS	62
C4LB191	C4LH242	QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSKASG YTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWVGRFN PNSGDTNGA QKFQGRVTMTRDTSISTA YMELTRLRSDDTAVYHCAREGELAGIF FDYWGQGTLVTVSS	63
C4LB199	C4LH250	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGD SISSFIYYWG WIRQPPGKGLDWVGC IYS SGGTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLK LPSVTAADTAVYYCARLWLGT TTDYF DYWGQGTLVTVSS	64

Bảng 9.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	VL	VL	
		Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB5	C4LL8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLASSNNENFLAWYQQKPGQPP KLLIYSASTRSGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQQAYTTP FTFGQGTKVEIK	65
C4LB89	C4LL49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYA NSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSDSIPWTFGQGTK VEIK	66
C4LB94	PH9L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYST PLTFGQGTKVEIK	67
C4LB150	C4LL82	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDE LGDKFACWYQQKPGQSPVLVIWQE NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSDTAVFGGG TKLTVL	68
C4LB189	C4LL11 6	SYELTQPPSVSVSPGQTASVTCSGDK LGDKYVCWYQRKPGQSPVLVIYQD RKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAIDEADYYCQAWDSGTVVFGGRGT KLTVL	69
C4LB191	IAPL39	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDK LGDKYVSWNHQKPGQSPVLVIYQD RKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGG TKLTVL	70
C4LB199	C4LL12 5	SYELTQPPSVSVSPGQTVSITCSGDK LGDKFACWYQQKPGQSPVVVIYQD DKRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSNTVVFGGG TKLTVL	71

Các kháng thể ức chế chức năng của cả CD154 nội sinh được cung cấp trên các tế bào Jurkat (các tế bào D1.1 Jurkat trong Bảng 10) và trime CD154 người được biểu hiện tái tổ hợp (được biểu hiện dưới dạng shCD154-ILZ hoặc shCD154-his) như được đo bằng xét nghiệm gen chỉ thị SEAP NF- κ B. Các kháng thể đã ức chế việc phát tín hiệu với các giá

trị IC_{50} trong khoảng từ 0,08-21,15 nM. Các giá trị IC_{50} cho các kháng thể được chọn trong xét nghiệm được trình bày trong Bảng 10. Khoảng gồm các giá trị IC_{50} trong bảng cho mỗi kháng thể thể hiện giá trị IC_{50} thấp nhất và cao nhất thu được từ các thí nghiệm riêng rẽ, đồng thời giá trị đơn cho biết kháng thể được thử nghiệm trong một thí nghiệm, hoặc chỉ có một giá trị IC_{50} hợp lệ.

Bảng 10.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	Xét nghiệm gen chỉ thị SEAP NF- κ B; IC_{50} (nM)		
	D1.1. Jurkat*	shCD154-ILZ*	shCD154-his*
C4LB5	1,55	0,54	1,03-1,37
C4LB89	0,08-0,32	1,91-2,44	3,93-5,69
C4LB94	0,13	4,37	7,57-21,15
C4LB150	3,57	4,95	8,87-9,81
C4LB189	2,06	1,63	6,51-13,60
C4LB191			2,19-3,46
C4LB199	1,21	1,09	2,00-2,70
*Dạng mẫu CD154 được sử dụng để cảm ứng việc phát tín hiệu			

Khả năng của các kháng thể trong việc ức chế sự hoạt hóa tế bào tua được đánh giá bằng cách sử dụng sự tiết IL-12p40 làm dấu ấn cho sự hoạt hóa DC. Các kháng thể ức chế sự hoạt hóa DC được cảm ứng bởi CD154 nội sinh được cung cấp trên các tế bào Jurkat với các giá trị IC_{50} trong khoảng từ 0,02 đến 0,49 nM. Bảng 11 trình bày các giá trị IC_{50} cho các kháng thể được chọn trong xét nghiệm. Khoảng giá trị IC_{50} trong Bảng thể hiện giá trị IC_{50} thấp nhất và cao nhất thu được trong các thí nghiệm riêng rẽ ở 2-4 đối tượng cho với 1-6 lần lặp lại.

Bảng 11.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	Xét nghiệm hoạt hóa tế bào tua qua trung gian tế bào Jurkat; IC_{50} (nM)
C4LB5	0,32-0,49
C4LB89	0,02-0,09
C4LB94	0,07-0,09

C4LB150	0,25-0,30
C4LB189	0,15-0,16
C4LB191	0,38-0,39
C4LB199	0,19-0,20

Khả năng của các kháng thể trong việc ức chế sự hoạt hóa tế bào B người hoặc khỉ được đo bằng cách sử dụng sự tăng sinh tế bào B làm chỉ báo. Các kháng thể ức chế sự tăng sinh cảm ứng bởi cả CD154 nội sinh (các tế bào D1.1 Jurkat) và trime CD154 người tái tổ hợp (shCD154-ILZ) với các giá trị IC_{50} trong khoảng từ 0,01-5,35 nM. Bảng 12 trình bày các giá trị IC_{50} cho các kháng thể khác nhau thu được trong xét nghiệm hoạt hóa tế bào B người hoặc khỉ. Khoảng giá trị IC_{50} trong bảng thể hiện giá trị IC_{50} thấp nhất và cao nhất thu được trong các thí nghiệm riêng rẽ ở 2-4 đối tượng cho với 1-6 lần lặp lại. Giá trị IC_{50} đơn trong Bảng biểu thị việc có một giá trị IC_{50} hợp lệ.

Bảng 12.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	Xét nghiệm hoạt hóa tế bào B; IC_{50} (nM)		
	Các tế bào D1.1 Jurkat/ các tế bào B người*	shCD154-ILZ/ các tế bào B người*	shCD154-ILZ/ tế bào B khỉ*
C4LB5	0,19-0,28	2,74	5,35
C4LB89	0,01-0,02	0,20-0,48	0,13-0,44
C4LB94	0,01-0,03	0,07-0,14	0,30-0,31
C4LB150	0,27-0,31	nd	1,14-2,00
C4LB189	0,47-0,65	nd	4,35-5,16
C4LB191	0,64-1,00	nd	0,25-0,36
C4LB199	0,04-0,27	nd	1,89-2,31
nd: không thực hiện			
*Dạng mẫu CD154 được sử dụng để cảm ứng việc phát tín hiệu/ nguồn tế bào B			

Ví dụ 5. Kiến tạo kháng thể để giảm thiểu rủi ro điều hòa sau dịch mã

VL của kháng thể C4LB89 chứa điểm khử amin giả định trong LCDR2 (N52-S53 trong chuỗi nhẹ C4LL49, SEQ ID NO: 66). Các thay thế được thực hiện riêng cho mỗi vị trí (N52S và S53T) trong VL. Các chuỗi nhẹ đột biến được đồng biểu hiện với

chuỗi nặng mẹ C4LH165 (SEQ ID NO: 59) để tạo các kháng thể C4LB235 và C4LB236 dưới dạng IgG2sigma/κ. Các trình tự axit amin của LCDR2 và VL của C4LB235 và C4LB236 lần lượt được trình bày trong Bảng 13 và Bảng 14. C4LB235 bao gồm các HCDR có các SEQ ID NO: 17, 23 và 30, các LCDR có các SEQ ID NO: 37, 49 và 52, VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72. C4LB236 bao gồm các HCDR có các SEQ ID NO: 17, 23 và 30, các LCDR có các SEQ ID NO: 37, 50 và 52, VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73.

Bảng 13.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	LCDR2	
	Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB235	YASSLQS	49
C4LB236	YANTLQS	50

Bảng 14.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	VL	VL	
		Trình tự	SEQ ID NO:
C4LB235	C4LL160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYYASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSDSIPWTFGQGTKVEIK	72
C4LB236	C4LL161	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYYANTLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSDSIPWTFGQGTKVEIK	73

Cả hai kháng thể được thử nghiệm về khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào B khi đuôi dài. C4LB23 cho thấy hiệu lực tương tự như C4LB89, trong khi C4LB236 thể hiện hiệu lực giảm so với C4LB89.

Ví dụ 6. Các kháng thể kháng CD154 làm bất hoạt chức năng thực thi không cảm ứng sự hoạt hóa tiểu cầu

Các kháng thể kháng CD154 đã được phát triển trong các điều kiện lâm sàng với các kết quả tích cực ở những bệnh nhân bị bệnh tự miễn, tuy nhiên, do các sự cố về huyết khối thuyên tắc (TE), việc tiếp tục phát triển lâm sàng các kháng thể đã tạm dừng. Kháng thể 5c8 nhân hóa (IgG1/ κ) là kháng thể kháng CD154 mà trong điều kiện lâm sàng đã cảm ứng TE (Yazdany và cộng sự, *Lupus* 13:377-380, 2004). Giả thuyết rằng huyết khối thuyên tắc (TE) qua trung gian 5c8 nhân hóa là kết quả của sự hoạt hóa và kết tụ tiểu cầu từ sự hình thành các phức hợp miễn dịch (IC) kháng CD154/CD154 bậc cao liên kết chéo các tiểu cầu bằng cách liên kết Fc với thụ thể Fc γ RIIa tiểu cầu. Trong ống nghiệm, kháng thể 5c8 được kiến tạo với Fc bất hoạt (thay thế D265A trong IgG1) thiếu liên kết thụ thể Fc γ RIIa đã không hoạt hóa các tiểu cầu (Xie và cộng sự, *J Immunol* (Tập chí miễn dịch học) 192:4083-4092, 2014).

Theo đó, các kháng thể kháng CD154 với liên kết bị hủy bỏ với ít nhất Fc γ RIIa và có các chức năng thực thi bị giảm có thể phù hợp hơn khi làm thuốc điều trị, giảm rủi ro về TE.

Để đạt được điều đó, các kháng thể kháng CD154 làm bất hoạt chức năng thực thi được tạo với các thay thế Fc khác nhau và được thử nghiệm về tác động đối với sự hoạt hóa tiểu cầu.

VH và VL của kháng thể 5c8 nhân hóa (Karpusas và cộng sự, cấu trúc 9: 321-329, 2001) được tạo dòng thành IgG1sigma/ κ , IgG1sigmaYTE/ κ , IgG2sigma/ κ hoặc IgG2sigmaYTE/ κ để đánh giá sự tác động của Fc đối với sự hoạt hóa tiểu cầu; các kháng thể thu được là 5c8IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma và 5c8IgG2sigmaYTE). IgG1sigma có các thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S, và P331S so với IgG1 kiểu đại. IgG1sigmaYTE có các thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E H268A, A330S và P331S. IgG2sigma có các thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S. IgG2sigmaYTE có các thay thế V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S và P331S. Việc đánh số gốc tuân theo chỉ số châu Âu. Các kháng thể với khung IgG2sigma thiếu chức năng thực thi và liên kết với Fc γ R theo mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 8,961,967. Thay thế YTE (M252Y, S254T, T256E)

được mô tả trong Dall'Acqua và cộng sự, J Biol Chem (Tập chí Sinh hóa học) 281:23514–24, 2006.

Các miền VH và VL của 5c8 nhân hóa được trình bày theo các SEQ ID NO: lần lượt là 74 và 75.

SEQ ID NO: 74

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYWVKQAPGQGLEWIGEI
NPSNGDTNFNEKFKSKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRS DGRN
DMDSWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 75

DIVLTQSPATLSVSPGERATISCRASQRVSSSTYSYMHWYQQKPGQPPKLLIK
YASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISVPEPDFATYYCQHSWEIPPTFGGGTK
LEIK

5c8IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma và 5c8IgG2sigmaYTE được thử nghiệm về tác động của chúng đối với sự hoạt hóa tiểu cầu.

Máu từ những người cho khỏe mạnh, được sàng lọc trước về đáp ứng thấp với chỉ riêng shCD154, được sử dụng. Sự hoạt hóa tiểu cầu được đánh giá bằng phương pháp đếm và đo tế bào theo dòng (flow cytometry) sử dụng các dấu ấn hoạt hóa tiểu cầu PAC-1 được xác nhận (GPIIb/IIIa được hoạt hóa) và CD62p (P-selectin). Mô tả ngắn gọn, máu toàn phần (WB) được thêm vào dung dịch đệm Tyrodes-HEPES được điều hòa chứa CaCl_2 1 mM, và các kháng thể kháng PAC1 và kháng CD62p có hoặc không có kháng thể ức chế $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ (dòng IV.3, StemCell Technologies #60012) được thêm vào hỗn hợp và được ủ trong 25 phút. Các phức hợp miễn dịch được tạo trước của CD154 tan (PeproTech, cat #310-02; SEQ ID NO: 4 hoặc Tonbo Biosciences, cat#21-7088) /kháng thể có tỷ lệ mol CD154:kháng CD154 là 3:1 được thêm vào hỗn hợp và được ủ thêm 20 phút nữa; các tiểu cầu được cố định trong formalin 1%, sau đó được phân tích FACS. Sự hoạt hóa tiểu cầu cho từng điều kiện được đánh giá theo % các tiểu cầu bị chặn (các trường hợp dương tính với CD61) biểu hiện PAC-1 và CD62p; thu được và phân tích 5000 trường hợp biểu hiện CD61 (các tiểu cầu) cho từng điều kiện điều trị. Các kết quả của thí nghiệm được trình bày trong Hình 1. IC CD154/5c8IgG1 (IgG1 kiểu đại) hoạt hóa các tiểu cầu, trong khi IC CD154

với 5c8-IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma và 5c8IgG2sigma-YTE không hoạt hóa các tiểu cầu. Sự hoạt hóa tiểu cầu với ADP không bị ức chế bởi các phức hợp miễn dịch (dữ liệu không được trình bày). Không có kháng thể riêng nào hoạt hóa các tiểu cầu (dữ liệu không được trình bày).

Các kháng thể kháng CD154 C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199 (tất cả kháng thể đơn dòng làm bất hoạt chức năng thực thi IgG2sigma) cũng được thử nghiệm trong xét nghiệm hoạt hóa tiểu cầu để xác nhận các kháng thể đã hủy bỏ liên kết với FcγRIIa và không hoạt hóa các tiểu cầu. Hình 2 trình bày các kết quả của thí nghiệm, chứng minh rằng các phức hợp miễn dịch của CD154 trong phức hợp với C4LB5, C4LB89, C4LB150, C4LB189, C4LB191 hoặc C4LB199 đã không thể hoạt hóa các tiểu cầu. IC CD154/ C4LB94 cảm ứng PAC-1 trên các tiểu cầu. Các kết quả chứng minh rằng các kháng thể kháng CD154 với các isotyp IgG1sigma, IgG1sigmaYTE, IgG2sigma hoặc IgG2sigmaYTE nói chung có thể không hoạt hóa các tiểu cầu, và vì vậy có thể có mức an toàn được cải thiện so với các kháng thể trên IgG1 kiểu đại.

Ví dụ 7. Tác động của isotyp làm chuyển đổi các đặc tính của kháng thể

Các vùng biến đổi của kháng thể C4LB89 được tạo dòng thành các isotyp IgG1sigma/κ và IgG1sigmaYTE để đánh giá sự khác biệt có thể có về chức năng và khả năng phát triển. Các kháng thể mới được gọi là C4LB231 (IgG1sigma) và C4LB232 (IgG1sigmaYTE).

Các kháng thể IgG1sigma và IgG1sigmaYTE tạo thành được so sánh với kháng thể mẹ về chức năng. C4LB231 và C4LB232 tương đương về chức năng so với C4LB89 mẹ. Bảng 15 trình bày các giá trị IC₅₀ hoặc khoảng giá trị IC₅₀ cho từng kháng thể trong các xét nghiệm chức năng như đã nêu trong Bảng. Khoảng giá trị IC₅₀ trong bảng thể hiện giá trị IC₅₀ thấp nhất và cao nhất thu được trong các thí nghiệm ở 2-4 đối tượng cho với 1-6 lần lặp lại. Giá trị IC₅₀ đơn trong bảng chỉ báo việc có một giá trị IC₅₀ hợp lệ.

Bảng 15.

Thí nghiệm	Dạng mẫu CD154 được sử dụng để cảm ứng việc phát tín hiệu	mAb (kháng thể đơn dòng)	
		C4LB231	C4LB232

Xét nghiệm gen chỉ thị SEAP NF- κ B; IC ₅₀ (nM)	D1.1 Jurkat		0,27
Xét nghiệm gen chỉ thị SEAP NF- κ B; IC ₅₀ (nM)	shCD154-ILZ	1,21	1,25-1,45
Xét nghiệm gen chỉ thị SEAP NF- κ B; IC ₅₀ (nM)	shCD154-his	2,15	1,77-1,99
Xét nghiệm hoạt hóa tế bào tua qua trung gian tế bào Jurkat; IL-12p40 IC ₅₀ (nM)	D1.1 Jurkat	0,02-0,04	0,03-0,03
Tăng sinh tế bào B người IC ₅₀ (nM)	D1.1 Jurkat	0,01-0,01	0,01-0,01
Tăng sinh tế bào B người IC ₅₀ (nM)	shCD154-ILZ	0,38-0,67	0,42-0,74
Tăng sinh tế bào B khi đuôi dài IC ₅₀ (nM)	shCD154-ILZ	0,25-0,55	0,20-0,55

C4LB231 và C4LB232 cũng được thử nghiệm về sự tác động của chúng đối với tiểu cầu. Cả IC shCD154:C4LB231 lẫn IC shCD154:C4LB232 đều không hoạt hóa các tiểu cầu trong thời điểm khởi điểm. IC CD154/5c8IgG1 hoạt hóa các tiểu cầu, và sự hoạt hóa bị ức chế khi có mặt IV.3, cho thấy rằng sự hoạt hóa tiểu cầu diễn ra qua trung gian liên kết IC với Fc γ RIIa. Hình 3 trình bày các kết quả của thí nghiệm.

Ví dụ 8. Các kháng thể kháng CD154 liên kết với CD154 người bằng ái lực cao

Đo lường ái lực được thực hiện bằng ProteOn như đã mô tả trong Ví dụ 1. Tốc độ kết hợp, tốc độ phân ly và ái lực được trình bày trong Bảng 16. Các thông số được báo cáo trong bảng này thu được từ mô hình liên kết Langmuir 1:1 cho tất cả mẫu, ngoại trừ C4LB94 và C4LB150 phù hợp với mô hình liên kết hai tình trạng.

Bảng 16.

Mẫu	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
C4LB5	5,70E+05	1,78E-04	3,12E-10
C4LB89	1,61E+06	3,80E-04	2,35E-10
C4LB94	1,58E+06	3,29E-03	2,09E-09
C4LB150	2,27E+06	6,17E-03	2,72E-09
C4LB189	3,55E+05	2,06E-04	5,81E-10
C4LB191	5,62E+06	1,76E-04	3,13E-11

C4LB199	1,60E+06	4,04E-04	2,53E-10
---------	----------	----------	----------

Ví dụ 9. Cấu trúc tinh thể của CD154 khi đuôi sóc trong phức hợp với C4LB89

Epitope của kháng thể C4LB89 được xác định bằng cách sử dụng tinh thể học tia X. Mảnh Fab gắn His (His-tag) của C4LB89 và dạng tan gắn His của CD40L khi đuôi sóc (smCD154-his) được biểu hiện trong tế bào HEK293 GnTI và được tinh chế bằng ái lực và phép sắc ký theo loại kích cỡ. Phức hợp smCD154:C4LB89 được ủ qua đêm ở 4°C, được cô đặc, và tách ra khỏi các loại không được tạo phức bằng phép sắc ký theo loại kích cỡ. Phức hợp được kết tinh bằng phương pháp khuếch tán hơi nước từ dung dịch chứa PEG 3350 16%, amoni axetat 0,2 M, MES 0,1 M, pH 6,5. Tinh thể thuộc nhóm không gian hình khối P₂₁3 có kích thước ô đơn vị là 162,1 Å. Cấu trúc của phức hợp được xác định bằng phương pháp thay thế phân tử sử dụng cấu trúc tinh thể của C4LB89 Fab và CD40L (mục nhập PDB 1ALY) làm mô hình tìm kiếm.

Phức hợp smCD154:C4LB89 là trimer đối xứng trên trục bậc 3 tinh thể học. C4LB89 liên kết với mCD154 tại giao diện giữa hai tiểu phần về phía xa epitope tính từ bề mặt tế bào. Epitope bao gồm 16 gốc, 8 gốc cho mỗi tiểu phần trong hai tiểu phần CD154. Các gốc epitope là E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 và R207 trong tiểu phần CD154 thứ nhất và T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 và F253 trong tiểu phần CD154 thứ hai. Việc đánh số gốc epitope tuân theo CD154 đầy đủ chiều dài ở người có SEQ ID NO: 1. Paratope được xác định là các gốc kháng thể nằm trong khoảng 4 Å từ các gốc CD154. Paratope C4LB89 bao gồm 9 gốc từ chuỗi nặng của C4LB89: S31 và Y32 từ HCDR1, S52, I54, F55 và N57 từ HCDR2 và R100, Y101 và Y102 từ HCDR3. Việc đánh số gốc paratope tuân theo VH của C4LB89 có SEQ ID NO: 59. Chuỗi nhẹ không liên quan đến các tiếp xúc với mCD154. Dựa trên số lần tiếp xúc, F55 trong HCDR2 là yếu tố nhận dạng kháng nguyên chính. F55 tiếp xúc với các gốc CD154 đó là T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 và F253. Các gốc HCDR3 là Y101 và Y102 cũng góp phần vào sự liên kết. Hình 4 minh họa các gốc tiếp xúc của HCDR2 và HCDR3 và sự thiếu liên kết của LC với CD154. Hình 5 minh họa các gốc epitope và paratope.

Các protein CD154 người và khi đuôi sóc dạng tan chỉ khác nhau 8 gốc axit amin. Tất cả các gốc epitope của C4LB89 của mCD154 được bảo toàn ở người. Do đó, dự kiến epitope được bảo toàn trong CD154 ở khi đuôi sóc và người. Việc bắt cặp các protein CD154 đầy đủ chiều dài ở người và khi đuôi sóc được minh họa trong Hình 6.

Ví dụ 10. Việc hoạt hoá tiểu cầu bởi các kháng thể kháng CD154 phụ thuộc epitope

Vùng biến đổi C4LB89 (VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66) được tạo dòng thành IgG1/ κ , tạo nên kháng thể C4LB237. C4LB237 được xác nhận giữ lại tính liên kết với CD154 người (Bảng 17) như được đo bằng ProteOn theo mô tả trong Ví dụ 1. Ái lực của C4LB237 với CD154 người là $23,6 \pm 5,4$ pM. Việc chuyển đổi isotyp của VH/VL có nguồn gốc từ C4LB89 từ IgG2sigma đến IgG1 có vẻ làm thay đổi ái lực liên kết của kháng thể tạo thành.

Như dự kiến, C4LB237 liên kết với Fc γ RIIa và Fc γ RIIIa người bằng K_D lần lượt là $0,994 \mu\text{M}$ và $0,146 \mu\text{M}$. C4LB237 thể hiện hiệu lực tương đương với C4LB231 và thể hiện hiệu lực cao hơn C4LB89 trong xét nghiệm gen chỉ thị SEAP NF- κ B khi shCD154-his được sử dụng để cảm ứng phát tín hiệu (Bảng 18).

C4LB237 được thử nghiệm về tác động của nó đối với việc hoạt hóa tiểu cầu. Các IC shCD154:C4LB237 không làm kích hoạt tiểu cầu trong thời điểm ban đầu, như minh họa trong Hình 7. Kết quả này cho thấy ngoài Fc, epitope của kháng thể cũng góp phần vào việc kháng thể có khả năng hoặc không có khả năng kích hoạt tiểu cầu.

Bảng 17.

Mẫu	k_a (1/Ms) 10^6	k_d (1/s) 10^{-05}	K_D (pM)
C4LB231 (n=8)	$2,53 \pm 0,15$	$7,81 \pm 0,69$	$31,0 \pm 3,3$
C4LB232 (n=8)	$2,54 \pm 0,15$	$8,89 \pm 0,91$	$35,2 \pm 5,2$
C4LB237 (n=4)	$2,59 \pm 0,20$	$6,05 \pm 0,98$	$23,6 \pm 5,4$

Bảng 18.

mAb (kháng thể đơn dòng)	IC_{50} (nM)	95% CI IC_{50} (nM)
C4LB231	2,32	2,11 - 2,55
C4LB237	2,56	2,43 - 2,70
C4LB89	6,22	5,27 - 7,34

Ví dụ 11. Kiến tạo đột biến trung tính trên C4LB89

Các phân tích cấu trúc tinh thể của C4LB89 trong phức hợp với CD154 cho thấy các vị trí trong CDR thuộc C4LB89 có thể được gây đột biến mà không ảnh hưởng đến

cấu trúc tổng thể của phức hợp và do đó dự kiến không làm ảnh hưởng đến các đặc tính của kháng thể C4LB89. Các đột biến trung tính trên CDR chuỗi nhẹ được nêu trong Bảng 19 và trong CDR chuỗi nặng trong Bảng 20. Việc đánh số các gốc có thể được gây đột biến được thể hiện trên từng CDR riêng lẻ và VL hoặc VH. Ví dụ, gốc Q4 trên LCDR1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN) có thể được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W hoặc Y với dự kiến rằng các đặc trưng của kháng thể không thay đổi đáng kể. Gốc tương ứng trong VL có SEQ ID NO: 66 là Q27.

Các đột biến như trình bày trong Bảng 19 hoặc Bảng 20 được thực hiện riêng lẻ hoặc kết hợp trên C4LB89 bằng các phương pháp tiêu chuẩn. Các cặp VH/VL tạo thành được biểu hiện và các kháng thể đột biến được phân lập và đặc trưng hóa bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Bảng 19.

LCDR của C4LB89	Gốc LCDR của C4LB89	Gốc VL của C4LB89 (SEQ ID NO: 66)	Các khả năng thay thế
LCDR1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN),	Q4	Q27	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, Y
	S5	S28	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	S7	S30	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	S8	S31	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
CDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS)	A2	A51	S
	N3	N52	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
	S4	S53	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	L5	L54	A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
	Q6	Q55	E, D, N
	S7	S56	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	S3	S91	A
	D4	D92	N

LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT),	S5	S93	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	I6	I94	A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T, V

Bảng 20.

HCDR C4LB89	Gốc HCDR C4LB89	VH của C4LB89 (SEQ ID NO: 59) Vị trí gốc	Các khả năng thay thế
HCDR1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS)	S1	S31	A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T, V
	I4	I34	M, L, V
	S5	S35	A
HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYA QKFQG)	S3	S52	A, T, V
	I5	I54	V, T, L Q, E
	N8	N57	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
	T9	T58	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, Y
	N10	N59	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY),	S1	S99	A, M
	R2	R100	A, S, Q, K
	R7	L105	M

Ví dụ 12. Đánh giá hoạt hóa tiểu cầu và hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao

Dựa trên đánh giá dữ liệu về cấu trúc tinh thể đối với vùng Fab và phức hợp shCD154 của các thí nghiệm C4LB231 và 5C8IgG1 trước đó với SC-HPLC và DLS cũng như đánh giá dữ liệu về hoạt hóa tiểu cầu, giả thuyết rằng các khác biệt nhỏ về tính liên kết của các kháng thể kháng CD154 với trimer shCD154 có thể hỗ trợ việc hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao: 1) Fab C4LB231 liên kết giữa 2 tiểu phần của trimer sCD154 trong khi Fab 5C8 liên kết 1 tiểu phần của sCD154, 2) Fab C4LB231 dường như bền vững trong cấu hình này hơn 5c8 Fab 3) và góc liên kết của kháng thể kháng CD154 với sCD154.

Để đánh giá thêm vai trò của epitope kháng thể làm trung gian hoạt hóa tiểu cầu và hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao với shCD154, VH và VL của các kháng thể

kháng CD154 khác nhau được tạo dòng và được biểu hiện dưới dạng isotyp IgG2sigma và IgG1sigma bất hoạt Fc hoặc dưới dạng IgG1. Các kháng thể được tạo ra này được trình bày trong Bảng 21. Các thí nghiệm hoạt hóa tiểu cầu được thực hiện như mô tả trong Ví dụ 6. Đối với các đánh giá hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao thông qua sắc ký lỏng hiệu năng cao loại cỡ (SE-HPLC) và tán xạ ánh sáng động (DLS), các kháng thể được tạo phức hợp với shCD154 với tỷ lệ mol 1:1 (aka 10:10) và 10:1 để đánh giá xem có xảy ra khác biệt trong phức hợp miễn dịch phụ thuộc nồng độ hay không.

Bảng 21.

Tên kháng thể	Isotyp	SEQ ID NO: VH:	SEQ ID NO: VL:
5C8IgG2sigma (C4LB71)	IgG2σ	74	75
5C8IgG1 (MSCB8)	IgG1		
C4LB89	IgG2σ	59	66
C4LB231	IgG1σ		
C4LB237	IgG1		
C4LB119	IgG2σ	84	85
C4LB290	IgG1σ		
C4LB287	IgG1		
C4LB83	IgG2σ	86	87
C4LB288	IgG1		
C4LB94	IgG2σ	60	67
C4LB234	IgG1σ		
C4LB289	IgG1		
IgG2σ: IgG2sigma IgG1σ: IgG1sigma			

SEQ ID NO: 84 VH của C4LB119

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYYISWVRQAPGQGLEWMGAI
DPYFGYANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARTGLNY
GGFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 85 VL của C4LB119

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGGTKVEIK

SEQ ID NO: 86 VH của C4LB83

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGWI
IPIFGNTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDFRG
YTKLDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 87 VL của C4LB83

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNWLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSFPYTFGQGGTKVEIK

Đặc trưng và chức năng liên kết của C4LB83 và C4LB119 được đánh giá bằng các quy trình được mô tả trong Ví dụ 1 và được trình bày trong Bảng 22.

Bảng 22.

Kháng thể	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	IC ₅₀ của thí nghiệm hoạt hóa tế bào B (nM)*
C4LB83	2,10E+06	4,70E-03	2,23E-09	0,64-1,09
C4LB119	1,84E+06	8,80E-03	4,79E-09	0,81-2,03
*shCD154-ILZ cảm ứng sự hoạt hóa các tế bào B người. Khoảng biểu thị giá trị IC ₅₀ thấp nhất và cao nhất có được trong các thí nghiệm riêng biệt ở 2 đối tượng cho				

Phương pháp

SE-HPLC

Các phức hợp miễn dịch của kháng thể theo minh họa trong Bảng 21 và shCD154 gắn nhãn Alexafluor-448 được điều chế với tỷ lệ mol kháng thể:shCD154 là 1:1 và 10:1 trong 110 μ L 1xPBS và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. 100 μ L mỗi mẫu được tiêm vào cột (hệ thống Agilent, 1100/1200) cho mỗi lần thực hiện, chứa 5 μ g shCD154 được gắn nhãn AF488 và 15 μ g (tỷ lệ 1:1), hoặc 150 μ g (tỷ lệ 10:1) kháng thể đơn dòng kháng CD154. Khối lượng phân tử được tính dựa trên thời gian duy trì theo các tiêu chuẩn (Bio-Rad). Mối quan hệ giữa khối lượng phân tử và thời gian duy trì protein thỏa mãn phương trình:

$$\log(M) = b - c T,$$

trong đó M là khối lượng phân tử, T là thời gian duy trì, và b và c là hằng số. Đường cong tuyến tính của $\log(M)$ và T đạt được từ sắc ký SE-HPLC tiêu chuẩn bằng phương pháp bình phương tối thiểu (least squares fitting) với $R^2 = 0,9928$.

DLS

Phép đo DLS dựa trên nguyên lý tán xạ ánh sáng và phân tử hoặc chuyển động Brown (Brownian Motion). Chuyển động Brown, thông thường là hành vi của phân tử trong dung dịch, khiến ánh sáng được tán xạ cả ở trong và ngoài pha, dẫn đến nhiễu tăng cường và nhiễu triệt. Kết quả là cường độ ánh xạ được tán xạ dao động theo thời gian. Trong phân tích DLS hoặc QELS (tán xạ ánh sáng chuẩn điện), thu được dao động phụ thuộc thời gian này trong cường độ ánh xạ được tán xạ bằng máy đếm photon nhanh. Các dao động có tỷ lệ thuận với tốc độ khuếch tán. Việc phân giải dữ liệu tương quan bằng phương trình Stokes-Einstein tạo ra bán kính thủy động học. Không giống như SEC-MALS, hoặc SEC, trong đó việc phân giải mẫu có thể phân biệt monome và đime, DLS chỉ có thể phân giải các loại được phân tách theo yếu tố kích cỡ bằng ~4, theo đó monome và tetrame sẽ bắt đầu được phân giải; tuy nhiên monome thông qua đime sẽ không bắt đầu được phân giải, mà sẽ cho thấy giá trị trung bình trọng số của hỗn hợp.

Phương trình Stokes-Einstein: $R_h = kT/6\pi\eta D$; trong đó

D = hệ số khuếch tán,

k = hằng số Boltzmann

T = nhiệt độ

η = độ nhớt

Chỉ riêng các kháng thể với nồng độ 10 μM hoặc các phức hợp miễn dịch của kháng thể được trình bày trong Bảng 21 và shCD154 là được điều chế với tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể:shCD154 là 10:1 hoặc 10:10 (10 μM kháng thể với 1 μM hoặc 10 μM shCD154) trong PBS. Tất cả các mẫu được điều chế trong lọ thủy tinh kèm

theo lọ nhỏ lồng bên trong (250 μ L được hủy hoạt hóa trong lọ thủy tinh kèm theo chân polyme, Agilent cat# 5181-8872), và các mẫu được thêm vào theo thứ tự sau đây: PBS, kháng thể đơn dòng, shCD154. Các mẫu được trộn bằng cách lắc nhẹ sau đó được ủ ở nhiệt độ phòng, có lắc dọc (Máy trộn lắc (VWR) ~30 vòng/phút trong khoảng 23 giờ. Nếu cần, các kháng thể trước tiên được cô đặc bằng các phương pháp tiêu chuẩn.

Việc phân phối loại và kích cỡ hạt trong tất cả các mẫu được xác định trên thiết bị DynaPro Plate Reader DLS (Wyatt Technologies Corporation) ở 23°C. Tính đồng nhất DLS được kiểm chứng trước tiên bằng BSA (không trình bày dữ liệu). Các phép đo được thực hiện bằng cách đưa 30 μ L mẫu vào từng lỗ trong 3 lỗ đối với (các phép đo theo bộ ba). Thu được các thông số đo DLS trong máy đọc đĩa DynaPro. Hai mươi lần thu thập mỗi lần 5 giây được thực hiện trên mỗi mẫu, và công suất laser được thiết bị điều chỉnh tự động. Thông số dùng để phân tích dữ liệu bao gồm độ nhớt ở 23°C đối với PBS là 1,019 cP và trị số chỉ số khúc xạ tại 589 nm & 23°C đối với PBS là 1,333. Mô hình protein hình cầu được chương trình sử dụng. Tín hiệu được đưa vào các đỉnh, trong đó đỉnh 1 là 0,1-10 nm, đỉnh 2 là 10-100 nm, đỉnh 3 là 100-1000 nm và đỉnh 4 là 1000-5000 nm. Chất kết tủa nhìn thấy (nếu được tạo thành) trong mẫu được ghi nhận. Thực hiện phân tích dữ liệu bằng phần mềm Dynamics (Wyatt Technology Inc.). Biểu đồ phần trăm khối lượng so với bán kính loại (Rh) được tạo. Bán kính đỉnh, đa phân tán, phần trăm khối lượng và phần trăm cường độ được tính toán và ghi chép.

Kết quả

Hoạt hóa tiểu cầu

Khả năng của phức hợp miễn dịch của shCD154 và kháng thể được biểu hiện dưới dạng IgG2sigma hoặc IgG1sigma bất hoạt Fc, hoặc IgG1 kiểu đại trong việc hoạt hóa tiểu cầu được đánh giá. Kháng thể 5c8 được tạo dòng trên các giàn giáo IgG được sử dụng làm đối chứng. Hình 3 minh họa phức hợp miễn dịch 5c8IgG1:shCD154 hoạt hóa tiểu cầu phụ thuộc Fc γ RIIa, vì kháng thể kháng Fc γ RIIa ức chế hoạt hóa tiểu cầu qua trung gian 5c8IgG1. Các vùng VH/VL 5c8 được tạo dòng trên Fc bất hoạt chức năng thực thi, IgG1sigma hoặc IgG2sigma mất khả năng hoạt hóa tiểu cầu (Hình 1). Các kết quả này nhất quán với mô tả ở phần trên. Tuy nhiên, bất ngờ là, các thí nghiệm được thực hiện trong Ví dụ 10 cho thấy các phức hợp miễn dịch với kháng thể IgG1

kiểu đại (C4LBB237:shCD154) không làm hoạt hoá tiểu cầu (Hình 7), điều này thôi thúc việc thực hiện thêm các nghiên cứu về khả năng phụ thuộc epitope của hoạt động hoạt hoá tiểu cầu.

Các vùng VH/VL của 4 kháng thể khác nhau được tạo dòng thành IgG2sigma, IgG1sigma hoặc IgG1 kiểu đại để đánh giá tác động của epitope và/hoặc Fc đối với việc hoạt hoá tiểu cầu cũng như đối với việc hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao. Trái với mô tả ở phần trên, người ta đã phát hiện ra rằng việc hoạt hoá tiểu cầu trong một số trường hợp đã diễn ra qua trung gian epitope kháng thể mà không phụ thuộc liên kết chéo qua trung gian FcγRIIa.

Hình 8A, Hình 8B và Hình 8C trình bày tổng hợp các phân tích. Phức hợp miễn dịch của kháng thể bất hoạt Fc như C4LB119 (Hình 8A) và C4LB94 (Hình 8B) hoạt hoá tiểu cầu mà không phụ thuộc FcγRIIa, vì tiền khối với kháng thể kháng FcγRIIa không thể gây ức chế hoạt hoá tiểu cầu. IC của C4LB83, hay còn gọi là kháng thể bất hoạt Fc, hoạt hóa tiểu cầu ở mức độ vừa phải (Hình 8C). IC của kháng thể có các miền VH/VL đồng nhất được tạo dòng trên IgG1 kiểu đại trong mỗi trường hợp hoạt hóa tiểu cầu qua trung gian FcγRIIa (C4LB278 trong Hình 8A, C4LB289 trong Hình 8B, và C4LB288 trong Hình 8C). Do đó, một số kháng thể được xác định là làm trung gian cho hoạt động hoạt hóa tiểu cầu mặc dù có Fc bất hoạt. Một cặp miền VH/VL được xác định làm trung gian cho hoạt động hoạt hóa tiểu cầu không phải tại IgG1 bất hoạt (C4LB231) hay kiểu đại (C4LB237). Những dữ liệu này chứng minh rằng epitope kháng thể có đóng góp trong việc làm trung gian cho việc kết tụ tiểu cầu.

Hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao

SE-HPLC và DLS được sử dụng để đánh giá thêm việc xảy ra hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao và kích cỡ xấp xỉ của những phức hợp miễn dịch này giữa các kháng thể kháng CD154 được trình bày trong Bảng 21 và shCD154. Vì shCD154 là trimer trong dung dịch, hệ số tỷ lệ dự kiến của kháng thể:trimer shCD154 trong dung dịch là 3:1. Đối với SE-HPLC, các phức hợp miễn dịch nặng hơn và do đó lớn hơn có thể có thời gian duy trì ngắn hơn, trong khi đó các phức hợp miễn dịch nhẹ hơn và do đó nhỏ hơn có thể có thời gian duy trì dài hơn, với ngoại lệ là các phức hợp miễn dịch rất lớn không thể rửa giải cột và được chứng minh bằng % thu hồi thấp. Đối với DLS, giá trị bán kính (R_h) càng lớn thì phức hợp miễn dịch càng lớn. Kỹ thuật DLS trên đĩa

không thể làm phân giải monome, dimer, trimer và tetramer của IgG. Do đó giá trị Rh thu được sẽ là giá trị trung bình trọng số của monome – tetramer, do đó giá trị Rh gần hơn với 6,5 có thể đại diện cho các dung dịch có kháng thể đơn dòng chứa các loại bậc cao, điển hình là dimer. Trong trường hợp liên kết kháng thể đơn dòng với shCD154 có hệ số tỷ lệ, có thể có hai loại - phức hợp (~500 kDa) và kháng thể không liên kết (~150 kDa) với tỷ lệ là 3:1 tương ứng với các giá trị là Rh ~8,8 nm và 5-6,5 nm lần lượt cho phức hợp và kháng thể đơn dòng tự do với tỷ lệ là 3:1. Không kỹ thuật nào có thể phân giải chính xác khối lượng phân tử của phức hợp miễn dịch, nhưng có thể cho phép các kích cỡ tương đương. Bảng 23 trình bày mối quan hệ giữa thời gian duy trì và bán kính thủy động học với các khối lượng phân tử gần đúng.

Bảng 23.

Phức hợp miễn dịch	Khối lượng phân tử gần đúng (kDa)	Thời gian duy trì SE-HPLC (phút)	Bán kính thủy động học DLS (nm)
mAb	150	~ 9 phút	5 đến 6,5
mAb:shCD154 (trimer)	550	~ 7 phút	~8,8
Phức hợp miễn dịch bậc cao	~ 1000	< 7 phút	~12

DLS

Các kháng thể đơn dòng khi không có mặt CD154 và phức hợp miễn dịch kháng thể:shCD154 với các kích cỡ khác nhau được đánh giá trong các điều kiện mà trong đó phức hợp kháng thể:shCD154 được hình thành khi kháng thể có lượng vượt trội (tỷ lệ mol 10:1) và ở nồng độ đương lượng (tỷ lệ mol 1:1). Trong các điều kiện trong đó kháng thể có lượng vượt trội, kháng thể thường bão hòa các điểm CD154 để hình thành phức hợp miễn dịch, và kháng thể không được liên kết sẽ xuất hiện với lượng dư. Trong điều kiện nồng độ đương lượng, kháng thể tự do hoặc shCD154 tự do sẽ không xuất hiện. Các giá trị Rh thu được cho mỗi kháng thể đơn dòng khi không có sh CD154 và khi có sh CD154 với tỷ lệ mol 10:1 và 10:10 được minh họa trong Bảng 24.

Kháng thể đơn dòng điển hình có MW danh định là 150 kDa tạo ra giá trị Rh bằng 5,0-6,5 nm. Các dimer IgG, thường được nhìn thấy trong phép sắc ký loại c, không thể được phân giải bằng các kỹ thuật DLS trên đĩa. Các giá trị Rh thu được sẽ là giá trị

trung bình trọng số của monome – tetrame, do đó giá trị R_h gần hơn với 6,5 có thể đại diện cho dung dịch có kháng thể đơn dòng chứa loại bậc cao, điển hình là đime.

Đối với các kháng thể đơn dòng khi không có CD154, giá trị R_h dự kiến là 5,5-6,3 nm được quan sát thấy cho tất cả các kháng thể đơn dòng ngoại trừ C4LB287 và C4LB234, với các giá trị R_h lần lượt là 6,9, và 7,1 nm, cho thấy các kháng thể này vốn có xu hướng kết tụ.

Các giá trị R_h cho các phức hợp kháng thể:shCD154 được tạo thành theo tỷ lệ 10:1 thường nhỏ hơn khoảng 8,8 nm, biểu thị phức hợp tỷ lệ 3:1 mà không hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao, ngoại trừ 5c8IgG2sigma (C4LB71) và C4LB234 (các giá trị R_h lần lượt là 8,9 và 9,3 nm), cho thấy phức hợp miễn dịch bậc cao được tạo thành.

Tăng nồng độ shCD154 đến 10 μ M dẫn đến việc các phức hợp miễn dịch kháng thể:shCD154 có R_h tăng lên so với phức hợp có CD154 nồng độ 1 μ M (tỷ lệ kháng thể:CD154 là 10:1). Một số phức hợp kháng thể:shCD154 cho thấy tính không đồng nhất với các loại thứ cấp có khối lượng phân tử cao có mặt với khối lượng nằm trong khoảng 7-25% tổng khối lượng. Các giá trị R_h của IC của C4LB71, 5C8IgG1, C4LB89, C4LB119, C4LB94, C4LB234 và C4LB289 lần lượt là 22,1, 615, 56,3, 45,0, 18,3, 18,7 và 19,6 nm. Ngoài ra, C4LB89, C4LB119, C4LB83, C4LB228 cũng hình thành loại 900-4000 nm, và C4LB89 và C4LB119 hình thành chất kết tủa cho thấy phức hợp miễn dịch rất lớn. Loại có giá trị R_h gần bằng 12 nm thường tương ứng với khối lượng ~1.000 kDa, do đó những kháng thể đơn dòng này sẽ hình thành các phức hợp miễn dịch rất lớn với CD154 trong những điều kiện như vậy.

Bảng 24.

Kháng thể	Isotyp	Bán kính thủy động học (R_h), nm		
		10:0*	10:1*	10:10*
5c8IgG2 σ (C4LB71)	IgG2 σ	5,8	8,9	22,1
5c8IgG1	IgG1	5,7	8,3	19,6
C4LB89	IgG2 σ	5,9	5,3, (4082)	615 ppt
C4LB231	IgG1 σ	5,9	8,2	10,5
C4LB237	IgG1	6,1	7,4	9,8

C4LB119	IgG2 σ	6,3	8,0	56,3 ppt
C4LB290	IgG1 σ	6,1	8,3	13,3
C4LB287	IgG1	6,9	8,2	12,9
C4LB83	IgG2 σ	6	6,1	14,5, (3632)
C4LB288	IgG1	6,1	6,6	10,9
C4LB94	IgG2 σ	6,1	6,9	45
C4LB234	IgG1 σ	7,1	9,3, (83)	5,3, (18,3)
C4LB289	IgG1	5,6,	7,8, (17, 1350)	3,7, (18,7)
* Tỷ lệ kháng thể:shCD154 Rh của loại thứ cấp được cho trong dấu ngoặc nếu phần trăm khối lượng $\geq 25\%$ ppt: dung dịch được kết tủa IgG2σ: IgG2sigma IgG1σ: IgG1sigma				

SE-HPLC

Bảng 25 trình bày thời gian duy trì, tỷ lệ thu hồi, và khối lượng phân tử ước tính (MW) của riêng các kháng thể kháng CD154 và trong phức hợp miễn dịch với shCD154 thu được từ các phân tích SE-HPLC. Kháng thể điển hình có MW bằng khoảng 150 kD, và trime shCD154 có MW bằng khoảng 50 kDa. Do đó, phức hợp kháng thể đơn dòng:trime shCD154 với hệ số tỷ lệ 3:1 có MW dự kiến bằng khoảng 500 kDa.

Bảng 25.

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	Loại	Tỷ lệ*	Thời gian duy trì (phút)	Vùng đỉnh	% thu hồi	MW (kDa)
5c8IgG2 σ (C4LB71)	IgG2 σ	1:1	6,24	6887	85,2	1596,8
		10:1	6,28	7348	90,9	1538,2
5c8IgG1	IgG1	1:1	7,3	1096	55,7	592,8
		10:1	6,92	3280	69,2	845,6

C4LB89	IgG2σ	1:1	6,19	356	16,9**	1673,2
		10:1	6,35	3662	45,3**	1440,8
C4LB231	IgG1σ	1:1	6,97	6766	83,8	807
		10:1	6,97	7181	88,9	807
C4LB237	IgG1	1:1	6,99	6506	80,5	792,1
		10:1	6,99	7977	98,7	792,1
C4LB119	IgG2σ	1:1	9,59	307	5,6**	69,7
		10:1	8,02	4667	8,3**	302,4
C4LB290	IgG1σ	1:1	7,01	4957	61,4	777,4
		10:1	7,01	6983	86,4	777,4
C4LB287	IgG1	1:1	7	5937	73,5	784,7
		10:1	7,02	8011	99,2	770,2
C4LB83	IgG2σ	1:1	7,86	5193	64,3	351,2
		10:1	7,84	3355	86,9	357,8
C4LB288	IgG1	1:1	7,62	4169	70,6	439,5
		10:1	7,37	5582	95,5	555,2
C4LB94	IgG2σ	1:1	6,01	3233	40,0**	1979,9
		10:1	6,02	7748	95,9	1961,5
C4LB234	IgG1σ	1:1	6,26	5534	86,6	1567,3
		10:1	6,53	7922	98,1	1217,6
C4LB289	IgG1	1:1	6,25	5800	83,5	1582
		10:1	6,53	7958	98,5	1217,6
*(mAb:CD154) ** Tỷ lệ thu hồi < 50% Các kháng thể có VH/VL đồng nhất được tách thành các nhóm được chia theo các hàng trống IgG2σ: IgG2sigma IgG1σ: IgG1sigma						

Tất cả các kháng thể hình thành phức hợp miễn dịch với sCD154. C4LB231, C4LB237, C4LB290, C4LB287 (tất cả IgG1sigma) tạo thành phức hợp miễn dịch với sCD154 và được rửa giải tại thời điểm 7,0 phút, tuy nhiên C4LB290 và C4LB287 có tỷ lệ

phần trăm thu hồi thấp hơn trong điều kiện tỷ lệ là 1:1 so với điều kiện tỷ lệ là 10:1, trong khi đó C4LB231 và C4LB237 có tỷ lệ phần trăm thu hồi cao hơn (> 80%). C4LB289 (IgG1), C4LB234 (IgG1sigma), 5c8IgG1sigma (C4LB71) và C4LBB94 (IgG2sigma) rửa giải sớm hơn tại thời điểm 6,2 đến 6,5 phút cho biết các phức hợp được tạo thành lớn hơn so với phức hợp được tạo với kháng thể đơn dòng đề cập ở phần trên. 5c8IgG1 có đỉnh rộng tại thời điểm duy trì dự kiến đối với phức hợp miễn dịch kháng thể đơn dòng: trime shCD154 tỷ lệ 3:1, tuy nhiên đỉnh rộng và tỷ lệ thu hồi thấp hơn (56% tại điều kiện tỷ lệ 1:1) cho thấy các phức hợp miễn dịch bậc cao có thể đã hình thành mà có thể đã tương tác với hoặc đã không vào cột. C4LB89 và C4LB119 (cả hai IgG2sigma) tạo thành phức hợp với shCD154 và được rửa giải với đỉnh rộng và tỷ lệ thu hồi rất thấp (6—17% tại điều kiện tỷ lệ 1:1), có khả năng do sự tạo thành các phức hợp lớn mà các phức hợp này không vào cột. Nhìn chung, các kháng thể trên isotyp IgG2sigma tạo thành các phức hợp miễn dịch lớn hơn so với các kháng thể trên IgG1sigma hoặc IgG1.

Bảng 26 trình bày tổng hợp các đặc trưng của kháng thể. Nhìn chung, dữ liệu hoạt hóa tiểu cầu, dữ liệu SE-HPLC và DLS đều cho thấy rằng sự hoạt hóa tiểu cầu không hoàn toàn là do Fc hoạt động. Dữ liệu cho thấy rằng các kháng thể có Fc bất hoạt như IgG1sigma và IgG2sigma có khả năng tạo thành các phức hợp miễn dịch cỡ lớn hơn phức hợp miễn dịch dự kiến của kháng thể đơn dòng với trime shCD154 theo tỷ lệ 3:1 và cho thấy rằng một số kháng thể trên Fc bất hoạt có khả năng hoạt hóa tiểu cầu. Dữ liệu hỗ trợ kết luận rằng cả hai miền VH/VL (ví dụ, epitope mà kháng thể có liên kết với nó) và việc hình thành phức hợp miễn dịch bậc cao góp phần gây nên hoạt hóa tiểu cầu.

Bảng 26.

Kháng thể	Isotyp	Hoạt hóa tiểu cầu**	Hoạt hóa tiểu cầu không phụ thuộc FcγRIIa	IC từ SE-HPLC RT (phút)		Rh của IC từ DLS (nm)	
				10:1*	1:1*	10:1*	10:10*
5c8IgG2σ (C4LB71)	IgG2σ	Không		6,3	6,2	8,9	22,1
5c8IgG1σ	IgG1σ	Không					
5c8IgG1	IgG1	Có	Không	6,9	7,3	8,3	19,6

C4LB89	IgG2σ	Không		6,4 [#]	6,2 [#]	5,3, 4082 [^]	615 p
C4LB231	IgG1σ	Không		7,0	7,0	8,2	10,5
C4LB237	IgG1	Không		7,0	7,0	7,4	9,8
C4LB119	IgG2σ	Có	Có	8,0 [#]	9,6 [#]	8,0	56,3 p
C4LB290	IgG1σ			7,0	7,0	8,3	13,3
C4LB287	IgG1	Có	Không	7,0	7,0	8,2	12,9
C4LB83	IgG2σ	Không đáng kể	Có	7,8	7,9	6,1	14,5, 3632 [^]
C4LB288	IgG1	Có	Không	7,4	7,6	6,6	10,9
C4LB94	IgG2σ	Có	Có	6,0	6,0 [#]	6,9	45
C4LB234	IgG1σ			6,5	6,3	9,3	5,3, 18,3 [^]
C4LB289	IgG1	Có	Không	6,5	6,3	7,8	3,7, 18,7
*tỷ lệ kháng thể:shCD154 **đánh giá bằng cách sử dụng biểu hiện PAC-1 hoặc CD62p [#]SE-HPLC % thu hồi < 50% [^]Rh của loại thứ cấp được bao gồm nếu phần trăm khối lượng ≥ 25% p: dung dịch được kết tủa IgG2σ: IgG2sigma IgG1σ: IgG1sigma							

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phân gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 người có SEQ ID NO: 1, bao gồm vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ (light chain complementarity determining region - LCDR) 1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS), LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (heavy chain complementarity determining region - HCDR) 1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), và HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), trong đó tùy ý:
 - a) gốc Q4 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - b) gốc S5 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - c) gốc S7 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - d) gốc S8 của LCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - e) gốc A2 của LCDR2 được đột biến thành S;
 - f) gốc N3 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - g) gốc S4 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - h) gốc L5 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - i) gốc Q6 của LCDR2 được đột biến thành E, D hoặc N;
 - j) gốc S7 của LCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;
 - k) gốc S3 của LCDR3 được đột biến thành A;
 - l) gốc D4 của LCDR3 được đột biến thành N;
 - m) gốc S5 của LCDR3 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W hoặc Y;

- n) gốc I6 của LCDR3 được đột biến thành A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T hoặc V;
 - o) gốc S1 của HCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T hoặc V;
 - p) gốc I4 của HCDR1 được đột biến thành M, L hoặc V;
 - q) gốc S5 của HCDR1 được đột biến thành A;
 - r) gốc S3 của HCDR2 được đột biến thành A, T hoặc V;
 - s) gốc P4 của HCDR2 được đột biến thành V, T, L, Q hoặc E;
 - t) gốc N8 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - u) gốc T9 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - v) gốc N10 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - w) gốc S1 của HCDR3 được đột biến thành A hoặc M;
 - x) gốc R2 của HCDR3 được đột biến thành A, S, Q hoặc K; hoặc
 - y) gốc L7 của HCDR3 được đột biến thành M.
2. Kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phân gán kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 người có SEQ ID NO: 1, bao gồm vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), và HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDDY), trong đó tùy ý:
- a) gốc S1 của HCDR1 được đột biến thành A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T hoặc V;
 - b) gốc I4 của HCDR1 được đột biến thành M, L hoặc V;
 - c) gốc S5 của HCDR1 được đột biến thành A;
 - d) gốc S3 của HCDR2 được đột biến thành A, T hoặc V;
 - e) gốc P4 của HCDR2 được đột biến thành V, T, L, Q hoặc E;
 - f) gốc N8 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - g) gốc T9 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;

- h) gốc N10 của HCDR2 được đột biến thành A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W hoặc Y;
 - i) gốc S1 của HCDR3 được đột biến thành A hoặc M;
 - j) gốc R2 của HCDR3 được đột biến thành A, S, Q hoặc K;
 - k) gốc L7 của HCDR3 được đột biến thành M; và
- vùng xác định hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1, LCDR 2 và LCDR3 có:
- a) các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51;
 - b) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52;
 - c) các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53;
 - d) các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54;
 - e) các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55;
 - f) các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56;
 - g) các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57;
 - h) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52; hoặc
 - i) các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52.
3. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm HCDR1 có SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 có SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 có SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), LCDR1 có SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 có SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) và LCDR3 có SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).
 4. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này có ít nhất một trong các đặc tính sau đây:
 - a) phức hợp miễn dịch của kháng thể và CD154 người dạng tan (shCD154) không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó sự hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện bề mặt của P-selectin trên tiểu cầu;
 - b) liên kết với CD154 với hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 ở nhiệt độ 25°C trong dung dịch nước muối đệm phosphat theo Dulbecco chứa polysorbate P20 0,03% và albumin huyết thanh bò có nồng độ 100 µg/ml;
 - c) ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc

- d) ức chế sự biểu hiện của phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.
5. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó CD154 người là homotrimer và kháng thể này liên kết với monome CD154 thứ nhất trong homotrimer trong các gốc axit amin 182-207 của CD154 và monome CD154 thứ hai trong homotrimer trong các gốc axit amin 176-253 của CD154, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.
 6. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó kháng thể này liên kết với các gốc E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 và R207 trong monome CD154 thứ nhất, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.
 7. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó kháng thể này liên kết với các gốc T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 và F353 trong monome CD154 thứ hai, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.
 8. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 59.
 9. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 8, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có các SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 hoặc 73.
 10. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 9, trong đó kháng thể này bao gồm VL có các SEQ ID NO: 66, 72 hoặc 73.
 11. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể này bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.
 12. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể này bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72.
 13. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể này bao gồm VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73.
 14. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể thuộc isotyp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.
 15. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 14, trong đó kháng thể này bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc, trong đó ít nhất một thay thế

- trong vùng Fc là thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S hoặc P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
16. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 15, trong đó kháng thể này bao gồm các thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S hoặc P331S trong vùng Fc, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
 17. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 14, trong đó kháng thể này bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc, trong đó ít nhất một thay thế trong vùng Fc là thay thế V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S hoặc P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
 18. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 17, trong đó kháng thể này bao gồm các thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S trong vùng Fc, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
 19. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 14, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC) có các SEQ ID NO:
 - a) lần lượt là 80 và 81;
 - b) lần lượt là 82 và 81; hoặc
 - c) lần lượt là 83 và 81.
 20. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.
 21. Kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, kháng thể này bao gồm:
 - a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 44 và 52;
 - b) VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66; hoặc
 - c) chuỗi nặng có SEQ ID NO: 80 và chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 81.
 22. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó CD154 người là homotrimer và kháng thể này liên kết với monome CD154 thứ nhất trong homotrimer trong các gốc axit amin 182-207 của CD154 và monome CD154 thứ hai trong homotrimer trong các gốc axit amin 176-253 của CD154, trong đó việc đánh số gốc là theo SEQ ID NO: 1.

23. Thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 được liên kết với tác nhân điều trị hoặc chất tạo ảnh.
24. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và chất mang dược dụng.
25. Kháng thể đối kháng phân lập được hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với CD154 có SEQ ID NO: 1, bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 có:
- a) các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22, 29, 36, 43 và 51;
 - b) các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 44 và 52;
 - c) các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24, 31, 38, 45 và 53;
 - d) các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25, 32, 39, 46 và 54;
 - e) các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26, 33, 40, 47 và 55;
 - f) các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27, 34, 41, 47 và 56;
 - g) các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28, 35, 42, 48 và 57;
 - h) các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 49 và 52; hoặc
 - i) các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23, 30, 37, 50 và 52,
- trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được định nghĩa theo Kabat, Chothia hoặc IMGT.
26. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 22 và 29, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 36, 43 và 51; hoặc
 - b) VH có SEQ ID NO: 58 và VL có SEQ ID NO: 65.
27. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 44 và 52; hoặc
 - b) VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 66.
28. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 16, 24 và 31, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 38, 45 và 53; hoặc

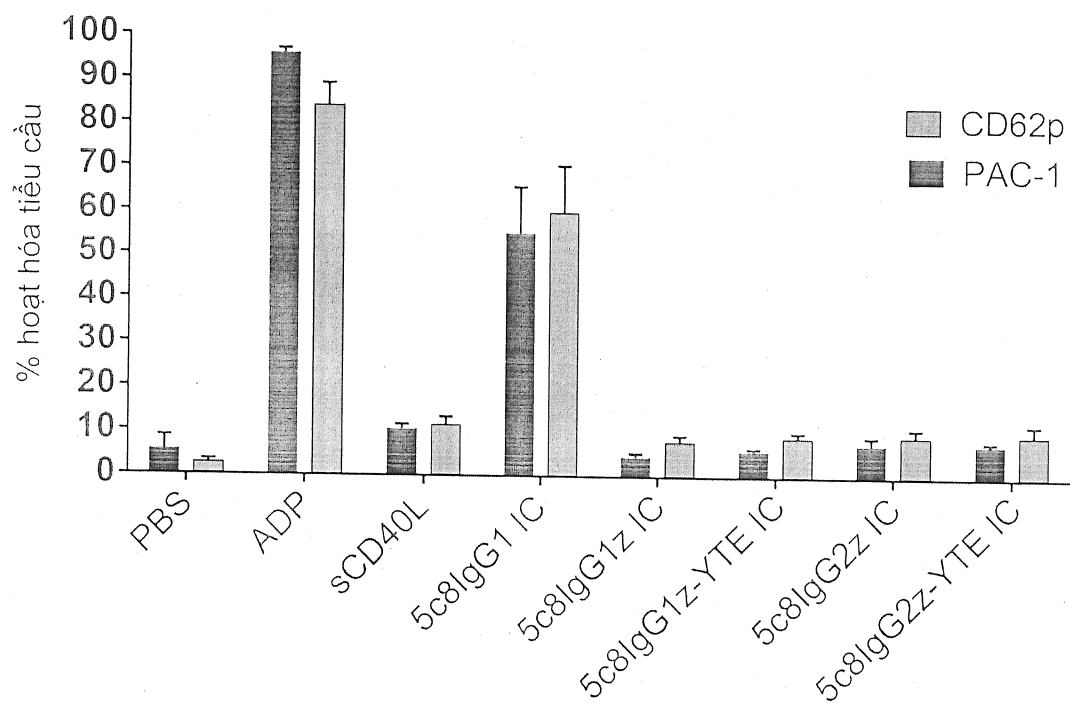
- b) VH có SEQ ID NO: 60 và VL có SEQ ID NO: 67.
29. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 18, 25 và 32, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 39, 46 và 54; hoặc
- b) VH có SEQ ID NO: 61 và VL có SEQ ID NO: 68.
30. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 19, 26 và 33, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 40, 47 và 55; hoặc
- b) VH có SEQ ID NO: 62 và VL có SEQ ID NO: 69.
31. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 20, 27 và 34, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 41, 47 và 56; hoặc
- b) VH có SEQ ID NO: 63 và VL có SEQ ID NO: 70.
32. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 21, 28 và 35, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 42, 48 và 57; hoặc
- b) VH có SEQ ID NO: 64 và VL có SEQ ID NO: 71.
33. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 49 và 52; hoặc
- b) VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 72.
34. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này bao gồm:
- a) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 17, 23 và 30, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các SEQ ID NO: lần lượt là 37, 50 và 52; hoặc
- b) VH có SEQ ID NO: 59 và VL có SEQ ID NO: 73.

35. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể này thuộc isotyp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.
36. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 35, trong đó kháng thể này bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc, trong đó ít nhất một thay thế trong vùng Fc là thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S hoặc P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
37. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 36, trong đó kháng thể này bao gồm thay thế L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S và P331S trong vùng Fc, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
38. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 35, trong đó kháng thể này bao gồm ít nhất một thay thế trong vùng Fc, trong đó ít nhất một thay thế trong vùng Fc là thay thế V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E H268A, V309L, A330S hoặc P331S, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
39. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 38, trong đó kháng thể này bao gồm các thay thế V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S và P331S trong vùng Fc, trong đó việc đánh số gốc theo chỉ số châu Âu.
40. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể là kháng thể đa đặc hiệu.
41. Kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25, trong đó kháng thể có ít nhất một trong các đặc tính sau đây:
 - a) phức hợp miễn dịch của kháng thể và CD154 người dạng tan (shCD154) không làm hoạt hóa tiểu cầu, trong đó sự hoạt hóa tiểu cầu được đo theo biểu hiện bề mặt của P-selectin trên tiểu cầu;
 - b) liên kết với CD154 với hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 5×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn, trong đó K_D được đo bằng hệ thống ProteOn XPR36 ở 25°C trong dung dịch nước muối đệm phosphat theo Dulbecco chứa polysorbat P20 0,03% và albumin huyết thanh bò có nồng độ 100 µg/ml;
 - c) ức chế sự tăng sinh tế bào B người qua trung gian CD154 với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,7 \times 10^{-9}$ M hoặc nhỏ hơn; hoặc
 - d) ức chế biểu hiện của phosphatase kiềm được tiết ra từ phôi (SEAP) qua trung gian CD154 nhờ trình tự khởi động tối thiểu interferon- β (IFN- β) có thể cảm

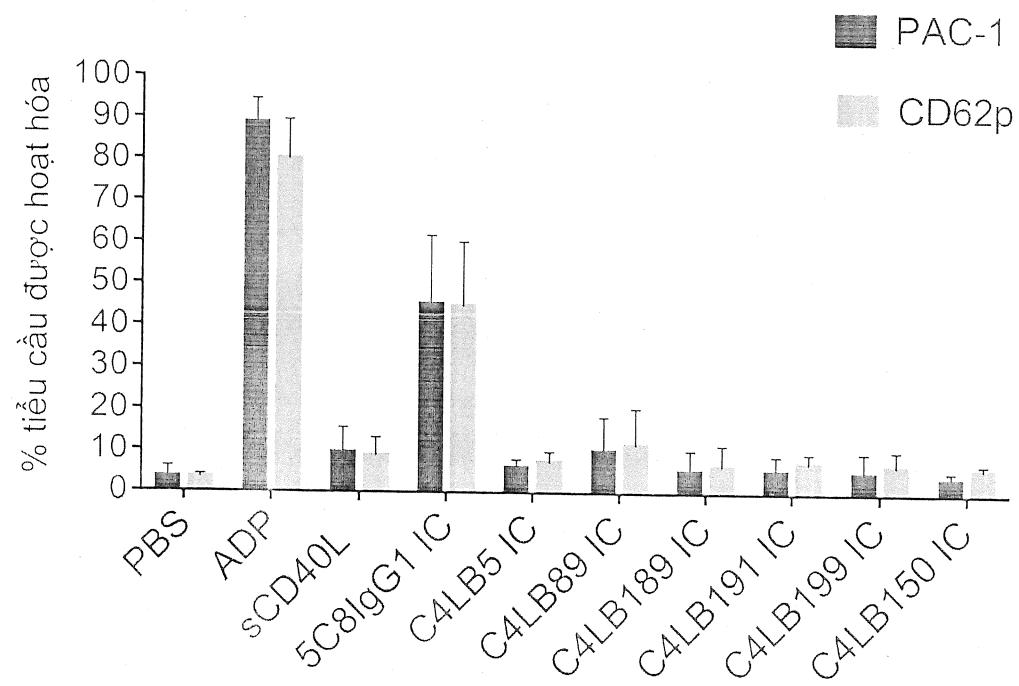
ứng NF- κ B trong các tế bào HEK293 biểu hiện ổn định SEAP và CD40 người với giá trị IC_{50} bằng khoảng $2,1 \times 10^{-8}$ M hoặc nhỏ hơn.

42. Thẻ liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25 được liên kết với tác nhân điều trị hoặc chất tạo ảnh.
43. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 25 và chất mang dược dụng.
44. Bộ kit bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
45. Bộ kit theo điểm 44, trong đó còn bao gồm thuốc thử để phát hiện kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó.
46. Thẻ liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 21 được liên kết với tác nhân điều trị hoặc chất tạo ảnh.
47. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 21 và chất mang dược dụng.

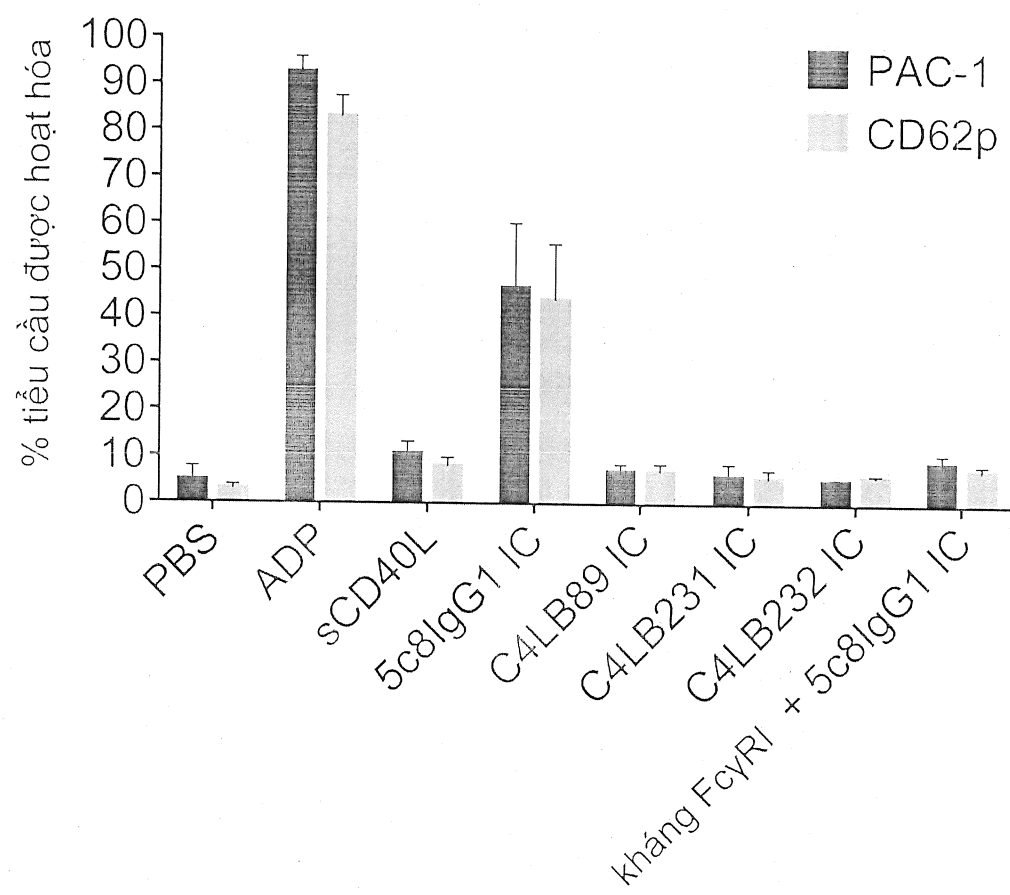
Hình 1.



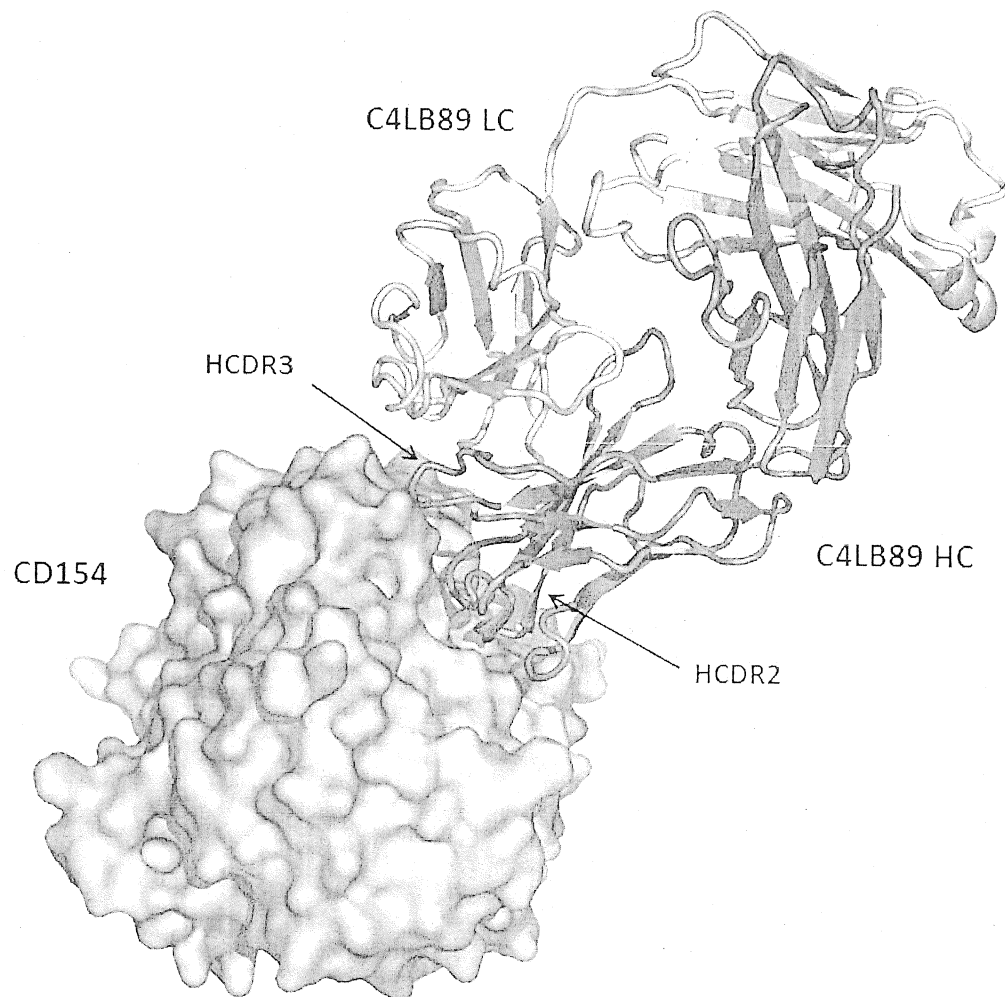
Hình 2.



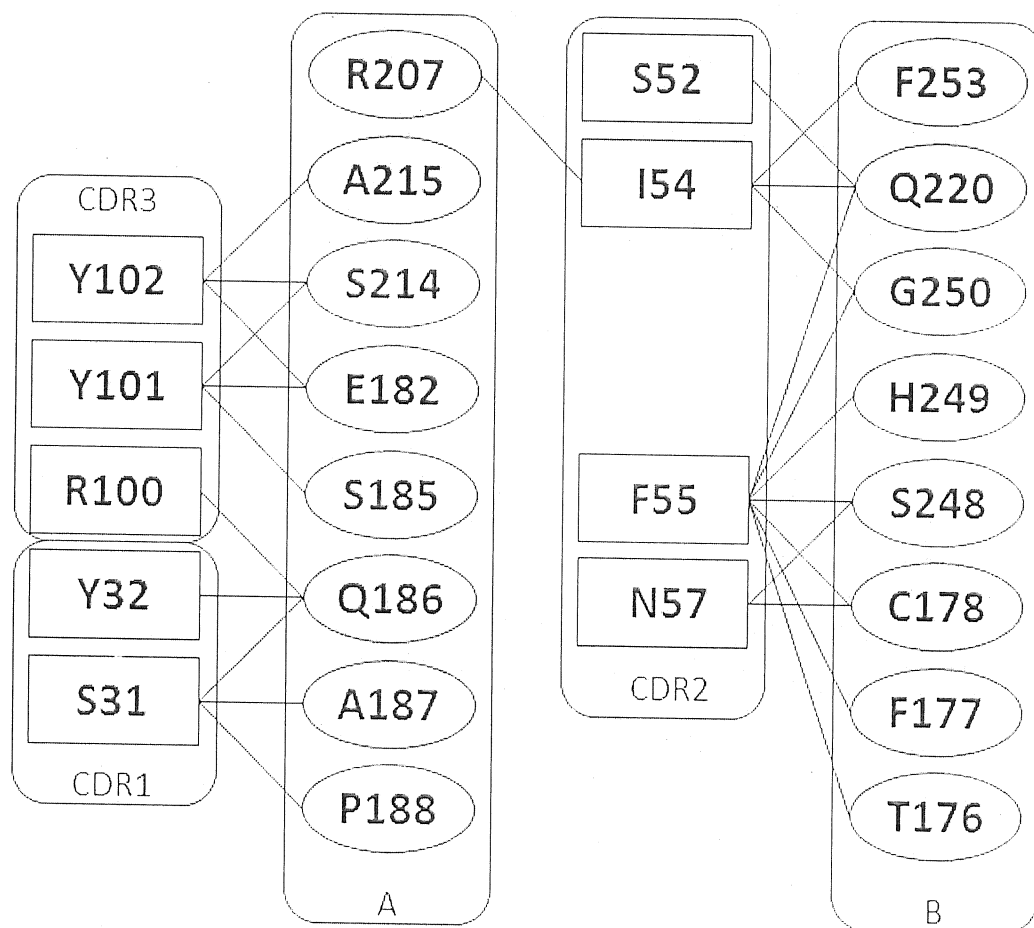
Hình 3.



Hình 4.



Hình 5.



Hình 6A.

1 30
 Người MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTV
 Khi đuôi sóc MIETYNQPVPRSAATGPPVSMKIFMYLLTV
 ***** . ***** * : *****

31 60
 Người FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH
 Khi đuôi sóc FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH

61 90
 Người EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ
 Khi đuôi sóc EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ

91 120
 Người FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNP
 Khi đuôi sóc FEGFVKDIMLNKEEKKENSFEMQKGDQNP
 ***** . *****

121 150
 Người QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN
 Khi đuôi sóc QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN

151 180
 Người NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN
 Khi đuôi sóc NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN

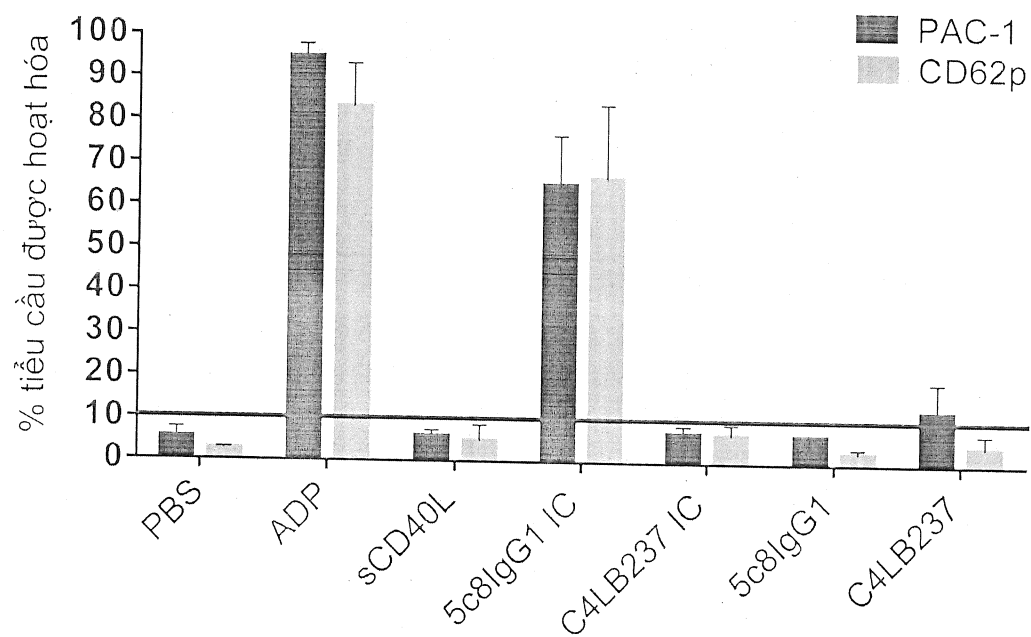
Hình 6B.

	181	210
Người	REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN	
Khi đuôi sóc	REASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAAN	
	*****.*****	

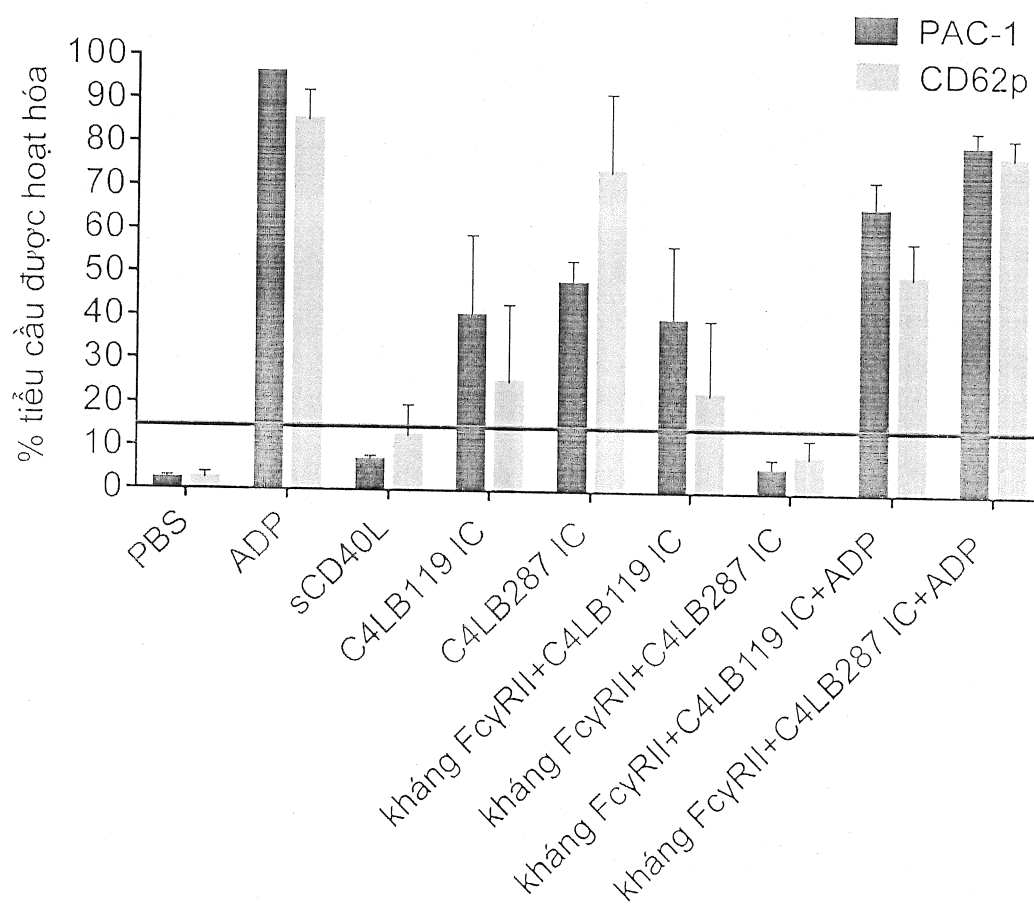
	211	240
Người	THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN	
Khi đuôi sóc	THSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFN	
	*****:*****	

	241	261
Người	VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL	
Khi đuôi sóc	VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL	

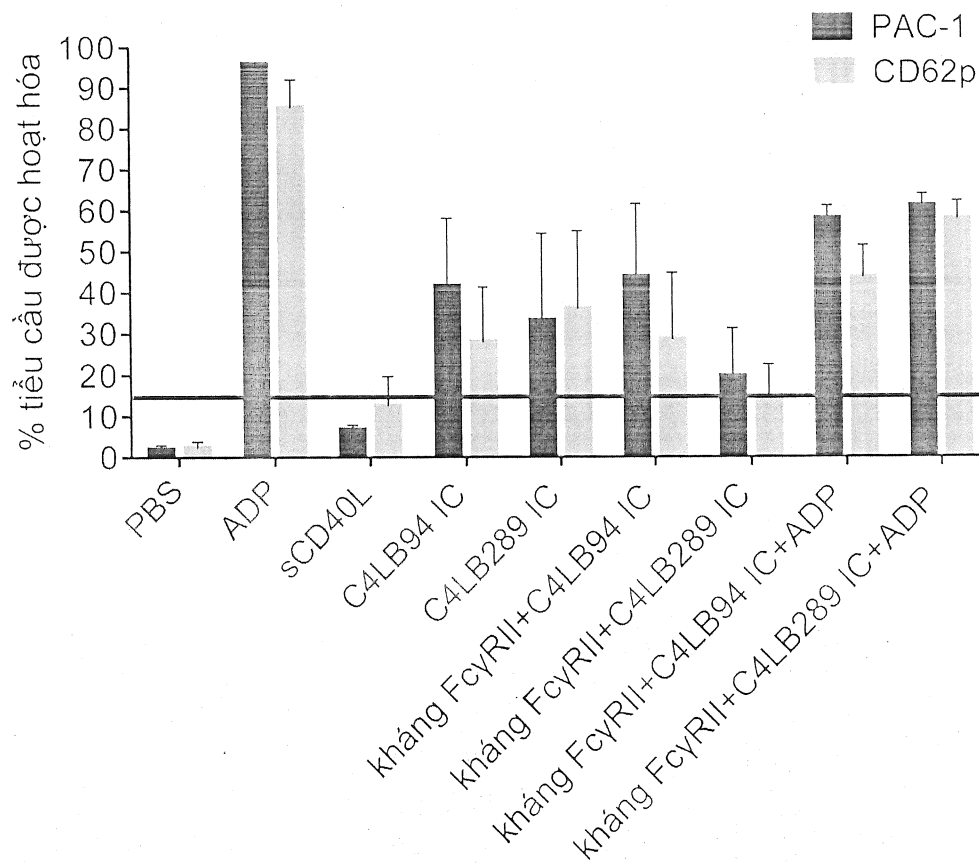
Hình 7.



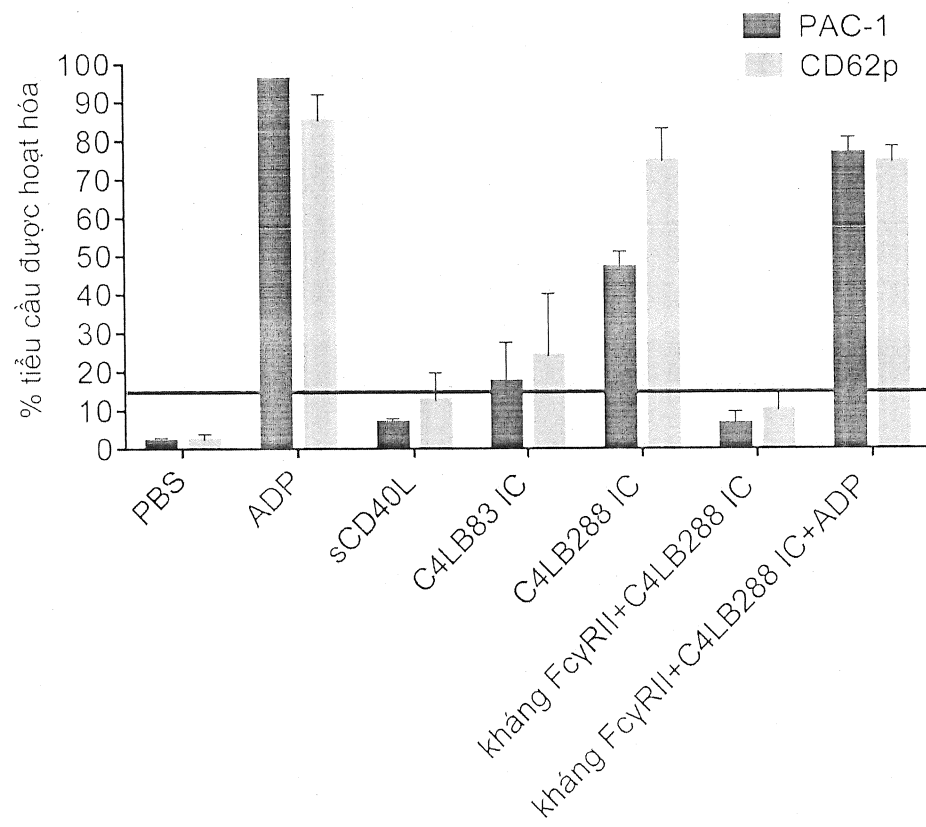
Hình 8A.



Hình 8B.



Hình 8C.



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Biotech, Inc.

Fransson, Johan

Leu, Jocelyn

Obmolova, Galina

Suri, Anish

Teng, Fang

Teplyakov, Alexey

Zhou, Hong

<120> KHÁNG THỂ ĐỐI KHÁNG PHÂN LẬP ĐƯỢC LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD154 NGƯỜI, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH, VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> JBI5068WOPCT

<140> Được chuyển nhượng

<141> 04/08/2016

<150> 62201150

<151> 05/08/2015

<150> 62367660

<151> 28/07/2016

<160> 87

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 1

Met	Ile	Glu	Thr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly
1															15

Leu	Pro	Ile	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu

Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50

55

60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65

70

75

80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85

90

95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100

105

110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115

120

125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

130

135

140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145

150

155

160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165

170

175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180

185

190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195

200

205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210

215

220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225

230

235

240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
 260

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> Callithrix jacchus (khi đuôi sóc)

<400> 2

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Pro Val Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Val Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

130

135

140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145

150

155

160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165

170

175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180

185

190

Leu Cys Leu Lys Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195

200

205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210

215

220

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225

230

235

240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245

250

255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210> 3

<211> 261

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis (khi đuôi dài)

<400> 3

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Pro Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

Leu Pro Val Arg Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Ile Phe Leu

20

25

30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

35

40

45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50

55

60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65

70

75

80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85

90

95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100

105

110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115

120

125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

130

135

140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145

150

155

160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165

170

175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180

185

190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195

200

205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220

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

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
 260

<210> 4
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 4

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 35 40 45

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 50 55 60

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 85 90 95

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 100 105 110

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

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 130 135 140

Gly Leu Leu Lys Leu
 145

<210> 5
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Callithrix jacchus (khỉ đuôi sóc)

<400> 5

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 35 40 45

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 50 55 60

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Cys Leu Lys Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 85 90 95

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 100 105 110

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 115 120 125

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 130 135 140

Gly Leu Leu Lys Leu
 145

<210> 6
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis (khỉ đuôi dài)

<400> 6

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 35 40 45

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 50 55 60

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 85 90 95

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 100 105 110

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

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 130 135 140

Gly Leu Leu Lys Leu
 145

<210> 7
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein dung hợp shCD154 gắn His

<400> 7

Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Met Gln Lys Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
 20 25 30

Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
 35 40 45

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

Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
 65 70 75 80

Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
 85 90 95

Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
 100 105 110

Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
 115 120 125

Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
 130 135 140

Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
 145 150 155 160

Leu

<210> 8

<211> 161

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp smCD154 gắn His

<400> 8

Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Met Gln Lys Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
 20 25 30

Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
 35 40 45

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

Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
 65 70 75 80

Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
 85 90 95

Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
 100 105 110

Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Ile
 115 120 125

Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
 130 135 140

Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
 145 150 155 160

Leu

<210> 9

<211> 161

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp scCD154 gắn His

<400> 9

Gly Ser His His His His His Gly Gly Gly Ser Met Gln Lys Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser

20

25

30

Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
 35 40 45

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

Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
 65 70 75 80

Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
 85 90 95

Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
 100 105 110

Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
 115 120 125

Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
 130 135 140

Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
 145 150 155 160

Leu

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gắn His6

<400> 10

His His His His His His

1 5

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gắn ILZ

<400> 11

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile

1 5 10 15

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu

20 25 30

Arg

<210> 12

<211> 198

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp shCD154-ILZ

<400> 12

Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Arg Met Lys Gln

1 5 10 15

Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu

20 25 30

Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly

```
<210> 13
<211> 198
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>

<223> Protein dung hợp smCD154-IL2

<400> 13

Gly Ser His His His His His Gly Gly Gly Ser Arg Met Lys Gln
 1 5 10 15

Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
 20 25 30

Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly
 35 40 45

Ser Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
 50 55 60

Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
 65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
 85 90 95

Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
 100 105 110

Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
 115 120 125

Ser Leu Cys Leu Lys Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
 130 135 140

Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
 145 150 155 160

His Leu Gly Gly Ile Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val

165

170

175

Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
 180 185 190

Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 195

<210> 14

<211> 198

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein dung hợp scCD154-IL2

<400> 14

Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Arg Met Lys Gln
 1 5 10 15

Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
 20 25 30

Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly
 35 40 45

Ser Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
 50 55 60

Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
 65 70 75 80

Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
 85 90 95

Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
 100 105 110

Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
 115 120 125

Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
 130 135 140

Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
 145 150 155 160

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

Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
 180 185 190

Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 195

<210> 15
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 15

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> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1

<400> 16

Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1

<400> 17

Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1

<400> 18

Ser Tyr Ser Phe Tyr Trp Gly

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1

<400> 19

Ala Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1

<400> 20

Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1

<400> 21

Ser Phe Ile Tyr Tyr Trp Gly

1 5

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2

<400> 22

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2

<400> 23

Trp Ile Ser Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2

<400> 24

Gly Ile Ser Pro Tyr Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2

<400> 25

Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2

<400> 26

Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2

<400> 27

Arg Phe Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Gly Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2

<400> 28

Cys Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 29

Gly Ala Ser Val Trp Asp Gly Pro Ala Glu Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 30

Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr

1 5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 31

Asp Thr Gly Trp Val Gly Ala Phe Tyr Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 32

Leu Gln Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp His

1 5 10

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 33

Asp Trp Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Phe Gly Pro Gly Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Leu Asp Val

20

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 34

Glu Gly Glu Leu Ala Gly Ile Phe Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 35

Leu Trp Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1

<400> 36

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ala Ser Ser Asn Asn Glu Asn Phe Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1

<400> 37

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1

<400> 38

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1

<400> 39

Ser Gly Asp Glu Leu Gly Asp Lys Phe Ala Cys

1 5 10

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1

<400> 40

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Cys
 1 5 10

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1

<400> 41

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1

<400> 42

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala Cys
 1 5 10

<210> 43
 <211> 7

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 43

Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 44

Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 45

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 46

Gln Glu Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2

<400> 47

Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2

<400> 48

Gln Asp Asp Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2

<400> 49

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 50

Tyr Ala Asn Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3

<400> 51

Gln Gln Ala Tyr Thr Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3

<400> 52

Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3

<400> 53

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3

<400> 54

Gln Ala Trp Asp Ser Asp Thr Ala Val

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3

<400> 55

Gln Ala Trp Asp Ser Gly Thr Val Val

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3

<400> 56

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3

<400> 57

Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val

1 5

<210> 58

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C4LB5

<400> 58

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Gly Ala Ser Val Trp Asp Gly Pro Ala Glu Val Phe Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 59

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C4LB89

<400> 59

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 60

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C4LB94

<400> 60

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ser Pro Tyr Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Asp Thr Gly Trp Val Gly Ala Phe Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 61

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C4LB150

<400> 61

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

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

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

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

Leu Lys Ser Arg Ala Thr Met Ser Val Val Thr Ser Lys Thr Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Leu Gln Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp His Trp
 100 105 110

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

<210> 62
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH của C4LB189

<400> 62

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 Ala Ala Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Trp Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Phe Gly Pro Gly
 100 105 110

Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 63

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH của C4LB191

<400> 63

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Phe Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Gly Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Glu Leu Ala Gly Ile Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 64
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C4LB199

<400> 64

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

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

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

Trp Val Gly Cys Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Leu Trp Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 65

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C4LB5

<400> 65

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 Val Leu Ala Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Glu Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser 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 Gln
 85 90 95
 Ala Tyr Thr Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 66
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của C4LB89

<400> 66

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 67
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của C4LB94

<400> 67

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 Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala 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 Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 68
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL của C4LB150

<400> 68

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

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Gly Asp Lys Phe Ala
20 25 30

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

Gln Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 69

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C4LB189

<400> 69

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

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

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

Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gly Thr Val Val
 85 90 95

Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 70

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của C4LB191

<400> 70

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

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

Ser Trp Asn His Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 71
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của C4LB199

<400> 71

32790

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

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

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Val Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL or C4LB235

<400> 72

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 73
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL của C4LB236

<400> 73

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 74

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của 5c8

<400> 74

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala 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

Thr Arg Ser Asp Gly Arg Asn Asp Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của 5c8

<400> 75

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

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

Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 76

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN bổ sung của VH của C4LB231

<400> 76

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgacc 60
 atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac gccaacagcc tgcagagcgg cgtgccagc 180
 agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcgacagca tcccctggac cttcgccag 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 77

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN bổ sung của VL của C4LB231

<400> 77

caggtccagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
 tcttgcaagg ccagcggcgg caccttcagc agctacggca tcagctgggt ccgacaggcc 120
 ccaggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcccca tcttcggcaa caccaactac 180
 gccagaaaat tccagggcag agtgaccatc accgcgcagc agagcaccag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgcg gacgcaggac accgcctgt actactgcgc cagaagccgg 300
 tactacggcg acctggacta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtgtc ctct 354

<210> 78

<211> 387

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN bổ sung của VH của C4LB191

<400> 78
 caggtgcagc tgggtgcagag cggcgctcag gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg 60
 aagaaacctg ggcgcagcat gaaggtgtcc tgcaaggcca gcggtctacac cttcaccgac 120
 tactacatcc actgggtgcg ccaggcccca ggccagggac tggaatgggt gggacgggtc 180
 aacccaaca gggcgacac caacggcgcc cagaaattcc agggcagagt gaccatgacc 240
 cgggacacca gcatcagcac cgcctacatg gaactgaccc ggctgcggag cgacgacacc 300
 gccgtgtacc actgtgccag agagggcgag ctggccggca tcttcttcga ctactggggc 360
 cagggcaccc tggtgacagt gtccage 387

<210> 79
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN bổ sung của VL của C4LB191

<400> 79
 agctacgagc tgaccagcc cccagcgtg tccgtgtctc ctggccagac cgccagcatc 60
 acctgtagcg gcgacaagct gggcgacaaa tacgtgtcct ggaaccacca gaagcccggc 120
 cagagccccg tgctgggtgat ctaccaggac cggaagaggc ccagcggcat ccccgagaga 180
 ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg 240
 gacgaggccg actactactg ccaggcctgg gacagcagca ccgtggtgtt cggcggaggc 300
 accaagctga ccgtgctg 318

<210> 80
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH của kháng thể đơn dòng FL C4LB89 tại IgG1sigma

<400> 80

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Ser Ser		
225	230	235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365

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

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

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

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

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

<210> 81

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ của C4LB89

<400> 81

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 82

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> VH của kháng thể đơn dòng FL C4LB89 tại IgG1sigmaYTE

<400> 82

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Ser Ser		
225	230	235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg		
245	250	255
Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365

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

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

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

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

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

<210> 83

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của kháng thể đơn dòng FL C4LB89 tại IgG2sigma

<400> 83

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
245	250	255	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 84
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH của C4LB119

<400> 84

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Phe Gly Tyr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Thr Gly Leu Asn Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 85
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C4LB119

<400> 85

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 86

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH của C4LB83

<400> 86

Gln 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL của C4LB83

<400> 87

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Trp
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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